

## BAB III

### METODOLOGI PENELITIAN

#### 3.1 Objek dan Lokasi Penelitian

Objek penelitian ini adalah bagian daun tumbuhan suren (*Toona sinensis* Roem.). Determinasi tumbuhan ini dilakukan di Laboratorium Struktur Tumbuhan Jurusan Pendidikan Biologi FPMIPA Universitas Pendidikan Indonesia.

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Riset serta Laboratorium Kimia Instrumen Jurusan Pendidikan Kimia FPMIPA Universitas Pendidikan Indonesia.

#### 3.2 Alat dan Bahan

##### 3.2.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini terdiri dari alat gelas standar kimia organik, set alat destilasi bertingkat, *vacuum rotary evaporator*, pompa vakum, plat kromatografi lempang tipis (KLT), set alat kromatografi cair vakum (KCV), set alat kromatografi *flash*, UV box, spektrofotometer UV-Vis 1240 merk *Shimadzu*, spektrofotometer FTIR 8400 merk *Shimadzu*, spektrometer <sup>1</sup>H-NMR merk JASCO (Delta2\_NMR 500 MHz), dan set alat uji hayati yaitu hand sprayer volume 10 mL dan kandang berukuran 20x20 cm.

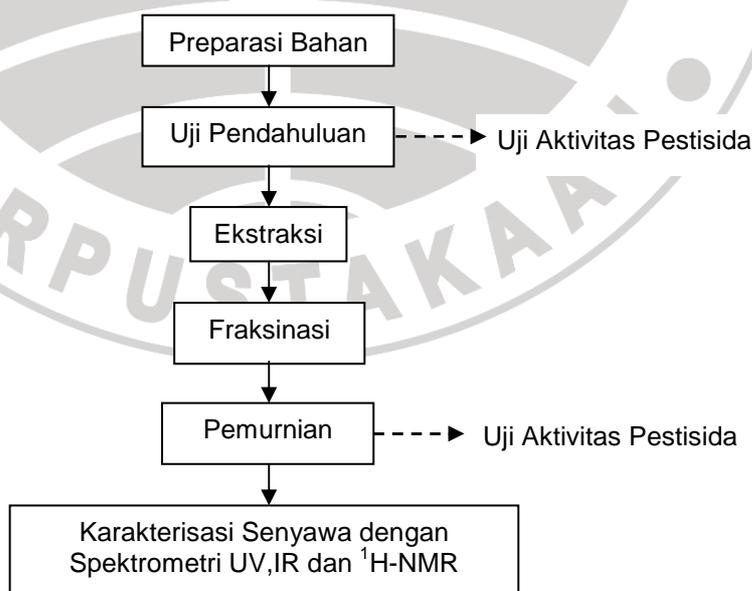
##### 3.2.2 Bahan

Bahan utama yang digunakan pada penelitian ini adalah daun tumbuhan suren (*Toona sinensis* Roem.) sebanyak 5 kg. Preparasi daun suren meliputi pembersihan, pengeringan, dan penggilingan.

Bahan kimia yang digunakan terbagi atas tiga kelompok. Bahan kimia pertama yang digunakan untuk mengisolasi senyawa mayor yaitu metanol, heksan, diklorometan, etil asetat, aseton, etanol p.a., kloroform p.a., KI, HgCl, HCl, serbuk Mg, CH<sub>3</sub>COOH glasial, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, FeCl<sub>3</sub> p.a., NaOH p.a., aquades, Silica gel Merck 60 GF<sub>254</sub> for TLC, Silica gel 60 230-400 mesh for CC. Bahan kedua untuk uji aktivitas pestisida yaitu deterjen (emulsifier). Bahan kimia yang ketiga yang digunakan untuk determinasi/penentuan struktur senyawa mayor yaitu metanol terdeterisasi (CD<sub>3</sub>OD).

### 3.3 Bagan Alir Penelitian

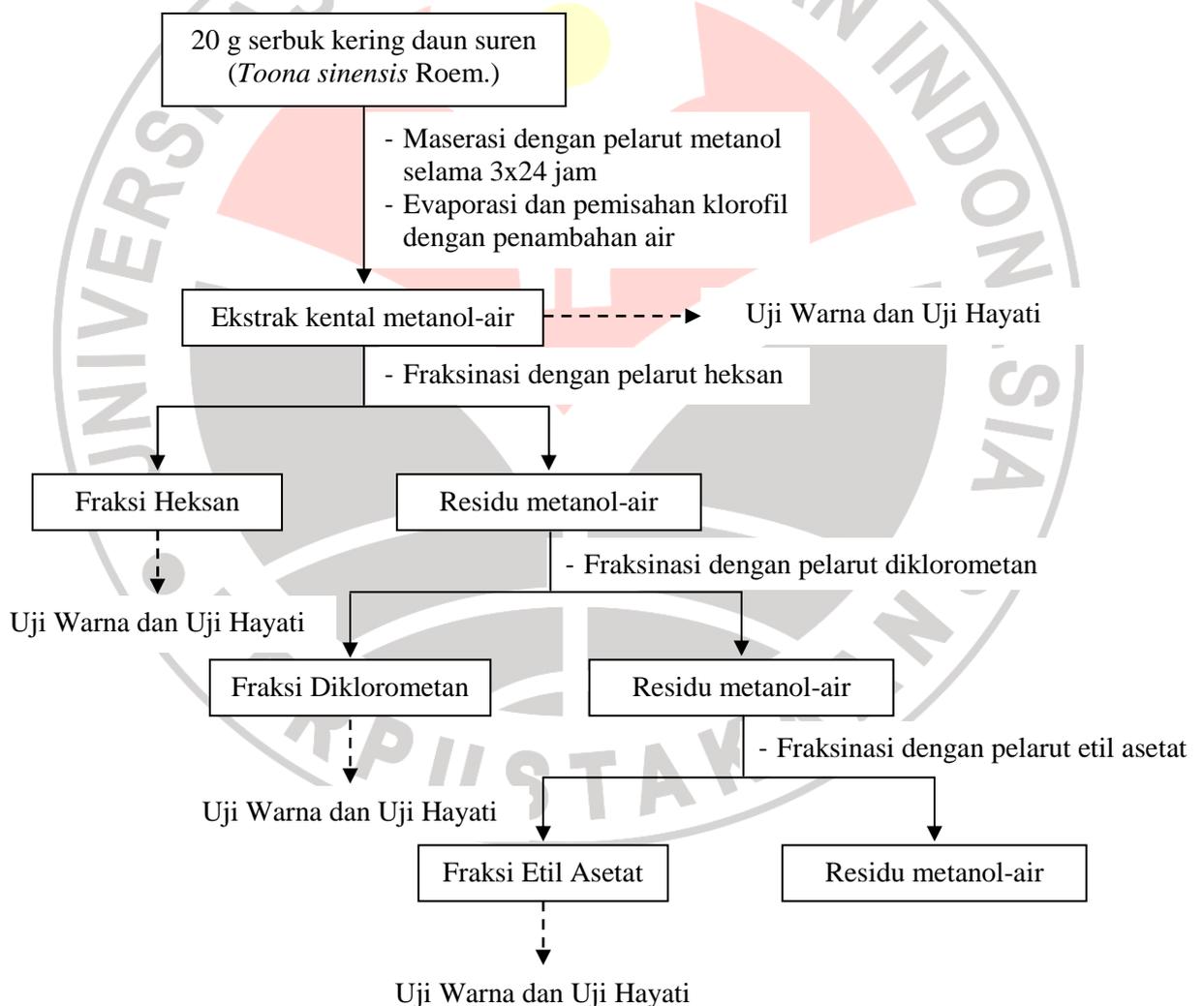
Isolasi senyawa metabolit sekunder fraksi etil asetat daun tumbuhan suren (*Toona sinensis* Roem.) dan uji aktivitas pestisidanya terhadap hewan uji lalat buah (*Bactrocera dorsalis* Hend.) dilakukan melalui beberapa tahap. Secara garis besar, tahapan tersebut diperlihatkan oleh gambar berikut.



**Gambar 3.1** Bagan Alir Penelitian Secara Umum

### 3.3.1 Uji Pendahuluan

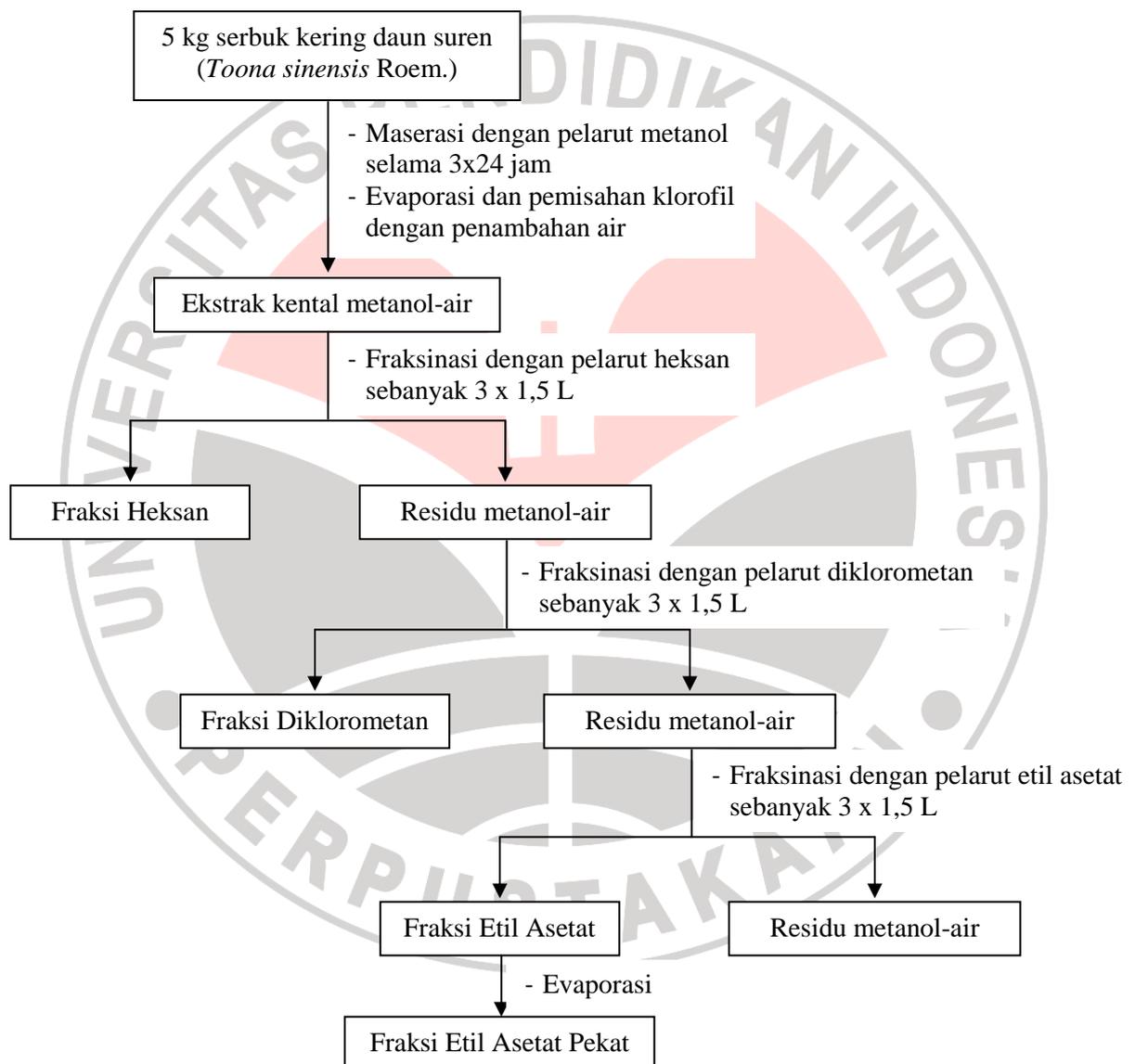
Uji pendahuluan dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui golongan senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak metanol-air, fraksi heksan, fraksi diklorometan, dan fraksi etil asetat daun tumbuhan suren (*Toona sinensis* Roem.), serta aktivitas pestisida dari masing-masing fraksi terhadap hewan uji lalat buah (*Bactrocera dorsalis* Hend.).



**Gambar 3.2** Bagan Alir Uji Pendahuluan

### 3.3.2 Ekstraksi

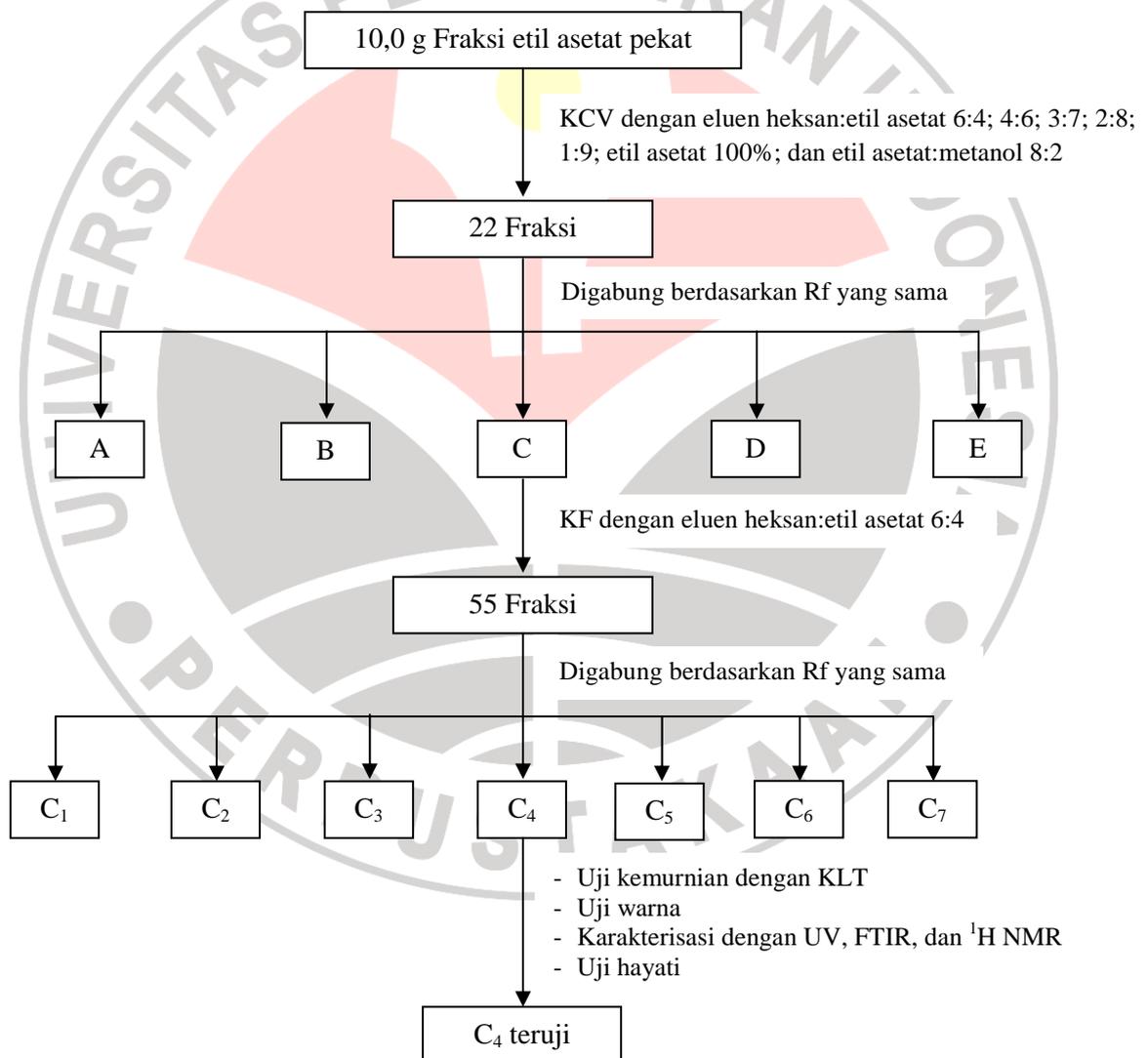
Tahapan ekstraksi bertujuan untuk melarutkan semua senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam daun tumbuhan suren. Bagan alir proses ekstraksi ditunjukkan pada gambar 3.3.



**Gambar 3.3** Bagan Alir Proses Ekstraksi

### 3.3.3 Pemurnian, Karakterisasi Senyawa, dan Uji Aktivitas Pestisida

Fraksi etil asetat yang telah dipekatkan dengan cara evaporasi selanjutnya dimurnikan dengan kromatografi cair vakum (KCV) dan kromatografi *flash*, kemudian dilakukan analisis kemurnian dengan KLT, karakterisasi senyawa dengan spektrometri UV, IR, dan  $^1\text{H-NMR}$  serta uji aktivitas pestisida senyawa murni. Bagan alir proses pemurnian ditunjukkan pada gambar 3.4.



**Gambar 3.4** Bagan Alir Proses Pemurnian Fraksi Etil Asetat

### 3.4 Cara Kerja

#### 3.4.1 Preparasi Sampel

Sampel yang berupa daun tumbuhan suren (*Toona sinensis* Roem.) diperoleh dari daerah Garut, Jawa Barat. Setelah itu, dilakukan determinasi untuk menentukan spesies di Jurusan Pendidikan Biologi FPMIPA UPI.

Sebelum digunakan dalam penelitian, daun suren tersebut dipisahkan terlebih dahulu dari rantingnya. Setelah itu dilakukan pengeringan dengan cara diangin-anginkan selama beberapa minggu dan kemudian dihaluskan dengan mesin penggiling sampai berbentuk serbuk. Proses penggilingan ini dilakukan di Balai Besar Pulp dan Kertas Bandung.

#### 3.4.2 Uji Pendahuluan

Uji pendahuluan dimaksudkan untuk mengetahui golongan senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak metanol-air serta fraksi heksan, diklorometan, dan etil asetat. Uji pendahuluan ini meliputi uji warna dan uji hayati.

Sampel daun suren berupa serbuk ditimbang sebanyak 20 gram dan kemudian dilakukan maserasi dengan pelarut metanol selama 3 x 24 jam @ 100 mL. Ekstrak hasil maserasi kemudian dievaporasi dan dilakukan pemisahan dari klorofil dengan penambahan air. Ekstrak metanol-air tersebut kemudian difraksinasi berturut-turut dengan pelarut heksan, diklorometan, dan etil asetat. Setelah itu, terhadap masing-masing fraksi sampel dilakukan uji warna. Menurut Lenny

(2006), uji warna untuk setiap golongan senyawa metabolit sekunder adalah sebagai berikut.

#### 1. Pemeriksaan Alkaloid

Senyawa alkaloid dalam sampel dapat diketahui keberadaannya dengan cara menambahkan lima tetes kloroform dan beberapa tetes pereaksi Mayer ke dalam 1 mL ekstrak kental dari masing-masing fraksi. Terbentuknya endapan putih menunjukkan adanya alkaloid. Pereaksi Mayer terbuat dari satu gram KI yang dilarutkan dalam 20 mL aquades. Kemudian ke dalam larutan KI tersebut ditambahkan 0,271 gram  $\text{HgCl}_2$  sampai larut.

#### 2. Pemeriksaan Flavonoid

Pemeriksaan senyawa flavonoid dilakukan dengan cara menambahkan satu gram serbuk Mg dan 10 mL HCl pekat ke dalam 1 mL ekstrak kental dari masing-masing fraksi. Perubahan warna larutan menjadi kuning menandakan adanya senyawa flavonoid.

#### 3. Pemeriksaan Terpenoid dan Steroid

Pemeriksaan senyawa terpenoid dan steroid dilakukan dengan cara menambahkan 1 mL  $\text{CH}_3\text{COOH}$  glasial dan 1 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat ke dalam 1 mL ekstrak kental dari masing-masing fraksi. Jika warna berubah menjadi biru/ungu menandakan adanya senyawa steroid. Sedangkan jika warna berubah menjadi merah menandakan adanya senyawa terpenoid.

#### 4. Pemeriksaan Senyawa Tanin

Pemeriksaan senyawa tannin dilakukan dengan cara menambahkan beberapa tetes  $\text{FeCl}_3$  1% ke dalam 1 mL ekstrak kental dari masing-masing fraksi. Perubahan warna menjadi biru tua menunjukkan adanya senyawa fenolik.

#### 5. Pemeriksaan Kuinon

Pemeriksaan senyawa kuinon dilakukan dengan cara menambahkan beberapa tetes NaOH 0,1 N ke dalam 1 mL ekstrak kental dari masing-masing fraksi. Perubahan warna menjadi merah menunjukkan adanya senyawa kuinon.

#### 6. Pemeriksaan Antosianin

Pemeriksaan senyawa antosianin dilakukan dengan cara menambahkan beberapa tetes HCl 0,1 N ke dalam 1 mL ekstrak kental dari masing-masing fraksi. Perubahan warna menjadi merah menunjukkan adanya senyawa antosianin.

### 3.4.3 Proses Ekstraksi

Sebanyak 5 kg daun suren hasil preparasi yang telah berbentuk serbuk diekstraksi dengan pelarut metanol. Teknik ekstraksi yang digunakan adalah ekstraksi padat-cair dengan metode maserasi. Sampel direndam dalam 42 liter pelarut metanol selama 3 x 24 jam. Ekstrak hasil maserasi kemudian dievaporasi dan dipisahkan dari klorofil dengan penambahan air. Ekstrak pekat metanol-air yang diperoleh berjumlah 1.500 mL. Sebanyak 5 mL ekstrak diambil sebagai cuplikan untuk diketahui massa keringnya. Data ini kemudian digunakan untuk mengkonversi volum total ekstrak pekat metanol-air sebagai massa total.

Ekstrak metanol-air kemudian difraksinasi berturut-turut dengan pelarut heksan, diklorometan, dan etil asetat. Fraksi etil asetat yang diperoleh kemudian dipekatkan menggunakan *rotary evaporator*. Fraksi etil asetat yang telah pekat diambil sebanyak 1 mL sebagai cuplikan untuk diketahui massa keringnya. Data yang diperoleh digunakan untuk mengkonversi volum total fraksi etil asetat pekat sebagai massa total.

#### **3.4.4 Pemisahan dan Pemurnian Senyawa**

Proses pemisahan dan pemurnian senyawa dilakukan dengan dua tahapan yaitu kromatografi cair vakum (KCV) dan kromatografi *flash* (KF). Tetapi sebelum kedua tahapan tersebut dilakukan, terlebih dahulu dilakukan kromatografi lempeng tipis (KLT) untuk mengetahui eluen yang cocok untuk digunakan dalam kedua tahapan tersebut.

##### **3.4.4.1 Kromatografi Lempeng Tipis (KLT)**

Proses ini penting dilakukan selain untuk menentukan eluen yang cocok digunakan dalam KCV maupun KF, tapi juga untuk menentukan keberhasilan pemisahan dan pemurnian yang telah dilakukan. Tahapan dari KLT adalah sebagai berikut.

- a. Lempeng tipis dengan adsorben *silica gel* (KLT GF<sub>254</sub>) disiapkan dengan ukuran panjang 5 cm dan lebar yang disesuaikan dengan jumlah fraksi yang akan ditotolkan.
- b. Pada bagian ujung atas dan bawah diberi garis batas dengan jarak 0,5 cm dari ujung tepi lempeng tipis.
- c. Noda yang akan dianalisis ditotolkan pada garis batas bawah menggunakan pipa kapiler.
- d. Chamber diisi dengan eluen yang akan digunakan untuk mengelusi senyawa yang dianalisis, kemudian dидiamkan beberapa saat dengan kondisi tertutup agar ruangan chamber jenuh dengan uap eluen.
- e. Lempeng tipis yang telah disiapkan sebelumnya dimasukkan ke dalam chamber hingga bagian bawahnya tercelup dalam eluen. Lempeng tipis diletakkan tegak bersandar pada dinding chamber. Noda yang telah ditotolkan tidak boleh sampai tercelup dalam eluen.
- f. Proses elusi dihentikan pada saat eluen mencapai garis batas atas. Lempeng tipis kemudian dikeluarkan dari chamber dan dibiarkan kering di udara terbuka. Noda pada lempeng diamati di bawah cahaya ultra violet.

#### **3.4.4.2 Kromatografi Cair Vakum (KCV)**

Terhadap fraksi etil asetat pekat dilakukan KLT menggunakan eluen heksan : etil asetat dengan perbandingan 1 : 9, 2 : 8, 3 : 7, 4 : 6, 5 : 5, 6 : 4, 7 : 3, 8 : 2, dan 9 : 1. Berdasarkan kromatogram hasil KLT tersebut, eluen yang digunakan untuk memisahkan senyawa dalam fraksi ini dengan teknik KCV

adalah heksan : etil asetat dengan perbandingan 6 : 4 sebanyak 2 kali @ 50 mL, 4 : 6 sebanyak 4 kali @ 50 mL, 3 : 7 sebanyak 4 kali @ 50 mL, 2 : 8 sebanyak 4 kali @ 50 mL, 1 : 9 sebanyak 4 kali @ 50 mL, etil asetat 100% sebanyak 2 kali @ 50 mL, dan etil asetat : metanol dengan perbandingan 8 : 2 sebanyak 2 kali @ 50 mL. Pemisahan senyawa dalam fraksi etil asetat dengan teknik KCV dilakukan dalam tahapan berikut.

- a. Silika untuk KCV dimasukkan ke dalam kolom lalu dihisap dengan menggunakan pompa vakum hingga padat. Agar lebih padat dan tidak ada rongga pada kolom, dilakukan penekanan dari bagian atas dengan botol beralas rata.
- b. Permukaan atas silika pada kolom ditutup dengan kertas saring dan kemudian kolom dielusi terlebih dahulu dengan pelarut nonpolar (heksan).
- c. Fraksi etil asetat pekat ditimbang sebanyak 10, 011 gram dan diimpregnasi dengan pelarut aseton ke dalam silika gel impreg, dengan perbandingan sampel : silika = 1 : 2.
- d. Setelah yakin kolom telah terkemas dengan baik, proses elusi dimulai dengan terlebih dahulu mengambil kertas saring pada kolom. Setelah itu, sampel yang telah diimpregnasi dimasukkan ke dalam kolom dan ditutup kembali dengan kertas saring tadi. Selanjutnya sampel dielusi dengan eluen yang telah ditentukan sebelumnya.
- e. Eluat ditampung di dalam botol terpisah sesuai dengan urutan eluen yang dimasukkan ke dalam kolom.

### 3.4.4.3 Kromatografi *Flash* (KF)

Setelah dilakukan KCV terhadap fraksi etil asetat pekat, hasil pemisahan yang masih belum murni dipisahkan kembali dengan kromatografi *flash*. Fraksi yang dipilih untuk dimurnikan adalah fraksi C yang menunjukkan noda mayor pada hasil analisis KLT.

Eluen yang digunakan untuk KF adalah heksan : etil asetat dengan perbandingan 6 : 4 berdasarkan hasil analisis KLT yang memberikan nilai  $R_f \pm 0,3$ . Menurut Azhar (2008), tahapan dalam pengerjaan KF adalah sebagai berikut.

1. Packing kolom

Silika dengan ukuran 230-400 mesh dimasukkan ke dalam kolom sampai setinggi 16-17 cm. Kolom siap dipakai bila sudah terbentuk silika yang transparan (seperti gel), caranya yaitu dengan mengalirkan eluen yang nonpolar (heksan) terlebih dahulu.

2. Impregnasi sampel

Silika untuk impregnasi sampel ditimbang sebanyak 2 kali berat sampel. Sampel dilarutkan dalam aseton, diteteskan pada silika impreg, dan dibiarkan hingga silika mengering kembali.

3. Proses elusi

Sampel yang telah diimpregnasi dimasukkan ke dalam kolom. Eluen yang telah ditentukan sebelumnya dimasukkan ke dalam kolom sampai hampir penuh. Kolom diberi tekanan dengan pompa pada bagian atasnya, kemudian dilakukan penampungan terhadap hasil elusi dalam botol setiap 10 mL. Elusi dihentikan apabila diperkirakan senyawa telah terelusi oleh eluen.

#### 4. Pembersihan kolom

Silika yang telah digunakan, dibilas dengan metanol 100% sampai warna kolom seperti semula, kemudian dilanjutkan dengan etil asetat 100%, dan terakhir dengan heksan 100%. Kolom siap digunakan kembali untuk pemisahan sampel berikutnya.

#### 3.4.5 Karakterisasi Senyawa Murni

Terhadap senyawa murni yang telah berhasil diisolasi, dilakukan penentuan struktur dengan spektrometri UV, infra merah (IR), dan  $^1\text{H-NMR}$ .

##### **Spektrometri UV**

Metode ini digunakan untuk mengetahui adanya gugus kromofor dan jenis transisi elektron. Penentuan struktur dilakukan dengan spektrofotometer UV jenis Camspec M-330. Pengukuran dilakukan pada panjang gelombang 190-400 nm. Pengukuran dilakukan dengan melarutkan sejumlah sampel dalam metanol.

##### **Spektrometri IR**

Metode ini digunakan untuk mengetahui gugus-gugus fungsi yang terdapat dalam senyawa murni yang berhasil diisolasi. Penentuan struktur dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer IR jenis Shimadzu FTIR-8400.

##### **Spektrometri $^1\text{H-NMR}$**

Metode ini digunakan untuk mengetahui jenis-jenis atom hidrogen dalam molekul. Spektrum  $^1\text{H-NMR}$  dapat memberikan informasi mengenai lingkungan kimia atom hidrogen, jumlah atom hidrogen dalam setiap lingkungan, dan struktur gugusan yang berdekatan dengan setiap atom hidrogen (Creswell et al, 1982).

Analisis struktur dengan metode ini dilakukan di Pusat Penelitian Kimia LIPI Serpong Tangerang.

### 3.4.6 Uji Hayati

Uji hayati pada penelitian ini merupakan uji aktivitas pestisida. Uji dilakukan terhadap imago lalat buah *Bactrocera dorsalis* Hend. Sampel yang diujikan yaitu ekstrak metanol awal, hasil fraksinasi awal, dan senyawa hasil pemurnian dengan KCV dan KF.

Secara umum uji aktivitas pestisida ini dilakukan dengan menyiapkan kandang berukuran 20 x 20 cm yang ditutup kasa. Setiap kandang diisi dengan 15 ekor hewan uji kemudian dilakukan pengujian dengan menyemprotkan ekstrak yang telah disiapkan sebelumnya dengan konsentrasi yang telah ditentukan dengan menggunakan penyemprot hand sprayer berukuran 10 mL, sedangkan konsentrasi 0% digunakan sebagai kontrol. Parameter yang diamati adalah kematian hewan uji secara kumulatif pada rentang konsentrasi yang diujicobakan. Mortalitas hewan uji diamati dan dicatat pada 1 jam pertama setelah aplikasi, selanjutnya setiap 3 jam hingga 48 jam setelah aplikasi. Persentase kematian serangga uji dapat ditentukan berdasarkan data mortalitas yang diperoleh melalui persamaan:

$$P = \frac{a}{a + b} \times 100 \%$$

Dimana: P = persentase kematian hewan uji

a = jumlah hewan uji yang mati secara kumulatif

b = jumlah hewan uji yang masih hidup

Data mortalitas terkoreksi dihitung menurut persamaan Abbot (Mulyaningsih, 2005), yaitu:

$$P = \frac{Po - Pc}{100 - Pc} \times 100 \%$$

Dimana: P = persentase kematian hewan uji terkoreksi

Po = persentase banyaknya hewan uji yang mati pada perlakuan

Pc = persentase banyaknya hewan uji yang mati pada kontrol

