

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Objek dan Lokasi Penelitian

Objek atau bahan penelitian ini adalah daun pohon suren (*Toona sinensis* Roem) yang diperoleh dari daerah Tegalpanjang, Garut dan digunakan hama lalat buah *Bacterosera dorsalis*. Determinasi tumbuhan suren dilakukan pada Lab Fisiologi Tumbuhan UPI Bandung.

Lokasi penelitian ini dilakukan di Laboratorium *Research* dan Laboratorium Kimia Instrumen Jurusan Pendidikan Kimia UPI Bandung.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1. Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah alat-alat gelas standar kimia organik/ kimia organik bahan alam, set alat destilasi, penguap berputar vakum (*Rotary evaporator vacuum*), pompa vakum, kromatografi lempeng tipis, set alat kromatografi cair vakum, set alat kromatografi *flash*, *UV box*, spektrofotometer UV-VIS, spektrofotometer FT-IR, ¹H-NMR, dan set alat uji hayati.

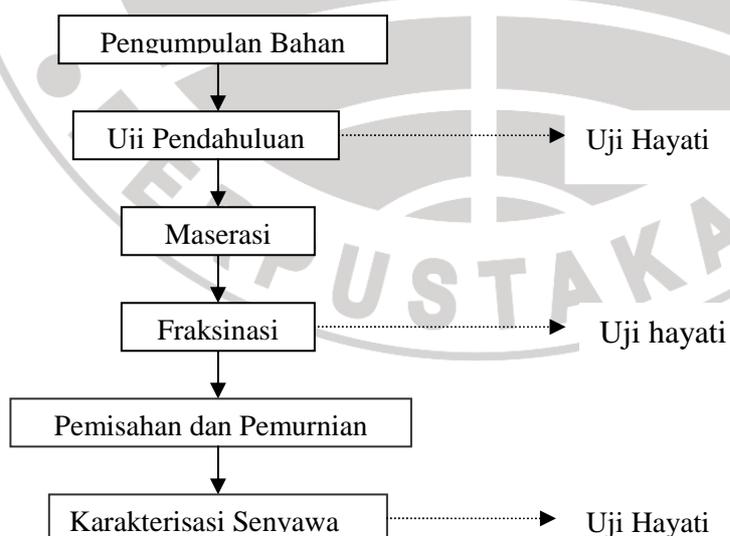
3.2.2. Bahan

Penelitian ini menggunakan bahan utama daun pohon suren yang telah dikeringkan, dan dihaluskan sebanyak 5 kg. Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari bahan teknis dan bahan pro analis (p.a). Bahan berkualitas

teknis didestilasi terlebih dahulu sebelum digunakan. Bahan kimia yang digunakan adalah metanol, heksan, diklorometan, etil asetat, aseton, kloroform p.a, KI p.a, HgCl pekat, HCl pekat, serbuk Mg, CH₃COOH glasial, H₂SO₄ pekat, FeCl₃ p.a, NaOH p.a., aquades, *Silica gel 60 GF₂₅₄ for TLC*, *Silica gel 60 230-400 mesh for CC*, metanol terdeterasi untuk analisis NMR, metanol p.a. dan NaOH juga digunakan untuk analisis UV.

3.3 Bagan Alir Penelitian

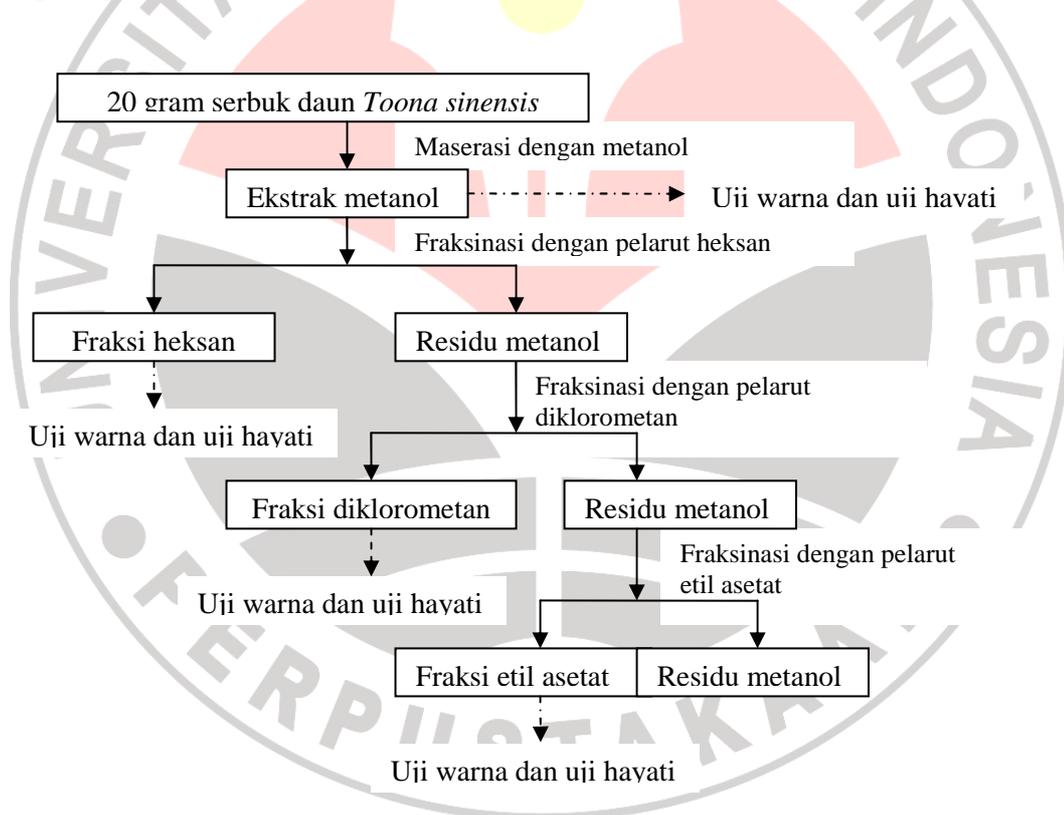
Pelaksanaan penelitian isolasi senyawa aktif daun suren (*Toona sinensis* Roem.) fraksi heksan berpotensi sebagai biopestisida terhadap lalat buah (*Bactrocera Dorsalis* Hend.) dibagi menjadi beberapa tahap. Tahapan tersebut meliputi pengumpulan bahan, maserasi, uji pendahuluan, pemisahan, pemurnian senyawa dan uji aktivitas biopestisida. Secara umum tahapan tersebut disajikan pada gambar 3.1.



Gambar 3.1 Bagan alir penelitian secara umum

3.3.1. Uji Pendahuluan

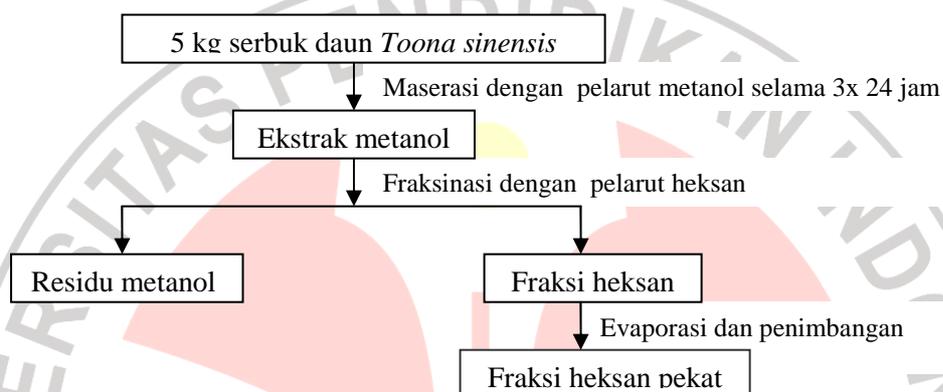
Uji Pendahuluan yang dilakukan terdiri dari uji warna dan uji hayati. Uji hayati menunjukkan keaktifan ekstrak daun *Toona sinensis* sebagai biopestisida terhadap *Bactrocera dorsalis* lalu fraksi aktif tersebut yang selanjutnya dipilih untuk dilakukan pemisahan dan pemurnian agar diperoleh senyawa mayor. Uji warna dilakukan untuk mengetahui golongan senyawa metabolit sekunder apa yang terkandung dalam suatu ekstrak. Tahapan uji pendahuluan yang dilakukan seperti pada gambar 3.2 berikut.



Gambar 3.2 Bagan alir uji pendahuluan

3.3. 2. Maserasi dan Fraksinasi

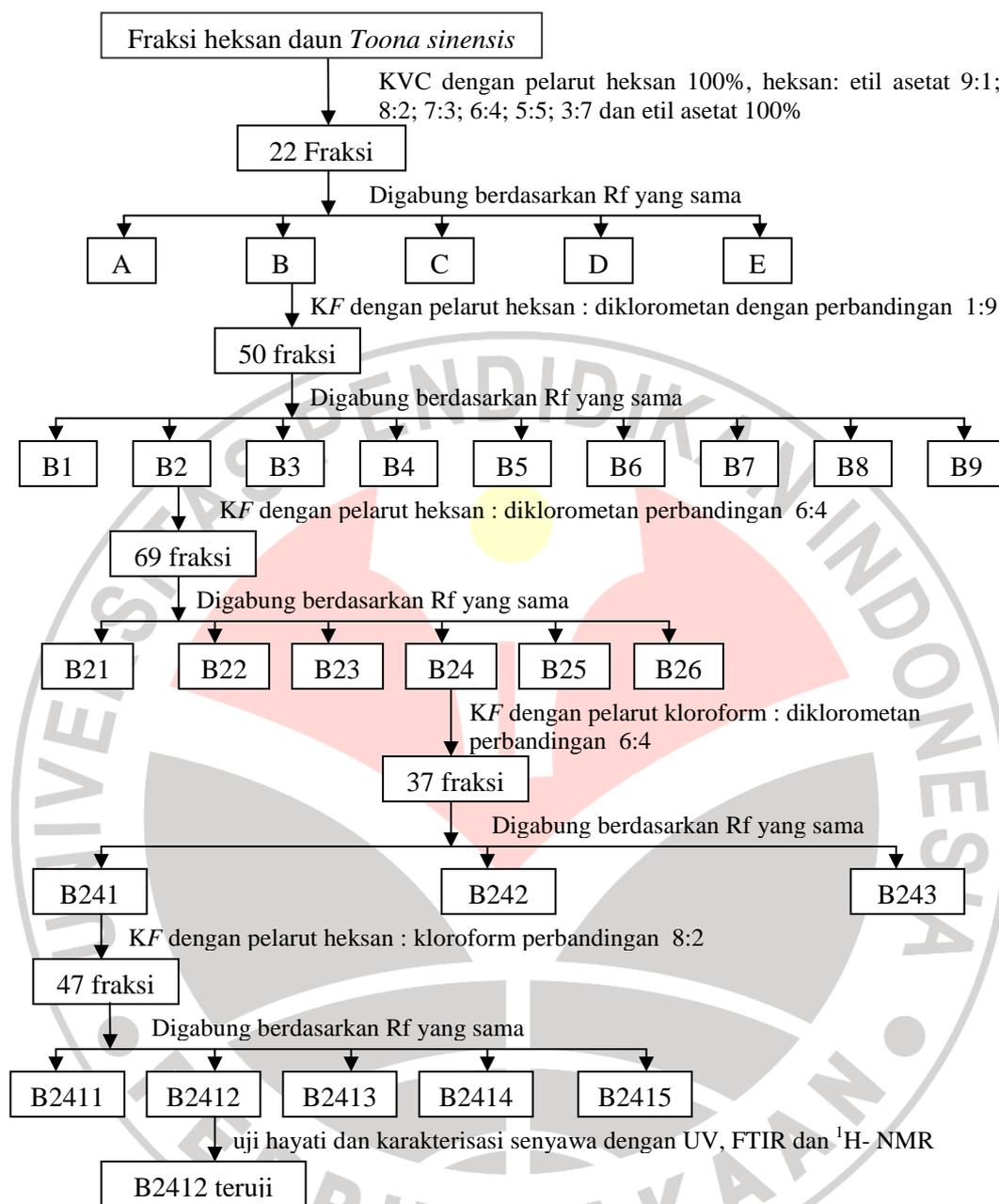
Ekstraksi daun *Toona sinensis* dilakukan dengan cara maserasi lalu difraksinasi menggunakan heksan dengan tahapan kerja seperti pada gambar 3.3 berikut.



Gambar 3.3 Bagan alir proses ekstraksi dan fraksinasi

3.3. 3. Pemisahan, Pemurnian Karakterisasi senyawa, dan Uji hayati

Fraksi heksan dipisahkan dengan KVC atau KF, setelah didapatkan senyawa yang murni lalu dilakukan karakterisasi dan diuji hayati. Karakterisasi senyawa dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-VIS, FTIR, dan ^1H NMR.



Gambar 3.4 Bagan alir proses pemisahan, pemurnian, dan karakterisasi

3.4 Cara Kerja

3.4.1. Penyiapan Sampel

Tahap awal penelitian ini dimulai dengan pengambilan sampel daun pohon suren (*Toona sinensis* Roem.) dari daerah Garut. Sampel daun yang digunakan di

petik dari pohon lalu dikeringkan dengan cara diangin-anginkan di suatu ruangan yang tidak terkena sinar matahari. Sampel yang telah kering kemudian dihaluskan dengan mesin penggiling hingga menjadi serbuk.

3.4. 2. Uji Pendahuluan

Uji pendahuluan dilakukan untuk mengetahui golongan senyawa metabolit sekunder yang terkandung di dalam ekstrak metanol, fraksi heksan, fraksi diklorometan dan fraksi etil asetat daun pohon suren (*Toona sinensis* Roem.) serta aktivitas hayati dari masing-masing fraksi. Uji pendahuluan yang dilakukan terdiri dari uji warna dan uji hayati. Uji warna yang dilakukan meliputi:

1. Pemeriksaan Alkaloid

Pemeriksaan alkaloid dilakukan dengan cara, ekstrak kental dari masing-masing fraksi sebanyak 1 mL ditambahkan 5 tetes kloroform dan beberapa pereaksi Meyer. Terbentuknya endapan putih menunjukkan adanya senyawa alkaloid.

Pembuatan pereaksi Meyer yaitu satu gram KI dilarutkan dalam 20 mL aquades. Larutan KI tersebut dimasukkan 0,271 gram HgCl_2 hingga larut.

2. Pemeriksaan Flavonoid

Pemeriksaan flavonoid dilakukan dengan cara, ekstrak kental dari masing-masing fraksi sebanyak 1 mL ditambahkan 1 gram serbuk Mg dan 10 mL HCl pekat. Warna kuning yang terbentuk menunjukkan adanya senyawa flavonoid.

3. Pemeriksaan Terpenoid dan Steroid

Pemeriksaan terpenoid dan steroid dilakukan dengan cara, ekstrak kental dari masing-masing fraksi sebanyak 1 mL ditambahkan 1 mL CH_3COOH glasial dan 1 mL H_2SO_4 pekat. Warna merah yang terbentuk menunjukkan adanya senyawa terpenoid sedangkan warna biru atau ungu menunjukkan adanya senyawa steroid.

4. Pemeriksaan Tanin

Pemeriksaan tanin dilakukan dengan cara, ekstrak kental dari masing-masing fraksi sebanyak 1 mL ditambahkan beberapa tetes FeCl_3 1%. Warna biru tua yang timbul menunjukkan adanya senyawa tanin (fenolik).

5. Pemeriksaan Kuinon

Pemeriksaan kuinon dilakukan dengan cara, ekstrak kental dari masing-masing fraksi sebanyak 1 mL ditambahkan beberapa tetes NaOH 0,1 N. Timbulnya warna menunjukkan adanya senyawa kuinon.

6. Pemeriksaan Antosianin

Pemeriksaan antosianin dilakukan dengan cara, ekstrak kental dari masing-masing fraksi sebanyak 1 mL ditambahkan beberapa tetes HCl 0,1 N. Timbulnya warna menunjukkan adanya senyawa antosianin

3.4. 3. Maserasi dan Fraksinasi

Daun suren berupa serbuk sebanyak 5,2 kg diekstrak dengan menggunakan pelarut metanol. Teknik ekstraksi yang dilakukan adalah ekstraksi cair-padat dengan metode maserasi. Sampel direndam dengan metanol 3 x 24 jam sebanyak masing-masing 10 L. Ekstrak disaring lalu dipekatkan dengan *Rotary*

evaporator vacuum sampai didapatkan ekstrak pekat berwarna hijau. Terhadap ekstrak pekat dilakukan pemisahan klorofil dengan cara mencampur ekstrak pekat tersebut dengan air lalu disaring, filtrat ekstrak yang diperoleh berwarna coklat tua kemudian ditimbang.

Ekstrak metanol yang telah pekat difraksinasi menggunakan pelarut heksan, diklorometan dan etil asetat. Setiap fraksi yang diperoleh dilakukan uji hayati.

3.4. 4. Pemisahan dan Pemurnian Senyawa

Pemisahan dan pemurnian senyawa dalam penelitian ini dilakukan melalui dua tahap yaitu kromatografi cair vakum dan kromatografi *flash*. Tetapi sebelum dilakukan proses tersebut, terlebih dahulu dilakukan kromatografi lapis tipis untuk mencari eluen yang cocok.

Kromatografi Lapis Tipis

- a. Lempeng tipis dengan adsorben silika gel (KLT GF254) disiapkan dengan ukuran panjang 5 cm dan lebar yang disesuaikan dengan jumlah fraksi yang akan ditotolkan.
- b. Pada bagian atas dan bawah diberi garis batas dengan jarak 0,5 cm dari ujung tepi lempeng tipis dengan menggunakan pensil. Garis tersebut merupakan garis atas dan garis bawah.
- c. Sampel yang akan dianalisa ditotolkan dengan pipa kapiler tepat pada garis batas bagian bawah.

- d. *Chamber* kemudian diisi dengan eluen yang akan digunakan untuk mengelusi lempeng tipis kemudian dibiarkan beberapa saat dengan kondisi tertutup hingga *chamber* tersebut jenuh dengan uap eluen.
- e. Lempeng tipis yang telah disiapkan sebelumnya kemudian dimasukkan ke dalam *chamber* hingga bagian bawahnya tercelup ke dalam eluen. Lempeng tipis diletakkan tegak bersandar pada dinding *chamber*.
- f. Eluen dibiarkan naik hingga mencapai garis batas bagian atas. Lempeng diangkat dengan menggunakan pinset lalu dibiarkan kering di udara terbuka. Noda pada lempeng tipis dilihat dibawah sinar UV, dan apabila tidak terlihat maka dilakukan penyemprotan dengan asam sulfat 5%.

Kromatografi Cair Vakum (KCV)

Ekstrak heksan daun tanaman suren yang telah diperoleh dilakukan KLT dengan eluen heksan: etil asetat dengan beberapa perbandingan yaitu 9:1; 8:2; 7:3; 6:4; 5:5; ; 4:6; 3:7; 2:8; 9:1. Terhadap ekstrak heksan yang telah ditentukan eluennya dari hasil KLT, kemudian dilakukan proses pemisahan dengan teknik KVC. Kolom yang digunakan memiliki diameter 7 cm dengan eluen heksan : etil asetat dengan beberapa perbandingan, mulai heksan 100% sebanyak 4 kali, 9:1 sebanyak 2 kali; 8:2 sebanyak 2 kali; 7:3 sebanyak 4 kali; 6:4 sebanyak 2 kali; 5:5 sebanyak 4 kali; 3:7 sebanyak 2 kali dan etil asetat 100% sebanyak 2 kali dengan volume 50 mL setiap kali elusi. Tahapan dari KCV adalah sebagai berikut:

- a. Silika dimasukkan ke dalam kolom di dalam lemari asam kemudian dihisap menggunakan vakum hingga padat sehingga kolom tidak berongga.

- b. Diatas permukaan silika dilapisi kertas saring, kemudian dielusi dengan menggunakan heksan 100% sebanyak 100 mL.
- c. Ekstrak heksan pekat sebanyak 2,006 gram diimpregnasi menggunakan pelarut aseton ke dalam silika impreg, dengan perbandingan sampel : silika yaitu 1 : 2. Silika yang digunakan untuk mengimpregnasi sampel berukuran 60-70 mesh.
- d. Kertas saring pada kolom diambil, lalu silika impreg dimasukkan ke dalam kolom dan kertas saring tadi diletakan diatas permukaannya.
- e. Sampel pada kolom dielusi dengan eluen yang telah ditentukan.
- f. Eluat ditampung dalam botol terpisah sesuai dengan volume eluen yang digunakan, kemudian diberi label.

Dari tahap ini diperoleh 22 fraksi yang kemudian digabung menjadi 5 fraksi (A - E) berdasarkan nilai Rf yang sama pada kromatogram KLT.

Kromatografi *Flash* (KF)

Setelah proses KVC, fraksi yang belum murni dilakukan pemisahan dengan menggunakan kromatografi *flash*. Fraksi yang dipilih untuk kromatografi *flash* merupakan fraksi mayor. Eluen yang digunakan pada kromatografi flash fraksi B ialah campuran pelarut heksan : diklorometan dengan perbandingan 9 : 1. Hasil kromatografi *flash* yang pertama menunjukkan belum murni sehingga dilakukan pemisahan kromatografi *flash* yang kedua pada fraksi B2 dengan eluen campuran pelarut heksan : diklorometan dengan perbandingan 6 : 4. Pemisahan selanjutnya dilakukan kromatografi *flash* yang ketiga pada fraksi B24

menggunakan eluen campuran pelarut kloroform : diklorometan dengan perbandingan 6 : 4 . Pemisahan dengan kromatografi *flash* yang ketiga menunjukkan bahwa fraksi menunjukkan masih belum murni maka dilakukan kromatografi *flash* yang keempat pada fraksi B241 dengan eluen campuran pelarut heksan : kloroform dengan perbandingan 8 : 2. Pada fraksi yang diduga telah murni kemudian dilakukan uji hayati. Langkah-langkah dari *KF* adalah sebagai berikut:

a. *Packing* kolom

- Silika dengan ukuran 230-400 mesh dimasukkan ke dalam kolom sampai setinggi 17 cm.
- Kolom yang siap dipakai bila terbentuk silika yang transparan / gel, dengan cara mengalirkan eluen.
- Kolom siap pakai dengan disisakan eluen setinggi ± 3 cm

b. Impregnasi sampel

- Silika impreg ditimbang sebanyak 2 kali berat sampel.
- Sampel dilarutkan dengan aseton.
- Sampel dalam pipet diteteskan ke silika impreg diaduk-aduk hingga kering.

c. Elusi

- Silika impreg dimasukkan ke dalam kolom dan diratakan.
- Eluen yang telah ditentukan sebelumnya dimasukkan ke dalam kolom.
- Kolom divakumkan lalu hasil elusi ditampung pada botol 10 mL.

- Elusi dihentikan apabila diperkirakan senyawa sudah terelusi oleh eluen.

d. Pembersihan kolom

- Kolom dikeringkan dari eluen.
- Silika di dalam kolom dibilas dengan metanol hingga warna metanol hasil bilasan menjadi tidak berwarna seperti semula, kemudian dibilas dengan etil asetat 100% sebanyak 100 mL dan dilanjutkan heksan 100% sebanyak 100 mL sampai warna kolom seperti semula.

3.4.5. Identifikasi Golongan Senyawa Murni

Senyawa murni yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan berbagai metode spektroskopi yaitu UV, FTIR dan $^1\text{H-NMR}$.

Pemeriksaan UV

Pemeriksaan UV dilakukan untuk mendapatkan informasi adanya gugus kromofor dan mengetahui jenis transisi elektron. Penentuan struktur dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV jenis Camspec M-330. Pengukuran dilakukan pada panjang gelombang 190-400 nm. Pemeriksaan UV diukur dengan melarutkan sejumlah sampel menggunakan pelarut metanol. Pemeriksaan sampel dilakukan setelah mengukur blanko.

Pemeriksaan IR

Pemeriksaan IR dilakukan untuk mengetahui gugus-gugus fungsi yang terdapat dalam fraksi heksan daun *Toona sinensis*. Penentuan struktur dilakukan dengan menggunakan spektrometri inframerah jenis Shimadzu FTIR-8400.

Pemeriksaan ^1H NMR

Pemeriksaan ^1H NMR dilakukan untuk mengetahui gambaran berbagai jenis atom hidrogen dalam molekul yang terdapat dalam fraksi heksan. Spektrum ^1H -NMR dapat memberikan informasi mengenai lingkungan kimia atom hidrogen, jumlah atom hidrogen dalam setiap lingkungan, dan struktur gugusan yang berdekatan dengan setiap atom hidrogen

3.4. 6. Uji Hayati

Uji hayati dilakukan terhadap imago lalat buah *Bactrocera dorsalis*. Sampel yang diuji berupa ekstrak metanol dan hasil fraksinasi, serta senyawa hasil pemurnian daun suren (*Toona sinensis*). Pengujian dilakukan terhadap *Bactrocera dorsalis* dengan metode penyemprotan serangga uji. Penyempotan yang ditempatkan pada kandang berukuran 20 x 20 cm. Pengamatan dilakukan selama 24 jam terhadap mortalitas serangga uji, yaitu setiap jam ke 1, 6, 12, 18, 24, 30, 36 dan 48. Persentase data mortalitas terkoreksi dihitung menurut rumus Abbot (Nina, 2005) dapat dihitung dengan rumus berikut:

$$P = \frac{P_o - P_c}{100 - P_c} \times 100 \%$$

Keterangan: P = Persentase kematian serangga uji setelah dikoreksi
 P_o = Persentase banyaknya serangga yang mati pada perlakuan
 P_c = Persentase banyaknya serangga yang mati pada kontrol