

BAB III

METODE PENELITIAN

III.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia Universitas Katolik Widya Mandira Kupang selama waktu $\pm$ 5 bulan (November 2018 – April 2019) dan pengukuran sampel dengan spektrofotometri IR di Laboratorium Mineral dan Material Maju Universitas Negeri Malang (April 2019).

III.2 Tempat Pengambilan Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun tumbuhan Niko yang diambil di daerah Camplong Kecamatan Fatuleu, Kabupaten Kupang.

III.3 Alat dan Bahan

III.3.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah seperangkat alat spektrofotometer UV-Vis, seperangkat alat spektrofotometer inframerah (IR), lampu UV, kolom, seperangkat alat evaporasi (vacum rotary evaporator), plat KLT, chamber kromatografi, gelas kimia, gelas ukur, labu ukur, erlenmeyer, corong pisah, pipet tetes, Statip, batang pengaduk, timbangan analitik, tabung reaksi, rak tabung reaksi, botol vial, oven, blender, spatula, kertas saring, aluminium foil, gunting, pensil, mistar dan peralatan gelas lainnya.

III.3.2 Bahan

Bahan-bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini antara lain adalah metanol, n-heksan, etil asetat, kloroform, benzena, etanol, serbuk Mg, HCL pekat, NaOH, H₂SO₄ pekat, FeCl₃ 1 %, silika gel 60, pereaksi Wagner (akuades, iodin, dan kalium iodida), pereaksi Mayer (HgCl₂, KI, akuades), pereaksi Dragendorff (BiNO₃, HCl pekat, KI, akuades), akuades dan es batu.

III.4 Prosedur Kerja

III.4.1 Penyiapan sampel

Sampel daun tumbuhan Niko yang segar dikumpulkan, dibersihkan dan dikeringkan dengan cara dijemur di bawah sinar matahari. Kemudian sampel dirajang hingga halus.

III.4.2 Pembuatan Ekstrak Metanol

1. Sebanyak 200 g sampel serbuk daun Niko dimaserasi dengan pelarut metanol.
2. Maserasi dilakukan 7 x 24 jam pada suhu kamar (setiap 24 jam ekstrak disaring).
3. Ekstrak yang diperoleh disaring menggunakan corong dan kertas saring sehingga diperoleh filtrat dan residunya.
4. Maserasi dilakukan berulang-ulang sampai terekstrak dengan sempurna atau filtrat yang diperoleh bening atau tidak berwarna lagi.
5. Selanjutnya filtrat yang diperoleh dikumpulkan dan diuapkan dengan menggunakan *vacum rotary evaporator* (dievoporasi) pada suhu 45°C sehingga diperoleh ekstrak kental metanol daun Niko.

III.4.3 Uji fitokimia

a. Uji Alkaloid

Sebanyak 0,1 g ekstrak metanol dilarutkan dengan 10 mL kloroform amoniakal dan hasilnya di bagi dalam dua tabung. Tabung pertama ditambahkan dengan asam sulfat (H_2SO_4) 2 M. Lapisan atas dipisahkan dan di bagi dalam 3 tabung reaksi dan masing-masing tabung dilakukan pengujian dengan menambahkan pereaksi Mayer, Wagner dan pereaksi Dragendorf. Jika terbentuk endapan maka sampel tersebut positif (+) mengandung alkaloid.

b. Uji Flavonoid

Ekstrak kental metanol sebanyak 0,1 g dilarutkan dalam 10 mL metanol kemudian dibagi ke dalam empat tabung reaksi. Tabung pertama digunakan sebagai tabung kontrol, tabung kedua, ketiga, dan keempat berturut-turut ditambahkan 3 mL NaOH, 5 tetes H_2SO_4 pekat, dan serbuk Mg-HCl pekat. Warna pada masing-masing tabung dibandingkan dengan tabung kontrol, jika terjadi perubahan warna menjadi hijau kehitaman maka positif mengandung flavonoid dan jika warna hijau kecoklatan maka positif mengandung fenolik (Harborne, 2008 dalam Taher, 2011).

c. Uji Saponin dan Tanin

Ekstrak kental metanol yang diperoleh pada tahap ekstraksi ditimbang sebanyak 0,1 g dilarutkan dengan aquades sebanyak 15 mL kemudian dipanaskan selama 5 menit. Selanjutnya disaring dan filtratnya diambil sebanyak 10 mL dan dimasukkan kedalam tabung reaksi. Larutan kemudian di kocok-kocok. Uji positif adanya saponin pada larutan ditandai dengan terbentuknya busa/buih. Sedangkan untuk uji tanin; filtrat ditambahkan FeCl_3 1%. Bila dihasilkan warna hijau, biru, atau hitam maka filtrat positif mengandung tanin.

d. Uji Steroid

Sebanyak 0,1 g ekstrak metanol ditimbang kemudian ditambahkan 2 mL kloroform kemudian ditambahkan lagi 5 tetes H_2SO_4 6 M. Uji positif adanya steroid pada larutan dengan perubahan warna larutan menjadi coklat.

e. Uji Terpenoid

Sebanyak 1 g ekstrak kental metanol yang diperoleh ditimbang kemudian ditambahkan 20 mL etanol, 2 mL kloroform dan 3 mL H_2SO_4 pekat. Uji positif adanya terpenoid ditandai dengan perubahan warna larutan menjadi merah.

III.4.4 Penelusuran Pelarut

Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

1. Plat KLT diaktifkan dengan cara dipanaskan di dalam oven pada suhu 105°C selama 15 menit sebelum digunakan.
2. Plat didinginkan di udara terbuka selama 30 menit.
3. Dibuat batas atas dan batas bawah plat dengan menggunakan pensil dan mistar.
4. Ekstrak diambil sedikit kemudian dilarutkan dengan metanol. Sampel ditotolkan pada plat KLT yang telah di potong sesuai ukuran menggunakan pipa kapiler kemudian dielus dengan fase gerak (etanol, metanol etil asetat, kloroform, benzena dan n-heksana) yang akan memisahkan sampel dengan baik.
5. Plat dimasukkan ke dalam chamber, usahakan plat dalam posisi vertikal agar totolan sampel tidak terendam dalam pelarut, kemudian ditutup rapat.
6. Biarkan beberapa menit. Bila fasa gerak telah mencapai batas yang telah ditentukan, plat diangkat dan dikeringkan di udara terbuka.
7. Selanjutnya noda yang terbentuk diamati dengan lampu UV 254 nm dan 366 nm.
8. Eluen yang menghasilkan pemisahan terbaik pada plat KLT yang selanjutnya akan digunakan pada tahap fraksinasi.

III.4.5 Fraksinasi Ekstrak Metanol

Bahan : ekstrak kental metanol daun tumbuhan Niko

Fase diam : silica gel 60

No.	Fase gerak	Perbandingan	Volume (ml)
1.	Metanol: Etil Asetat : Kloroform	1: 2: 3	16 : 30 : 50
2.	Metanol: Etil Asetat : Kloroform	0,5: 1,5 : 3	10 : 30 : 60

Cara Kerja :

1. Sebanyak 50 g silika gel 60 dilarutkan dengan pelarut yang dijadikan eluen lalu dimasukkan secara perlahan pada permukaan kolom hingga setinggi 20 cm.
2. Ditimbang 1 g ekstrak kental metanol lalu dilarutkan dengan pelarut metanol sebanyak 10 ml dan dimasukkan secara perlahan pada permukaan kolom.
3. Fase gerak pertama dimasukkan ke dalam kolom dengan perbandingan metanol : etil asetat : kloroform (1 : 2 : 3). Eluat ditampung pada 25 botol penampung fraksi dan setiap botol menampung 5 mL eluat, lalu diberi label.
4. Setelah semua selesai, pada masing-masing fraksi yang dihasilkan dilakukan uji kromatografi lapis tipis dengan menggunakan fase diam lempeng silika gel GF₂₅₄ dan fase gerak metanol : etil asetat : kloroform (1: 2: 3)
5. Fraksi yang memiliki spot yang sama (5-6 spot) digabungkan dan dipekatkan. lalu difraksinasi kembali dengan pelarut campuran metanol : etil asetat : kloroform (0.5 : 1.5 : 3).
6. Selanjutnya hasil fraksinasi tersebut diuji KLT lagi dan diamati spot-spot yang terjadi. Fraksi yang menunjukkan spot tunggal dan memiliki R_f sama digabungkan lalu dipekatkan dan dihitung rendemennya.

III.4.6 Karakterisasi Senyawa

Karakterisasi golongan senyawa metabolit sekunder dilakukan menggunakan spektrofotometri UV-Vis dan IR.

III.4.7 Spektrofotometri UV-Vis

Isolat hasil fraksinasi dari daun Niko diukur pada alat spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 200-400 nm dengan blanko menggunakan pelarut metanol.

III.4.8 Spektrofotometri IR

Isolat hasil fraksinasi dari daun Niko dilarutkan dalam pelarut metanol dan ditempatkan dalam tempat sampel alat spektroskopi IR, kemudian dianalisis/diukur serapannya (bilangan gelombang/cm⁻¹).