

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Lokasi Penelitian

Pelaksanaan kegiatan penelitian dilakukan selama enam bulan terhitung sejak bulan Maret 2023 hingga Agustus 2023. Lokasi pelaksanaan kegiatan penelitian untuk proses isolasi dan karakterisasi dilakukan di Laboratorium Riset Departemen Pendidikan Kimia, FPMIPA Universitas Pendidikan Indonesia dan Laboratorium Kimia FMIPA Institut Teknologi Bandung.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Alat

Peralatan yang digunakan pada tahapan isolasi dan pemurnian dalam penelitian ini adalah neraca analitik, corong pisah, corong Buchner, gelas kimia 400 mL, labu Erlenmeyer 250 mL, 500 mL, dan 1000 mL, labu dasar bulat 100 mL, 250 mL, dan 500 mL, labu distilasi 500 mL, pipa kapiler, pipet tetes, pipet Pasteur, batang pengaduk, spatula, botol vial 5 mL, 10 mL, 25 mL, dan 150 mL, gelas ukur 10 mL, 50 mL, 100 mL, chamber Kromatografi Lapis Tipis (KLT), set rotatori vakum evaporator, set distilasi, set Kromatografi Cair Vakum (KCV) dengan kolom diameter 7 cm dan 5 cm, set Kromatografi Kolom Gravitasi (KKG), set Kromatografi Kolom Radial (KKR), dan lampu UV 254 nm. Selain itu, peralatan yang digunakan pada tahapan karakterisasi diantaranya, spektrometer *Fourier Transform Infrared* (FTIR) dan *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR) 1D ($^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$) dan 2D (HMBC dan HSQC).

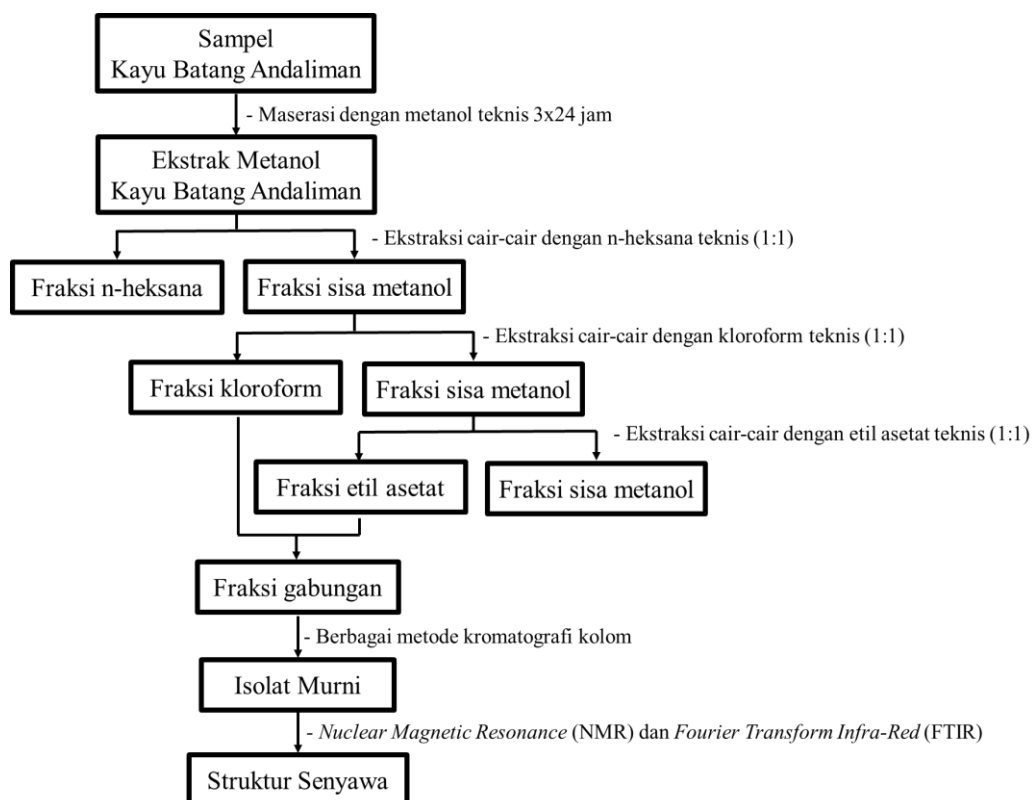
3.2.2 Bahan

Bahan utama pada penelitian ini adalah ekstrak metanol kayu batang andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium* DC.) asal Sumatera Utara. Adapun, bahan-bahan kimia lainnya yang digunakan pada penelitian ini adalah pelarut etanol pro analisis, metanol teknis dan pro analisis, etil asetat teknis dan etil asetat hasil distilasi, kloroform pro analisis, *n*-heksana teknis dan *n*-heksana hasil distilasi, diisopropileter pro analisis, aseton teknis dan pro analisis, dan aquadest. Selain itu,

pada tahapan isolasi dan pemurnian digunakan bahan-bahan berupa silika gel 60 GF₂₅₄ untuk KCV dan KKR, silika gel 60 GF₂₅₄ dengan ketebalan 0,25 mm untuk KLT dan silika gel berukuran 70-230 mesh untuk impregnasi pada KCV dan untuk KKG.

3.3 Prosedur Penelitian

Tahapan ekstraksi, pemisahan, pemurnian, dan karakterisasi secara singkat disajikan dengan bagan alir pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1. Bagan alir penelitian.

3.4 Tahapan Penelitian

Penelitian dilakukan dalam beberapa tahapan yaitu ekstraksi, pemisahan dan pemurnian, dan karakterisasi senyawa hasil isolasi.

3.4.1 Ekstraksi

Kayu batang tumbuhan andaliman (*Z. acanthopodium* DC.) diperoleh dari Sumatera Utara pada tahun 2018, yang dideterminasi di Herbarium Bogoriense, Pusat Penelitian Biologi, LIPI, Cibinong, Jawa Barat. Sebanyak 8 kg kayu batang

andaliman dikeringkan dan dihaluskan hingga menjadi serbuk simplisia. Serbuk simplisia diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut metanol teknis selama 3x24 jam dengan pengambilan ekstrak setiap 1x24 jam. Ekstrak metanol kemudian dipekatkan menggunakan evaporator vakum. Namun, langkah ekstraksi maserasi tidak dilakukan dalam penelitian ini karena tahapan tersebut telah dilakukan pada penelitian sebelumnya. Ekstrak metanol yang telah dipekatkan kemudian ditimbang untuk mendapatkan massa total ekstrak metanol.

3.4.2 Pemisahan dan Pemurnian

3.4.2.1 Fraksinasi dan Pemurnian

Setelah mendapatkan massa total, ekstrak metanol pekat sebanyak 20,8644-gram dilarutkan kembali dengan 1 Liter metanol, kemudian difraksinasi dengan ekstraksi cair-cair menggunakan pelarut *n*-heksana. Fraksi sisa metanol dari hasil ekstraksi *n*-heksana kemudian difraksinasi kembali dengan pelarut kloroform dan etil asetat secara berurutan. Ekstrak etil asetat dan kloroform kemudian digabungkan menjadi satu fraksi yang sama dan dipekatkan. Fraksi gabungan etil asetat dengan kloroform kemudian ditimbang, dilarutkan dalam aseton, dan diimpregnasi ke dalam silika gel berukuran 70-230 mesh untuk dipisahkan dengan kromatografi cair vakum.

Fraksi gabungan etil asetat dan kloroform yang telah diimpregnasi selanjutnya dilakukan pemisahan menggunakan metode Kromatografi Cair Vakum (KCV). Eluen yang digunakan dalam fraksinasi menggunakan KCV disesuaikan dengan hasil KLT dari ekstrak metanol (*n*-heksana 100%, etil asetat 100%, dan campuran *n*-heksana dan etil asetat pada perbandingan tertentu). Hasil fraksinasi KCV pada fraksi gabungan etil asetat dan kloroform juga dianalisis kembali dengan KLT. Fraksi hasil KCV dengan pola noda KLT yang sama kemudian digabungkan dan dipekatkan kembali menggunakan rotatori vakum evaporator dan ditimbang massanya. Selain menggunakan KCV, pemisahan juga dilakukan dengan menggunakan KKG atau KKR, sesuai dengan hasil KLT dan massa fraksi.

Fraksi gabungan etil asetat dan kloroform selanjutnya dimurnikan dengan Kromatografi Cair Vakum dengan diameter kolom yang lebih kecil, Kromatografi Kolom Gravitasi, dan Kromatografi Kolom Radial hingga mendapatkan fraksi akhir

berupa isolat murni. Eluen kromatografi dipilih sedemikian rupa sehingga sesuai untuk tahap pemurnian. Tahapan ini dilakukan beberapa kali, sesuai dengan hasil pengujian kemurnian dengan menggunakan KLT.

3.4.2.2 Analisis Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Analisis kromatografi lapis tipis (KLT) pada penelitian ini dilakukan untuk mengetahui perkiraan jumlah komponen yang dapat diisolasi, penetapan jenis-jenis eluen yang sesuai untuk tahapan pemisahan atau pemurnian selanjutnya, dan identifikasi kemurnian fraksi hasil isolasi.

3.4.3 Karakterisasi Senyawa Hasil Isolasi

Struktur senyawa murni atau senyawa hasil isolasi ditentukan berdasarkan metode spektroskopi, meliputi spektrometer *Fourier Transform Infra Red* (FTIR), dan spektrometer *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR) 1D (^1H -NMR dan ^{13}C -NMR) dan 2D (HMBC dan HSQC).