

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Lokasi Pengambilan Sampel, Waktu dan Tempat Penelitian

Lokasi pengambilan sampel bertempat di sepanjang jalan Lembang-Cihideung. Sampel yang diambil adalah CAF. Penelitian berlangsung sekitar 11 bulan dari bulan Maret 2009 sampai Februari 2010. Penelitian dilakukan di tiga tempat, yaitu Laboratorium Riset (Bioflokulan), Laboratorium Riset FPMIPA UPI Bandung, dan Laboratorium Kimia Organik dan Biokimia Kimia FPMIPA UPI Bandung. Sedangkan analisis dilakukan di dua tempat, yaitu Laboratorium Kimia Instrumen FPMIPA UPI Bandung dan Laboratorium Kimia Balai Besar Barang dan Bahan Teknik (B4T) Bandung.

3.2 Alat dan Bahan

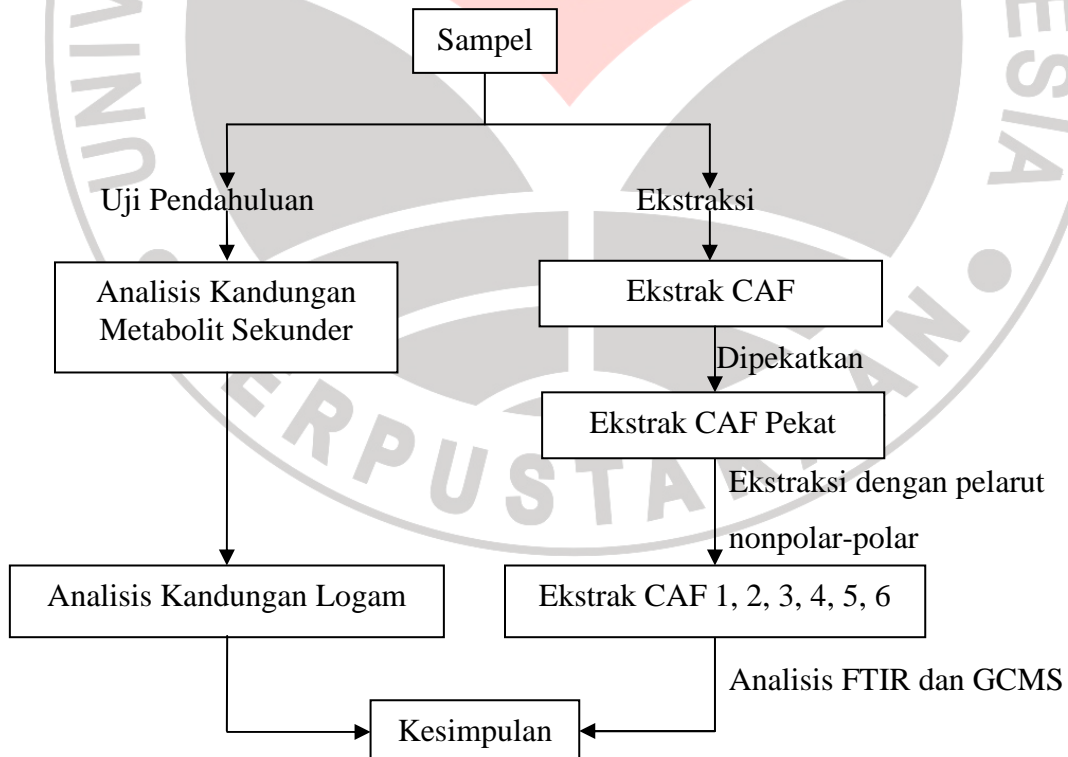
Alat-alat yang digunakan dalam penelitian antara lain: gelas ukur 500 mL, corong kaca, set alat maserasi, *rotary evaporator*, corong pisah 250 mL, gelas kimia 250 mL, gelas kimia 100 mL, tabung reaksi, spatula, batang pengaduk, pipet tetes, indikator universal, kertas saring, botol semprot, neraca analitik, set alat FTIR, dan set alat GC-MS.

Bahan atau zat-zat kimia yang digunakan dalam penelitian antara lain: metanol, aquades, H_2SO_4 , $CHCl_3$ p.a, NH_4OH , NaOH, etanol, serbuk Mg, HCl, $FeCl_3$ 1%, asam asetat glasial, pereaksi Mayer.

3.3 Alur Penelitian

Penelitian diawali dengan melakukan uji pendahuluan terhadap CAF. Uji pendahuluan ini meliputi analisis senyawa metabolit sekunder dengan menggunakan metode Skrining Fitokimia, dan analisis kandungan logam menggunakan XRF dan AAS.

Selanjutnya dilakukan tahapan ekstraksi dengan menggunakan metanol. Ekstrak tersebut kemudian diuapkan menggunakan *rotary evaporator*. Selanjutnya ekstrak pekat diekstraksi menggunakan kloroform, campuran kloroform-metanol, dan metanol. Kemudian hasil ekstraksi dikarakterisasi menggunakan FTIR dan GC-MS. Secara singkat alur penelitian yang dilakukan dapat dilihat pada Gambar 3.1



Gambar 3.1 Bagan Alur Penelitian

3.3.1 Uji Pendahuluan

3.3.1.1 Analisis Metabolit Sekunder

Uji pendahuluan yang dilakukan menggunakan metode Skrining Fitokimia. Adapun uji pendahuluan yang dilakukan, meliputi:

1. Uji Pendahuluan Senyawa Alkaloid

Ekstrak kental CAF sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 5 tetes CHCl_3 dan beberapa tetes pereaksi Mayer. Terbentuknya endapan putih menunjukkan adanya alkaloid.

2. Uji Pendahuluan Senyawa Flavonoid

Ekstrak kental CAF sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 1 g serbuk Mg dan 10 mL HCl pekat. Terbentuknya warna kuning menunjukkan adanya flavonoid.

3. Uji Pendahuluan Senyawa Tanin

Ekstrak kental CAF sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan beberapa tetes FeCl_3 1%. Terbentuknya warna biru tua menunjukkan adanya senyawa tanin (fenolik).

4. Uji Pendahuluan Senyawa Terpenoid dan steroid

Ekstrak kental CAF sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 1 mL asam asetat glasial dan 1 mL H_2SO_4 pekat. Terbentuknya warna merah menunjukkan adanya terpenoid, sedangkan warna biru tua atau ungu menunjukkan adanya steroid.

5. Uji Pendahuluan Senyawa Kuinon

Ekstrak kental CAF sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan beberapa tetes NaOH 0,1 N. Terbentuknya warna merah menunjukkan adanya kuinon.

6. Uji Pendahuluan Senyawa Antosianin

Ekstrak kental CAF sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan beberapa tetes HCl 0,1 N. Terbentuknya warna merah menunjukkan adanya antosianin.

3.3.1.2 Analisis Logam

1. XRF

a. Analisis CAF

CAF dicuci terlebih dahulu lalu dikeringkan. Dipotong bagian tengahnya, kemudian dianalisis menggunakan XRF.

b. Analisis Pasta CAF

CAF hasil maserasi diuapkan dengan menggunakan destilasi bertingkat pada suhu $70 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Hasil destilasi diuapkan pada penangas air hingga menjadi pasta, kemudian dianalisis menggunakan XRF.

2. AAS

CAF ditimbang $\pm 1\text{g}$, dipotong kecil-kecil dan ditambah HNO_3 sebanyak 10 mL. Larutan dipanaskan hingga volumenya $\pm 2\text{ mL}$, lalu disaring dan diencerkan sampai 50 mL. Kemudian dianalisis menggunakan AAS.

3.3.2 Ekstraksi CAF

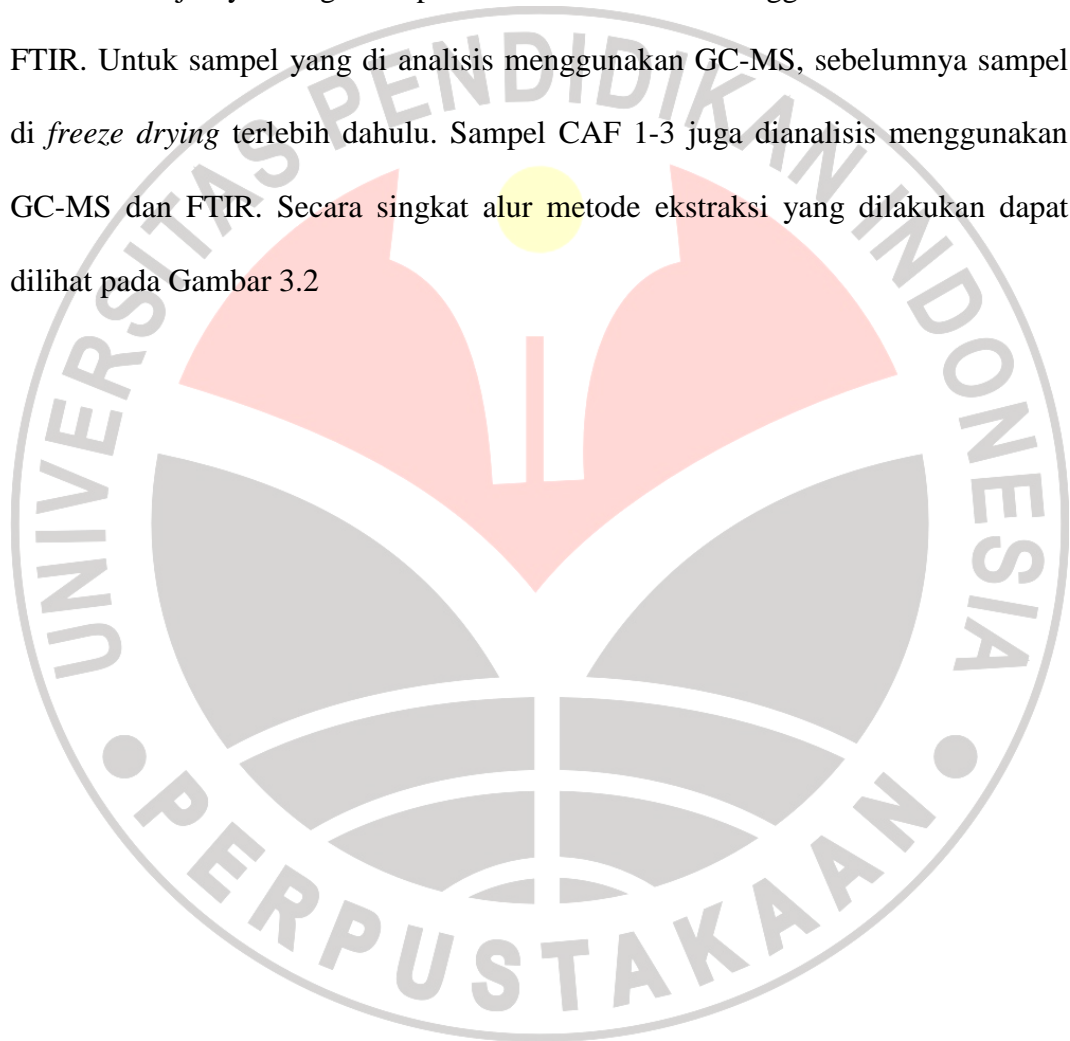
Metode yang dilakukan untuk mengekstrak CAF yaitu dengan menggunakan metode maserasi, dimana CAF direndam dalam pelarut organik. Pelarut yang digunakan adalah campuran metanol dan air dengan perbandingan 4:1. CAF yang digunakan sebanyak ± 5 Kg dan dimaserasi selama ± 1 hari. Sebelum dimaserasi, sampel dicuci terlebih dahulu. Setelah semua CAF terekstrak, sampel hasil maserasi disaring. Filtrat yang didapatkan kemudian diuapkan menggunakan *rotary evaporator* sampai 1/10 bagian pada suhu $40^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

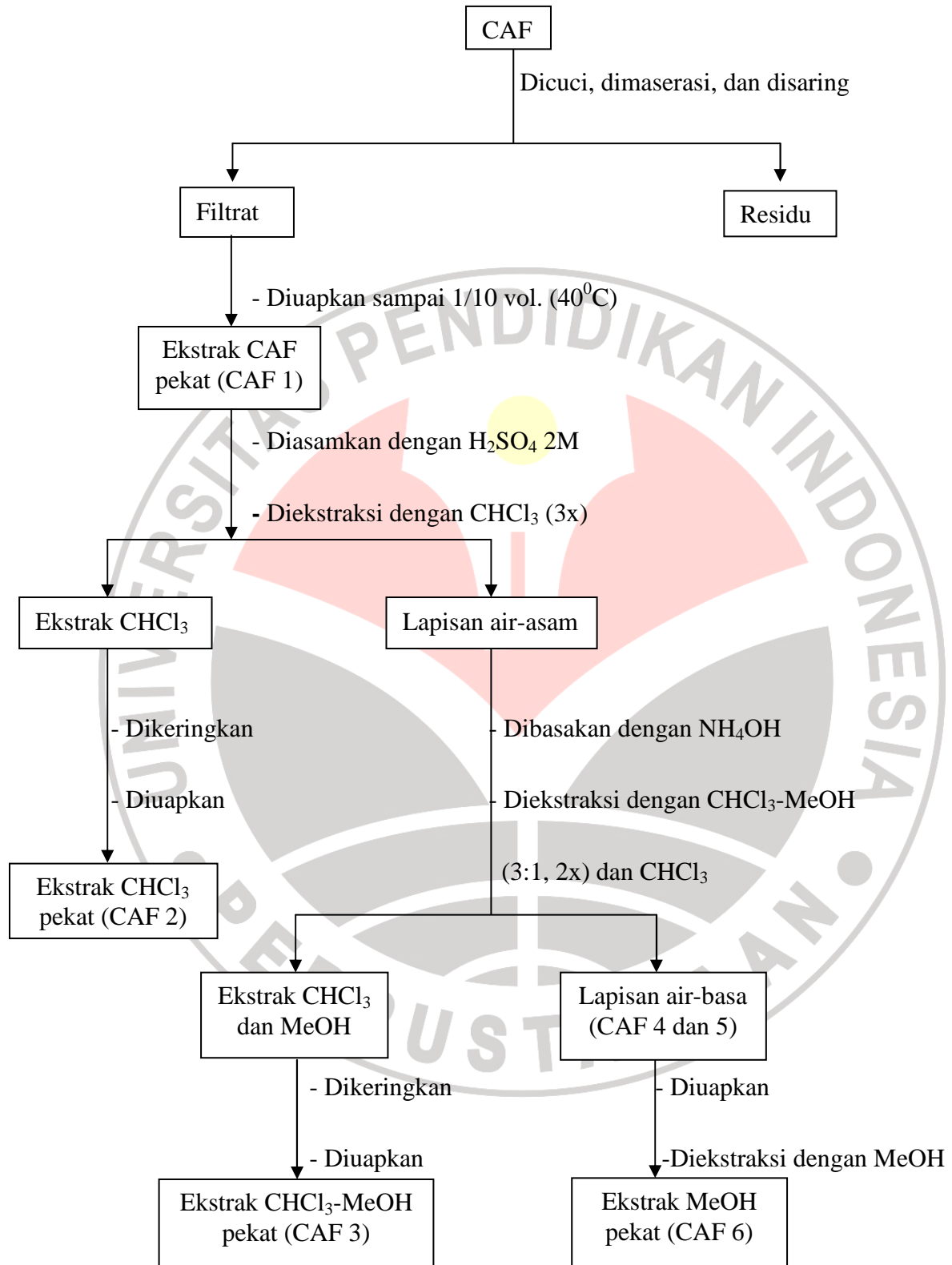
Kemudian sampel hasil evaporasi, diasamkan dengan H_2SO_4 2M. Setelah sampel diasamkan, lalu sampel diekstraksi menggunakan CHCl_3 p.a. sebanyak 20 mL (3x). Dari ekstraksi ini, didapatkan 2 fraksi, fraksi pertama (lapisan bawah) yaitu fraksi CHCl_3 , yang kemudian diuapkan, fraksi ini selanjutnya diberi kode CAF 2. Sedangkan fraksi kedua (lapisan atas) yaitu fraksi air-asam.

Fraksi air-asam ini selanjutnya dibasakan sampai pH 10 dengan NH_4OH . Kemudian diekstraksi dengan campuran CHCl_3 dan MeOH (3:1, 2x) sebanyak 100 mL dan 50 mL CHCl_3 (1x). Dari ekstraksi ini didapatkan 2 fraksi, fraksi pertama (lapisan bawah) yaitu fraksi CHCl_3 -MeOH, kemudian diuapkan, dan selanjutnya diberi kode CAF 3. Fraksi kedua yaitu fraksi lapisan air-basa (lapisan atas) yang selanjutnya diuapkan dan diekstraksi menggunakan MeOH. Analisis dibagi menjadi 3 bagian, yaitu:

- a. CAF 4 yang merupakan endapan dari lapisan air-basa
- b. CAF 5 yang merupakan larutan dari lapisan air-basa
- c. CAF 6 yang merupakan hasil ekstraksi lapisan air-basa dengan MeOH

Selanjutnya ketiga sampel di atas dianalisis menggunakan GC-MS dan FTIR. Untuk sampel yang di analisis menggunakan GC-MS, sebelumnya sampel di *freeze drying* terlebih dahulu. Sampel CAF 1-3 juga dianalisis menggunakan GC-MS dan FTIR. Secara singkat alur metode ekstraksi yang dilakukan dapat dilihat pada Gambar 3.2





Gambar 3.2 Bagan alur metode ekstraksi CAF

3.3.3 Tahap Karakterisasi Ekstrak CAF

Untuk mengetahui kandungan senyawa yang berhasil diekstrak dari CAF, maka dilakukan pengujian terhadap ekstrak tersebut menggunakan FTIR dan GC-MS.

3.3.3.1 Pemeriksaan FTIR

Pemeriksaan FTIR ini dilakukan untuk mengetahui gugus fungsi yang terdapat dalam CAF sebelum dan sesudah melalui proses ekstraksi. Sebelum dianalisis, dibuat pelet KBr terlebih dahulu dengan cara mencampurkan ekstrak CAF dengan KBr murni, kemudian pelet tersebut dianalisis menggunakan spektroskopi FTIR tipe Shimadzu FTIR-8400.

3.3.3.2 Pemeriksaan GC-MS

Pemeriksaan GC-MS ini dilakukan untuk mengetahui komponen yang bersifat volatil dalam CAF sesudah melalui proses ekstraksi. Ekstrak CAF yang akan dianalisis sebelumnya dilarutkan terlebih dahulu menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian diinjeksikan ke dalam alat GC-MS.