

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Alat dan Bahan

3.1.1 Alat

Peralatan yang digunakan yaitu corong pisah, statif, ring, gelas ukur, *beaker glass*, erlenmeyer, corong, botol semprot, oven, rak tabung reaksi, tabung reaksi, batang pengaduk, spatula, botol vial, cawan penguap, blender, pipet tetes, neraca analitik, kaca arloji, pipa kapiler, chamber, plat KLT (TLC Silica gel 60 F₂₅₄ *merck* 1.05554.0001), pensil, penggaris, *water bath*, seperangkat alat kromatografi kolom, lampu UV (λ 254 dan 366 nm) untuk melihat noda, dan spektrofotometri UV-Vis (Thermo Fisher Scientific Evolution 201).

3.1.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu buah *C. cujete*, kertas saring, pelarut etil asetat, n-Heksan, ammonia, kloroform, amil alkohol, asam sulfat pekat, HCl, KOH, gelatin 1%, silika gel 60 F₂₅₄ (0,063-0,200 mm), aquades, aluminium foil, vanilin sulfat 10%, pereaksi Mayer dan pereaksi Dragendorff digunakan untuk identifikasi alkaloid, pereaksi Liberman Bouchard di gunakan untuk identifikasi terpenoid dan steroid, besi (III) flourida (FeCl₃) digunakan untuk identifikasi fenolik.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Pelaksanaan penelitian ini dilakukan di Laboratorium Teknologi Bahan Alam Universitas Buana Perjuangan Karawang. Penelitian ini dimulai pada bulan Februari sampai bulan Agustus 2020.

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Persiapan Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian diperoleh dari daerah Pebayuran , Kabupaten Bekasi. Kemudian tumbuhan buah *C. cujete* dideterminasi terlebih dahulu di Laboratorium Hayati Institut Teknologi Bandung . Hal ini bertujuan untuk mendapatkan kejelasan terkait tumbuhan yang akan dianalisis. Proses

determinasi ini dilakukan dengan cara membandingkan sampel tumbuhan buah *C. cujete* dengan acuan pustaka.

3.3.2 Ekstraksi

Metode ekstraksi yang dilakukan dalam penelitian adalah metode ekstraksi cair-cair, dengan sampel buah *C. cujete*, dan pelarut yang digunakan adalah etil asetat. Sampel buah *C. cujete* dipisahkan terlebih dahulu dari bijinya, kemudian ditimbang sebanyak 50 g. Sampel dimasukkan kedalam blender dan ditambahkan air sebanyak 100 mL. Sampel yang telah diblender disaring untuk memisahkan filtrat dan residunya. Filtrat yang diperoleh dimasukkan kedalam corong pisah dan ditambahkan pelarut etil asetat sebanyak 25 mL. Kemudian dilakukan pengocokkan secara perlahan-lahan, setelah itu didiamkan beberapa saat sampai terjadi dua lapisan. Ekstrak air dan ekstrak etil asetat dipisahkan, kemudian dilakukan pengestraksian kembali terhadap ekstrak air dengan pelarut etil asetat sampai larutan berwarna bening. Ekstrak etil asetat yang diperoleh digabungkan dan diuapkan menggunakan *water bath* sehingga didapat ekstrak kental. Ekstrak kental ditimbang dan dihitung nilai rendemennya (Ibrahim dan Sitorus, 2013). Menurut (Depkes, 2008) perhitungan nilai rendemen ekstrak dapat dihitung dengan persamaan berikut:

$$\text{Rendemen ekstrak} = \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat Simplisia}} \times 100\%$$

3.3.3 Pembuatan Reagen

A. Perekasi Mayer

Raksa (II) klorida ditimbang sebanyak 1,36 g, kemudian dilarutkan dengan 60 mL aquades. Selanjutnya timbang kalium iodida sebanyak 1 g, kemudian dilarutkan dengan 10 mL aquades. Kedua larutan tersebut dicampurkan kemudian disaring. Campuran ini diencerkan hingga 100 mL dengan aquades.

B. Perekasi Liberman Bouchard

Anhidrida asetat sebanyak 5 mL dicampurkan dengan asam sulfat pekat sebanyak 5 mL ke dalam *beaker glass*. Kemudian diencerkan dengan pelarut etanol hingga 100 mL.

C. Pereaksi H₂SO₄ 10% dalam Metanol

Sebanyak 5 mL asam sulfat pekat dimasukkan ke dalam beaker glass. Kemudian ditambahkan metanol sampai 50 mL.

3.3.4 Skrining Fitokimia

A. Skrining Fitokimia pada Buah Segar Meliputi:

1. Uji Kandungan Alkaloid

Sampel dibasakan dengan ammonia, digerus menggunakan mortir, ditambahkan beberapa mL kloroform dan digerus kembali. Kemudian disaring, filtrat hasil penyaringan ditambahkan HCl 2N dikocok sampai terbentuk dua lapisan. Lapisan asam dipisahkan kemudian dibagi menjadi tiga bagian dalam tabung reaksi. Tabung reaksi I digunakan sebagai blanko, tabung reaksi II ditambahkan pereaksi Mayer, apabila terbentuk endapan putih atau kekeruhan maka sampel positif mengandung alkaloid, tabung reaksi III ditambahkan pereaksi Dragendorff, apabila terjadi endapan jingga coklat maka sampel positif mengandung alkaloid (Harborne, 1987).

2. Uji Kandungan Saponin

Sampel dimasukkan kedalam *beaker glass* yang telah berisi aquades dan dididihkan, kemudian sampel disaring. Filtrat hasil penyaringan dimasukkan kedalam tabung reaksi kemudian dilakukan pengocokkan selama 10 detik. Apabila terjadi pembentukan busa sebesar 1 cm dan konsisten selama 10 menit dan tidak hilang setelah ditambahkan HCl, maka hal ini menandakan sampel positif mengandung saponin (Harborne, 1987).

3. Uji Kandungan Flavonoid

Sampel dimasukkan kedalam *beaker glass* yang telah berisi aquades dan dididihkan, kemudian sampel didinginkan dan disaring. Filtrat hasil penyaringan dimasukkan kedalam tabung reaksi ditambahkan etil asetat, kemudian dipanaskan dan disaring, ditambahkan ammonia. Adanya perubahan warna menjadi kuning menandakan sampel positif mengandung flavonoid (Ejelonu *et al.*, 2011).

4. Uji Kandungan Tanin

Sampel dimasukkan kedalam *beaker glass* yang telah berisi aquades dan dididihkan, kemudian sampel didinginkan dan disaring. Filtrat hasil

penyaringan dimasukkan kedalam tabung reaksi ditambahkan gelatin 1% terbentuknya endapan putih menunjukkan sampel positif mengandung tanin (Harborne, 1987).

5. Uji Kandungan Terpenoid dan Steroid

Sampel dilarutkan dengan kloroform dan kemudian disaring. Filtrat hasil penyaringan ditetesi dengan asam sulfat pekat melewati dinding tabung reaksi. Terbentuknya warna kuning keemasan menandakan sampel positif mengandung terpenoid, dan terbentuknya warna merah menunjukkan sampel positif mengandung steroid (Billacura dan Laciapag, 2017).

6. Uji Kandungan Kuinon

Sampel dimasukkan kedalam *beaker glass* yang telah berisi aquades dan dididihkan, kemudian sampel didinginkan dan disaring. Filtrat hasil penyaringan dimasukkan kedalam tabung reaksi ditambahkan KOH, adanya warna kuning hingga merah menunjukkan sampel positif mengandung kuinon (Harborne, 1987).

7. Uji Kandungan Fenol

Sampel dimasukkan kedalam *beaker glass* yang telah berisi aquades dan dididihkan, kemudian sampel didinginkan dan disaring. Filtrat hasil penyaringan dimasukkan kedalam tabung reaksi ditambahkan FeCl 1%, adanya warna biru hingga hitam menunjukkan sampel positif mengandung fenol (Harborne, 1987).

8. Uji Kandungan Monoterpenoid dan Sesquiterpenoid

Sampel disari dengan eter, lalu diuapkan dan ditetaskan pereaksi vanilin 10% dalam H₂SO₄ pekat. Terbentuknya warna-warna menandakan sampel positif mengandung monoterpenoid dan sesquiterpenoid (Harborne, 1987).

B. Skrining Fitokimia pada Ekstrak Meliputi:

1. Uji Kandungan Alkaloid

Ekstrak dibasakan dengan ammonia, digerus menggunakan mortir, ditambahkan beberapa mL kloroform dan digerus kembali. Kemudian disaring, filtrat hasil penyaringan ditambahkan HCl 2N dikocok sampai terbentuk dua lapisan. Lapisan asam dipisahkan kemudian dibagi menjadi tiga bagian dalam tabung reaksi. Tabung reaksi I digunakan sebagai blanko,

tabung reaksi II ditambahkan pereaksi Mayer, apabila terjadi endapan putih atau kekeruhan maka ekstrak positif mengandung alkaloid, tabung reaksi III ditambahkan pereaksi Dragendorff, apabila terjadi endapan jingga coklat maka ekstrak positif mengandung alkaloid (Harborne, 1987).

2. Uji Kandungan Saponin

Ekstrak dimasukkan kedalam *beaker glass* yang telah berisi aquades dan dididihkan, kemudian sampel disaring. Filtrat hasil penyaringan dimasukkan kedalam tabung reaksi kemudian dilakukan pengocokkan selama 10 detik. Apabila terjadi pembentukan busa sebesar 1 cm dan konsisten selama 10 menit dan tidak hilang setelah ditambahkan HCl, maka hal ini menandakan ekstrak positif mengandung saponin (Harborne, 1987).

3. Uji Kandungan Flavonoid

Ekstrak dimasukkan kedalam *beaker glass* yang telah berisi aquades dan dididihkan, kemudian sampel didinginkan dan disaring. Filtrat hasil penyaringan dimasukkan kedalam tabung reaksi ditambahkan etil asetat, kemudian dipanaskan dan disaring, ditambahkan ammonia. Adanya perubahan warna menjadi kuning menunjukkan bahwa ekstrak positif mengandung flavonoid (Ejelonu *et al.*, 2011).

4. Uji Kandungan Tanin

Ekstrak dimasukkan kedalam *beaker glass* yang telah berisi aquades dan dididihkan, kemudian sampel didinginkan dan disaring. Filtrat hasil penyaringan dimasukkan kedalam tabung reaksi ditambahkan gelatin 1% terbentuknya endapan putih menunjukkan ekstrak positif mengandung tanin (Harborne, 1987).

5. Uji Kandungan Terpenoid dan Steroid

Ekstrak dilarutkan dengan kloroform dan kemudian disaring. Filtrat hasil penyaringan ditetesi dengan asam sulfat pekat melewati dinding tabung reaksi. Terbentuknya warna kuning keemasan menunjukkan ekstrak positif mengandung terpenoid, dan terbentuknya warna merah menunjukkan ekstrak positif mengandung steroid (Billacura dan Laciapag, 2017).

6. Uji Kandungan Kuinon

Ekstrak dimasukkan kedalam *beaker glass* yang telah berisi aquades dan dididihkan, kemudian sampel didinginkan dan disaring. Filtrat hasil penyaringan dimasukkan kedalam tabung reaksi ditambahkan KOH, adanya warna kuning hingga merah menunjukkan ekstrak positif mengandung kuinon (Harborne, 1987).

7. Uji Kandungan Fenol

Ekstrak dimasukkan kedalam *beaker glass* yang telah berisi aquades dan dididihkan, kemudian sampel didinginkan dan disaring. Filtrat hasil penyaringan dimasukkan kedalam tabung reaksi ditambahkan FeCl 1%, adanya warna biru hingga hitam menunjukkan ekstrak positif mengandung fenol (Harborne, 1987).

8. Uji Kandungan Monoterpenoid dan Sesquiterpenoid

Ekstrak disari dengan eter, lalu diuapkan dan ditetaskan pereaksi vanilin 10% dalam asam sulfat pekat. Terjadinya warna-warna menunjukkan ekstrak positif mengandung monoterpenoid dan sesquiterpenoid (Harborne, 1987).

3.3.5 Isolasi

Menurut (Djamal, 2008) isolasi merupakan proses penarikan atau pemisahan suatu senyawa bahan alam dengan menggunakan pelarut yang sesuai.

A. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Metode kromatografi lapis tipis (KLT) merupakan metode pemisahan yang dilakukan berdasarkan pada fasa diam dan fasa gerak yang akan digunakan (Hanani, 2014). Fasa diam yang digunakan yakni terbuat dari silica gel 60 F₂₅₄ merck dengan ukuran 1 x 5 cm. Sebelum digunakan plat silica gel dioven pada suhu 110°C selama 30 menit (Harborne, 1987). Sampel ditotolkan pada plat KLT yang telah diberi jarak 1,5 cm dari tepi bawah plat. Kemudian plat dimasukkan kedalam *chamber* yang sudah diisi dengan fasa gerak yang sebelumnya sudah dijenuhkan terlebih dahulu menggunakan kertas saring. Kemudian *chamber* ditutup rapat dan dibiarkan hingga fasa gerak merambat sampai batas jarak rambat. Plat dikeluarkan dan dikeringkan diudara, pengamatan hasil kromatogram dilakukan dengan lampu ultraviolet pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Jarak yang ditempuh oleh

kromatogram dapat dihitung menggunakan persamaan berikut (Hanani, 2014); Depkes, 2008):

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh oleh senyawa}}{\text{Jarak yang ditempuh oleh pelarut}}$$

B. Kromatografi Kolom

Proses pemisahan senyawa pada sampel dilakukan menggunakan kromatografi kolom, kolom yang dipakai berdiameter 2 cm dengan panjang 30 cm. Perbandingan berat adsorben dan sampel adalah 30 : 1 (Harmita, 2009). Adapun proses pengerjaannya yaitu silica gel ditimbang terlebih dahulu sebanyak 15 g, kemudian dioven pada suhu 110°C selama 2 jam. Setelah dioven silica gel didinginkan dengan cara dimasukkan kedalam desikator (Kusmiyati *et al.*, 2011).

Mula-mula kolom dibersihkan terlebih dahulu, kemudian diisi dengan kapas pada bagian ujung bawah kolom agar silica gel tidak keluar. Kolom dipasang tegak lurus menggunakan statif. Pembuatan bubur silica gel dilakukan dengan cara memasukkan silica gel kedalam *beaker glass* dan ditambahkan pelarut, kemudian diaduk. Selanjutnya bubur dimasukkan kedalam kolom yang berisi pelarut sambil dipukul-pukul untuk menghilangkan gelembung udara dan menjaga homogenitas kemasan. Sebelum dan selama proses pemisahan kolom harus tetap terendam dengan ketinggian pelarut kurang lebih 1 cm diatas permukaan kolom agar terhindar dari kerusakan. Kemudian sampel dimasukkan kedalam kolom. Kran dibuka dengan hati-hati dan eluat yang keluar ditampung menggunakan vial yang sebelumnya ditimbang terlebih dahulu dan diberi penomoran (Harmita, 2009).

3.4 Identifikasi Senyawa Metabolit dengan Spektrofotometer UV-Vis

Identifikasi isolat yang diperoleh dianalisis menggunakan spektrofotometer Uv-Vis. Pelarut n-Heksan digunakan sebagai blanko dimasukkan kedalam kuvet hingga sepertiganya kemudian spektrofotometer Uv-Vis dikalibrasi menggunakan blanko tersebut. Isolat yang diperoleh dilarutkan dengan pelarut n-Heksan, kemudian dimasukkan kedalam kuvet hingga sepertiganya untuk dilakukan pengukuran spektrum serapan. Spektrum yang dihasilkan diamati dan dicatat panjang gelombang serta absorbansinya.