

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### 3.1 Bahan Penelitian

Kulit jengkol 20kg, aquades, n-heksan, etil asetat, metanol, sephadex LH-20, silica gel Merk 60 GF<sub>254</sub> (230-400 mesh), alkohol 70%, alumunium foil, asam klorida (HCL), natrium klorida (NaCl), FeCl<sub>3</sub> 5%, asam sulfat pekat, reagen sitoborat, I<sub>2</sub> (iodin), asam borat, pereagen *Dragendroff*, pereaksi Mayer, NaOH 1 %, NH<sub>4</sub>OH, kertas wathman, pereaksi *Liebermann – Buchard* merupakan bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini.

#### 3.2 Alat Penelitian

Gunting , corong, spatula, cawan penguap, batang pengaduk, gelas ukur, botol coklat, erlenmeyer, oven, *water bath* (Memmert), penjepit, plat tetes, lampu UV 254-366 nm, tabung reaksi, rak tabung, lampu bunsen, pipet tetes, *chamber*, pinset, beaker glass, blender, seperangkat alat soxhlet (*Electrothermal*), rangkaian destilasi, *vacum rotary evaporator* (Eyela OSB-2100), dan penjepit tabung reaksi adalah alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini.

#### 3.3 Lokasi dan Tempat Penelitian

Laboratorium Bahan Alam, Mikrobiologi, dan Kimia Universitas Buana Perjuangan Karawang dan dilaksanakan pada bulan januari 2019 sampai bulan juli 2020 adalah lokasi dan tempat penelitian.

##### 3.3.1 Pembuatan Pereagen Untuk Uji Skrining Fitokimia Dan Kromatografi Lapis Tipis

a. NaOH 1 %

Timbang 1 gram NaOH lalu dilarutkan dalam 100 mL aquadest (Kusnaeni, 2008).

b.  $\text{FeCl}_3$  5%

Ditimbang 5 gram  $\text{FeCl}_3$  lalu dilarutkan dalam 100 mL aquadest + HCl pekat 10 mL (Harborne, 1996).

c. Dragendorf

Timbang 0,8 gram bismuth subnitrat dilarutkan dalam 20 ml asam asetat dan 40 ml aquadest. Kemudian dicampurkan dengan 8 gram kalium iodida dan 20 ml aquadest (Depkes, 1995).

d. Mayer

Sebanyak 1,36 gram raksa (II) klorida dilarutkan dengan 60 ml aquadest didalam gelas piala. Kemudian didalam gelas piala terpisah, 1 gram kalium iodide dilarutkan dengan 10 ml aquadest. Kedua larutan tersebut dicampurkan dan disaring. Campuran ini diencerkan hingga 100 ml didalam labu ukur dengan aquadest (Depkes, 1995).

e. Pereaksi Liberman – Burchard

Sebanyak 5 ml anhidrida asetat dan 5 mL asam sulfat pekat dicampurkan secara perlahan didalam gelas piala, lalu diencerkan hingga 100 ml dengan pelarut etanol (Setiawati, 2001).

### 3.4 Prosedur Penelitian

#### 3.4.1 Persiapan Sampel

Tanaman jengkol di determinasi terlebih dahulu di Laboratorium Insitut Teknologi Bandung Fakultas Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, tujuannya untuk mendapatkan jenis tanaman yang digunakan dengan jelas.

Setelah di determinasi dilakukan pengumpulan sampel kulit jengkol, selanjutnya kulit jengkol dirajang dan di keringkan di dalam suhu ruangan pada suhu  $20^{\circ}\text{C}$  -  $25^{\circ}\text{C}$  untuk mengurangi kadar air dalam sampel. Kulit jengkol yang sudah kering di haluskan dengan menggunakan blender, kemudian di saring menggunakan mesh 20. Sampel yang telah dihaluskan disimpan dalam wadah tertutup rapat untuk perlakuan selanjutnya.

### 3.4.2 Ekstraksi

Pada metode ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi yaitu sampel kulit buah jengkol (*Archidendrom jiringa (jack)Nieslen*) yang telah disiapkan di ekstrakasi dengan menggunakan pelarut n-heksana, etil asetat, metanol dimaserasi secara berturut–turut. Sampel yang sudah halus di maserasi menggunakan pelarut n-heksana secara terus menerus sampai filtrate yang dihasilkan berubah dari warna pekat sampai menjadi bening. Maserat dikumpulkan dan ekstrak cair dari hasil maserasi diuapkan menggunakan alat *rotary evaporator* pada suhu 30-40°C hingga diperoleh ekstrak kental. Hal yang sama dilakukan dengan pelarut etil asetat, metanol untuk memperoleh ekstrak etil asetat dan ekstrak metanol (Wijaya *et al.*, 2018). Kemudian ekstrak yang didapat dilakukan perhitungan seperti dibawah ini :

$$\% \text{Rendemen Ekstrak} = \frac{\text{berat ekstrak yang didapat (g)}}{\text{berat simplisia yang di ekstrak}} \times 100\%$$

### 3.4.3 Penentuan Kadar Air Sampel

Sampel yang akan digunakan ditimbang dan dicatat hasilnya selanjutnya dikeringkan, setelah kering dilakukan penimbangan kembali, kemudian dilakukan perhitungan kadar air sebagai berikut (Supomo *et al.*, 2016) :

$$\text{kadar air} = \frac{\text{berat sampel basah} - \text{berat sampel kering}}{\text{berat sampel basah}} \times 100\%$$

### 3.4.4 Penapisan Fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan untuk mengidentifikasi kandungan senyawa metabolit sekunder pada tanaman kulit buah jengkol (*Pithecellobium jiringa*) skrining fitokimia dilakukan yaitu uji alkaloid, flavonoid, saponin, tannin, fenolik, terpenoid, steroid berikut langkah – langkah yang dilakukan skrining fitokimia :

#### 1. Pemeriksaan alkaloid

2 – 4 gram kulit buah jengkol dihaluskan dengan mortir, tambahkan 10 mL kloroform dan 10 mL ammonia 0,05N. Saring filtrat dengan kapas dan masukkan kedalam tabung reaksi, tambahkan 10 tetes asam sulfat 2 N dan kocok perlahan. Campuran dibiarkan sampai terbentuk dua lapisan yaitu lapisan asam dan kloroform. Lapisan asam diambil dengan pipet dan dimasukkan ketabung reaksi kemudian ditambahkan reagen mayer, ditunjukkan endapan putih (Abriyani Ermi dan Fikayuniar Lia, 2020).

#### 2. Pemeriksaan flavonoid

Sampel ditambahkan NaOH 10%, tunggu beberapa saat, apabila terbentuk warna kuning, oranye atau merah menunjukkan adanya flavonoid (Marpaung, 2017).

#### 3. Pemeriksaan saponin

Sampel dimasukkan kedalam tabung ditambah aquadest lalu di kocok kuat 30 detik, jika berbusa menandakan adanya saponin (Abriyani Ermi dan Fikayuniar Lia, 2020).

#### 4. Pemeriksaan Fenolik

Sebagian dari lapisan air diambil dan dipindahkan dengan pipet kedalam tabung reaksi kecil, kemudian ditambahkan pereaksi  $FeCl_3$  terbentuknya warna biru/ungu menunjukkan positif adanya senyawa fenolik (Abriyani Ermi dan Fikayuniar Lia, 2020).

#### 5. Pemeriksaan triterpenoid dan steroid

Jika terbentuk warna merah atau merah keunguan menunjukkan positif adanya kandungan triterpenoid. Sampel yang sudah dihaluskan di ekstrak dengan asam asetat glasial. Hasil ekstrak dipindahkan dengan pipet tetes kedalam dua tabung reaksi, kemudian kedalam masing – masing tabung reaksi ditambahkan asam sulfat pekat. Terbentuknya warna hijau atau hijau kebiruan menunjukkan positif adanya steroid (Abriyani Ermi dan Fikayuniar Lia, 2020).

### 3.4.5 Pemurnian Sampel

Pada proses pemurnian sampel menggunakan metode kromatografi lapis tipis dan kromatografi kolom. Tahap pemisahan pemurnian sampel sendiri bertujuan untuk mendapatkan senyawa murni dari ekstrak n-heksana, etil asetat dan metanol. Pada proses kromatografi lapis tipis terhadap ekstrak fraksi yang didapat, dilakukan dengan fase gerak berupa campuran etil asetat dan n-heksana dengan berbagai perbandingan dan fase diam berupa plat silika gel GF<sub>254</sub>. Komposisi pelarut yang menghasilkan pemisahan KLT terbaik kemudian digunakan sebagai fase gerak dalam kromatografi kolom dan fase diam silika gel. Perisapan pertama pemisahan pemurnian kromatografi kolom yaitu memanaskan silika gel dengan suhu 160°C selama 3 jam kemudian didinginkan. Setelah itu silika gel dibuat bubuk dan dimasukkan kedalam kolom, lalu dibiarkan semalam. Ekstrak kental etil asetat di gerus dengan silika gel sama banyak jumlahnya. Lalu masukkan kedalam kolom, dan pelan-pelan masukkan eluen sambil buka keran yang sebelumnya telah diberikan kapas pada ujungnya. Kemudian fraksi ditampung menggunakan botol vial (Syahril *et al.*, 2015).

Hasil dari kromatografi kolom yang diperoleh ditampung dalam vial. Semua fraksi hasil dari kromatografi kolom selanjutnya dilakukan analisis dengan menggunakan kromatografi lapis tipis dengan eluen yang sama dan diamati di bawah lampu UV 254 nm dan 366 nm untuk melihat noda R<sub>f</sub> yang sama. Kemudian fraksi yang diperoleh di uji metabolit sekunder (Wati *et al.*, 2017).