BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Objek dan Lokasi Penelitian

Objek yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun *Artocarpus communis* (sukun) yang diperoleh dari Jawa Barat. Identifikasi dari sampel dilakukan dengan cara determinasi yang dilakukan di Laboratorium Fisiologi Tumbuhan Jurusan Biologi FPMIPA UPI.

Lokasi Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Riset dan Laboratorium Instrumen FPMIPA UPI.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

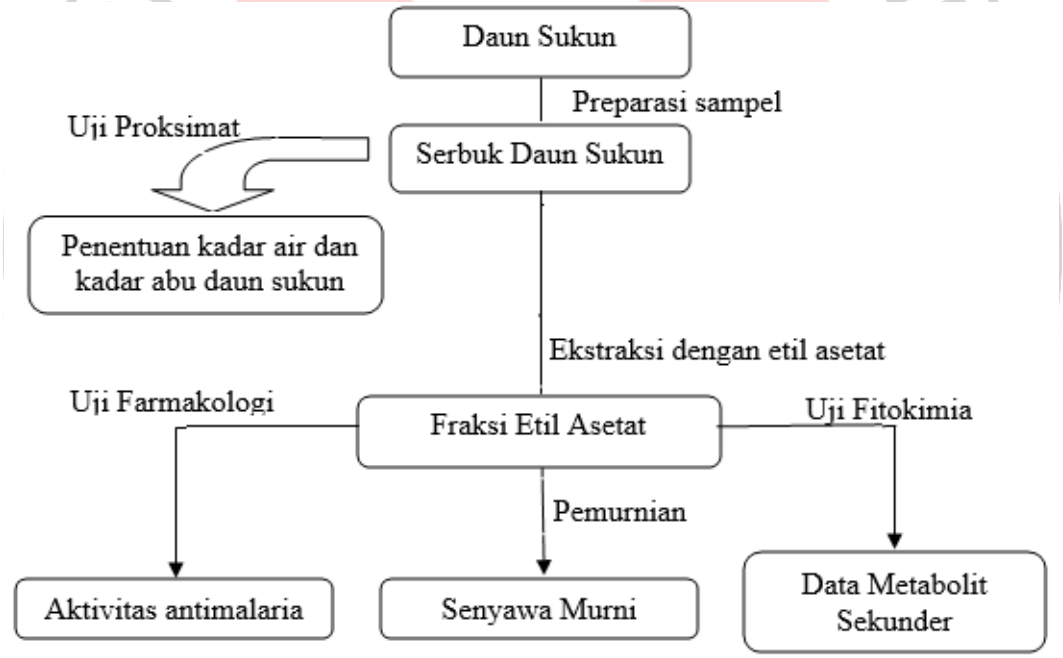
Isolasi dan pemurnian terhadap sampel daun menggunakan berbagai alat meliputi alat-alat gelas, perangkat alat destilasi, penguap vakum berputar (*vaccum rotary evaporator*), berbagai set alat kromatografi antara lain, , kolom kromatografi vakum cair, perangkat alat kromatotron, dan kolom kromatografi kolom gravitasi. Sedangkan alat instrumen yang digunakan untuk karakterisasi antara lain kromatografi lapis tipis dan spektrometer FTIR.

Adapun bahan utama yang digunakan pada penelitian ini adalah daun sukun yang dikeringkan secara angin dan dihaluskan. Sedangkan pelarut organik yang digunakan terdiri dari beragam pelarut teknis yang didestilasi dan pro analis (p.a). Untuk kepeluan kromatografi, digunakan berbagai silika gel, yaitu, silika gel

Merck 60 (70-230 mesh) *for chromatoghraphy column*, silika gel 60 (35-70 mesh), dan plat KLT kieselgel Merck 60 F_{254} dengan ketebalan 0,25mm..

3.3 Metodologi Penelitian

Pelaksanaan penelitian dilakukan dengan beberapa tahapan. Tahapan tersebut yaitu Fraksinasi dan isolasi senyawa murni, uji fitokimia, uji proksimat, uji farmakologi, dan karakterisasi senyawa murni. Diagram Alir penelitian yang dilakukan dapat dilihat pada Gambar 3.1



Gambar 3.1 Bagan Alir Penelitian

1. Penyiapan Sampel Tumbuhan

Tahap awal penelitian dimulai dari pengambilan sampel daun *Artocarpus communis* (sukun) yang berada di daerah Garut, Jawa Barat yang dilakukan pada

Agustus 2012. Daun sukun yang akan digunakan dibersihkan terlebih dahulu dari kotoran. Kemudian dikeringkan dengan bantuan sinar matahari sampai kering. Sampel yang telah kering kemudian dihaluskan dengan mesin penggiling sampai berbentuk serbuk. Kemudian serbuk daun sukun yang diperoleh ditimbang untuk mengetahui berat daun dalam kondisi yang telah dikeringkan.

2. Ekstraksi Bubuk Daun Sukun

Serbuk daun *Artocarpus communis* diekstraksi menggunakan pelarut metanol. Teknik ekstraksi yang digunakan ialah ekstraksi padat-cair dengan metode maserasi. Sampel direndam dalam pelarut metanol 20 liter selama 3 x 24 jam. Ekstrak hasil maserasi kemudian disaring. Filtrat dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* dalam keadaan vakum. Ekstrak pekat metanol diencerkan kembali dengan air hangat sebanyak 1000 mL. Kemudian disaring dengan corong *buchner*. Ekstrak metanol yang telah diencerkan kemudian difraksinasi dengan etil asetat sehingga diperoleh ekstrak etil asetat dan ekstrak metanol-air. Masing-masing ekstrak dipekatkan dengan *rotary evaporator* hingga diperoleh massa tetap dari masing-masing ekstrak.

3. Uji Proksimat

Uji proksimat dilakukan untuk mengetahui parameter simplisia. Adapun uji simplisia meliputi penentuan kadar air dan abu. Uji proksimat mengacu pada SNI 01-2891-1992 tentang Cara Uji Makanan dan Minuman. Prosedur kerja yang dilakukan ialah sebagai berikut :

1. Penentuan Kadar Air

   Penentuan kadar air dilakukan dengan cara menimbang 1-2 gram serbuk kacang pada botol timbang bertutup yang telah diketahui bobotnya. Kemudian dikeringkan pada oven suhu 105°C selama 3 jam, lalu didinginkan dalam eksikator. Setelah itu ditimbang sampai diperoleh bobot tetap.

2. Penentuan Kadar Abu Total

   Penentuan kadar abu total dilakukan dengan cara menimbang 3 gram serbuk kacang ke dalam cawan porselen yang telah diketahui bobotnya. Kemudian diarangkan di atas nyala pembakar dan diabukan dalam tanur listrik pada suhu maksimum 550°C sampai pengabuan sempurna. Setelah itu didinginkan dalam eksikator, lalu ditimbang sampai bobot tetap.

4. Uji Skrining Fitokimia

Untuk mengetahui karakterisasi dari senyawa yang terdapat dalam ekstrak etil asetat daun sukun maka dilakukan uji fitokimia. Pengujian ini dilakukan untuk mengetahui golongan senyawa yang terdapat dalam ekstrak tersebut. Ekstrak yang diperoleh diidentifikasi komponen fitokimianya dengan metode pereaksi warna. Senyawa yang diperiksa adalah senyawa golongan alkaloid, tanin, saponin, terpenoid, steroid, dan flavanoid. Prosedur kerja yang dilakukan ialah sebagai berikut :

a) Pemeriksaan Alkaloid

Pemeriksaan alkaloid dilakukan dengan cara menimbang 0,5 gram ekstrak 1 mL kloroform dan beberapa tetes Pereaksi Mayer. Terbentuknya endapan putih menunjukkan adanya alkaloid. Pembuatan Pereaksi Mayer yaitu 1 gram KI dilarutkan dalam 20 mL aquades sampai semuanya melarut. Lalu ke dalam larutan KI tersebut dimasukkan 0,271 gram $HgCl_2$ sampai larut.

b) Pemeriksaan Tanin

Pemeriksaan tanin dilakukan dengan cara menimbang ekstrak sebanyak 0,1 gram dan dilarutkan dalam 2 mL air, kemudian ditambahkan beberapa tetes $FeCl_3$ 1%. Timbulnya warna biru tua menunjukkan adanya senyawa tanin (fenolik).

c) Pemeriksaaan Saponin

Pemeriksaan saponin dilakukan dengan cara melarutkan 0,1 gram ekstrak dalam 3 mL air, kemudian dikocok dengan kuat selama 10 menit. Timbulnya buih atau busa menunjukkan adanya saponin.

d) Pemeriksaan Terpenoid dan Steroid

Pemeriksaan terpenoid dan steroid dilakukan dengan cara melarutkan 0,1 gram ekstrak dalam 1 mL air, kemudian ditambahkan 1 mL CH_3COOH glasial dan 1 mL H_2SO_4 pekat. Timbulnya warna merah menunjukkan adanya terpenoid sedangkan warna biru atau ungu menunjukkan adanya steroid.

e) Pemeriksaan Flavonoid

Pemeriksaan flavonoid dilakukan dengan cara melarutkan 0,1 gram ekstrak dalam 3 mL air kemudian ditambahkan 0,1 gram serbuk Mg dan 1 mL HCl pekat. Timbulnya warna kuning menunjukkan adanya flavonoid.

5. Uji Antimalaria Ekstrak Etil Asetat Daun Sukun

Aktivitas antimalaria ekstrak etil asetat daun sukun dilakukan mengikuti pengujian yang dilakukan oleh Budimulja dkk. (1997). Tiap komponen dilarutkan dalam DMSO (10^{-2} mol L^{-1}). Parasit malaria (*Plasmodium falciparum* 3D7) dipropagasi dalam 24 sumur plat-kultur yang mengandung ekstrak etil asetat daun sukun dalam berbagai konsentrasi. Pertumbuhan parasit dimonitor dengan *Blood smear* dalam MeOH dengan noda geimsa sebagai penanda parasit.

6. Isolasi dan Karakterisasi Senyawa

Ekstrak etil asetat daun sukun dipisahkan dan dimurnikan lebih lanjut dengan berbagai teknik kromatografi, antara lain Kromatografi Vakum Cair (KVC), Kromatografi Kolom Gravitasi (KKG), dan Kromatografi Lapis Tipis (KLT).

Senyawa murni yang diperoleh dikarakterisasi dengan alat spektrometer FTIR untuk mengetahui gugus fungsi yang terdapat dalam senyawa murni.