BAB III
METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Teknologi Bahan Alam Universitas Buana Perjuangan Karawang. Waktu penelitian dimulai pada bulan September 2018 s/d bulan Februari 2019.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu gelas kimia, gelas ukur, labu ukur, corong, spatula, botol semprot, batang pengaduk, chamber, blender, penggaris, cawan penguap, tabung reaksi, rak tabung reaksi, pipet tetes, pensil, lampu UV (λ 254 dan 366 nm), botol vial, kuvet, seperangkat alat refluks, EYELA OSB-2100 (rotary evaporator), MEMMERT (water bath), seperangkat alat kromatografi kolom (KK), GEMMYCO YCO-N01 hot air oven, THERMO SCIENTIFIC (spektrofotometri UV-Vis).

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan yaitu kulit batang kawista (*Limonia acidissima* L.), n-heksana, etil asetat, metanol, silika gel 60 (0,063-0,200 mm), pipa kapiler, plat KLT, aquadest, NaOH, asam klorida, besi (III), kertas saring, alumunium foil, serbuk magnesium, amil alkohol, pereaksi Dragendorff, pereksi Mayer, pereaksi Lieberman Bouchard, vanilin sulfat, kalium hidroksida, toluen, gelatin 1%, amonia, natrium sulfat, kloroform, eter.

3.3 Pembuatan Reagen

Adapun jenis reagen yang digunakan pada uji fitokimia adalah :

A. Pereaksi Mayer

Sebanyak 1,36 g raksa (II) klorida, dilarutkan dalam air suling hingga 60 ml. Pada wadah lain ditimbang sebanyak 5 g kalium iodida lalu dilarutkan dalam 20 ml air suling. Kedua larutan dicampurkan dan

ditambahkan air suling hingga diperoleh larutan 100 ml (Depkes RI, 1995).

B. Pereaksi Dragendrorff

Sebanyak 8 g bismuth (II) nitrat dilarutkan dalam 20 ml asam nitrat pekat kemudian dicampurkan dengan kalium iodida sebanyak 27,2 g dalam 50 ml air suling. Campuran didiamkan sampai memisah sempurna. Larutan jernih diambil dan diencerkan dengan air suling secukupnya hingga 100 ml (Depkes RI, 1995).

C. Pereaksi Besi (III) klorida 1% ($FeCl_3$)

Sebanyak 1 g besi (III) klorida dilarutkan dalam air suling sampai 100 ml (Depkes RI, 1995).

D. Natrium Hidroksida 10%

Sebanyak 10 g natrium hidroksida dilarutkan dalam air suling sampai 100 ml (Depkes RI, 1995).

E. Pereaksi Besi (III) klorida 10% ($FeCl_3$)

Sebanyak 10 g besi (III) klorida dilarutkan dalam air suling sampai 100 ml (Depkes RI, 1995).

F. Pereaksi Asam Klorida 2N

Sebanyak 17 ml asam klorida pekat diencerkan dengan air suling sampai 100 ml (Depkes RI, 1995).

G. Pereaksi Asam Sulfat 2N

Sebanyak 5,5 ml asam sulfat pekat diencerkan dengan air suling hingga diperoleh 100 ml (Depkes RI, 1995).

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Penyiapan Sampel

Sampel yang digunakan adalah kulit batang pohon kawista (*Limonia acidissima* L.) kemudian diberi perlakuan meliputi: sortasi basah, pencucian, perajangan, pengeringan, sortasi kering, dan diserbukkan dengan mesin penggiling sampai jadi serbuk simplisia. Simplisia disimpan dalam wadah yang bersih tertutup rapat, kedap udara, dan diberi silika gel.

3.4.2 Skrining Fitokimia

Skrining Fitokimia meliputi sebagai berikut :

1) Uji Kandungan Alkaloid

Simplisia dibasahkan dengan ammonia encer, digerus dalam mortir, ditambahkan beberapa ml $CHCl_3$ sambil terus digerus. Setelah disaring, filtrat dikocok dengan HCl 2N. Lapisan asam dipisahkan kemudian dibagi menjadi tiga bagian dalam tabung reaksi, tabung reaksi I digunakan sebagai blangko, tabung reaksi II ditambahkan pereaksi Mayer, jika terbentuk endapan putih maka positif Alkaloid, Tabung reaksi ke III ditambahkan pereaksi Dragendorff, jika ada endapan jingga maka positif Alkaloid (Harborne, 1987).

2) Uji Kandungan Flavonoid

Filtrat hasil pemanasan dengan aquadest dimasukan kedalam tabung reaksi ditambahkan serbuk Mg dan 0.5 ml HCl, lalu dikocok kuat, adanya warna merah/jingga/kuning menunjukan positif Flavonoid (Harborne, 1987).

3) Uji Kandungan Saponin

Filtrat hasil pemanasan dengan aquadest dimasukan kedalam tabung reaksi dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Pembentukan busa 1 cm dan persisten selama 1 menit serta tidak hilang setelah penambahan 1 tetes HCl encer menunjukan positif Saponin (Harborne, 1987).

4) Uji Kandungan Tanin

filtrat hasil pemanasan dengan aquadest dimasukkan ke dalam tabung reaksi ditambahkan metanol dan 3-5 tetes larutan $FeCl_3$ 1%. Hasil positif ditunjukan dengan terbentuknya warna hitam kebiruan atau hijau (Sangi *et al,* 2008).

5) Uji Kandungan Polifenolat

filtrat hasil pemanasan dengan aquadest dimasukkan ke dalam tabung reaksi ditambahkan larutan $FeCl_3$ 10% dalam aquades. Reaksi positif memberikan warna merah, hijau, ungu, biru atau hitam yang kuat (Harborne, 1987).

6) Uji Kandungan Kuinon

Filtrat hasil pemanasan dengan aquadest dimasukan kedalam tabung reaksi ditambahkan NaOH, adanya warna kuning tua, jingga menunjukan positif Kuinon (Harborne, 1987).

7) Uji Kandungan Monoterpenoid dan Seskuiterpenoid

Simplisia disari dengan eter, lalu diuapkan dan diteteskan pereaksi vanilin sulfat 10%, terjadinya warna-warna menunjukan positif Monoterpenoid dan seskuiterpenoid (Harborne, 1987).

8) Uji Kandungan Triterpenoid dan Steroid

Uji Simplisia disari dengan eter, allu diuapkan dan diteteskan pereaksi *Libermann Buchard*, terbentuk warna ungu menunjukan positif triterpenoid, sedangkan warna biru-hijau positif steroid (Harborne, 1987).

3.4.3 Penetapan Kadar Air Cara Destilasi

Sampel ditimbang dimasukan ke dalam labu alas bulat, kemudian ditambahkan toluen yang sudah dijenuhkan semalaman. Hubungkan alat kemudian panaskan selama 15 menit.

Setelah toluen mulai mendidih, suling dengan kecepatan lebih kurang 2 tetes tiap detik, hingga sebagian besar air tersuling, kemudian naikkan kecepatan penyulingan hingga 4 tetes tiap detik. Setelah air dan toluen memisah sempurna, baca volume air. Hitung kadar air dalam % (MMI V, 1989).

$$\text{Perhitungan kadar air (\%)} = \frac{\text{volume air hasil destilasi (ml)x bj air}}{\text{berat simplisia}} \text{ x } 100$$

(3.1)

3.4.4 Ekstraksi

Serbuk simplisia kulit batang pohon kawista (*Limonia acidissima* L.) diekstraksi dengan cara metode refluks menggunakan pelarut bertingkat yaitu n-heksana, etil asetat dan metanol. Serbuk simplisia ditimbang lalu dimasukan ke dalam labu alas bulat, kemudian ditambahkan pelarut dengan perbandingan sampel dan pelarut yaitu 1 : 5. Rangkai alat refluks dan kemudian lakukan ekstraksi. Filtrat yang diperoleh ditampung pada wadah penampung dan simplisianya ditambahkan lagi pelarut, dikerjakan seperti

semula sebanyak 3 kali. Filtrat yang diperoleh dikumpulkan dan dipekatkan dengan *evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental. Kemudian simplisia dikeringkan dan dikerjakan seperti semula dengan pelarut lainnya.

3.4.5 Karakterisasi Metabolit Sekunder

Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT) umumnya digunakan untuk mengetahui kemurnian kandungan senyawa (Harbone, 1987) dan dapat digunakan untuk tujuan identifikasi senyawa (Farmakope Herbal Indonesia, 2009). Ekstrak kulit batang kawista dianalisis komponennya dengan KLT menggunakan fase diam silika gel GF_{254} dan fase gerak n-heksana - etil asetat, etil asetat - metanol dengan berbagai perbandingan untuk menentukan eluen yang baik untuk kromatografi kolom klasik. Kromatogram yang dihasilkan dari analisis KLT dengan eluen tersebut menampakkan beberapa komponen senyawa kimia yang terkandung di dalam ekstrak kental yang di deteksi lebih lanjut menggunakan sinar UV λ 254 nm, sinar UV λ 366 nm (Sasatrohamidjojo, H, 1983).

Pemisahan komponen dari fraksi metanol selanjutnya dilakukan dengan kromatografi kolom. Fase diam yang digunakan yaitu silika gel 60 (0,063-0,200 mm). Fase gerak yang digunakan yaitu n-heksana, etil asetat, dan metanol. Fraksi dari hasil berbagai perbandingan pelarut dielusi secara SGP (*Step Gradien Polarity*) yang digunakan untuk memperoleh pemisahan yang baik antara senyawa polar, semi polar, dan non polar yang terdapat dalam fraksi ekstrak metanol sehingga terjadi pemisahan secara bertahap berdasarkan sifat kepolaranya (Agoes, 2007). Eluen dari kromatografi kolom ditampung dengan botol vial yang telah ditimbang dan diberi nomor. Eluen didalam vial dimonitoring dengan KLT dan dilanjutkan uji spektrofotometri UV-Vis, uji kualitatif dengan pereaksi, dan penampak noda. Spektrofotometer UV-Vis digunakan untuk menguji ikatan rangkap terkonjugasi atau tidak terkonjugasi pada suatu senyawa organik. Spektrum flavonoid biasanya ditentukan dalam larutan dengan pelarut methanol (MeOH) atau etanol (EtOH) (Porter & Markham, 1970). Pengukuran spektrum dilakukan pada panjang gelombang 200-400 nm. Penampak noda $FeCl_3$ digunakan untuk mendeteksi senyawa fenol, penapak noda sitroborat

digunakan untuk mendeteksi senyawa flavonoid, dan penampak noda anisaldehid digunakan untuk mendeteksi senyawa flavonoid.