

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian dilakukan di Laboratorium Riset Kimia, Laboratorium Riset Kimia Lingkungan, dan Laboratorium Kimia Analitik Instrumen Jurusan Pendidikan Kimia Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia. Penelitian ini dimulai dari bulan Maret sampai dengan bulan Desember 2009.

#### **3.2 Sistematika Penelitian**

Penelitian ini terdiri dari lima tahap yang meliputi :

##### **1. Tahap Preparasi Sampel**

Pada tahap ini, simplisia dikumpulkan sebanyak 30,9 Kg secara bertahap kemudian simplisia basah dibersihkan dan dikeringkan di udara terbuka dan dihaluskan. Simplisia yang telah halus kemudian siap untuk digunakan sebagai bahan isolasi.

##### **2. Tahap Isolasi Senyawa Bioflokulan DYT**

Isolasi Senyawa Bioflokulan DYT dilakukan dengan cara merefluks simplisia DYT menggunakan lima pelarut yang berbeda yaitu pelarut metanol, akuades, larutan  $MgCl_2$  1M,  $MgCl_2$  0,1M dan  $MgCl_2$  0,01M dengan blanko aquades. Langkah ini dilanjutkan dengan penghilangan klorofil dan senyawa non polar lainnya.

### 3. Tahap Pemurnian Senyawa Bioflokulan DYT

Senyawa bioflokulan DYT dimurnikan dengan cara kristalisasi di dalam pelarut air kemudian direkristalisasi menggunakan pelarut metanol.

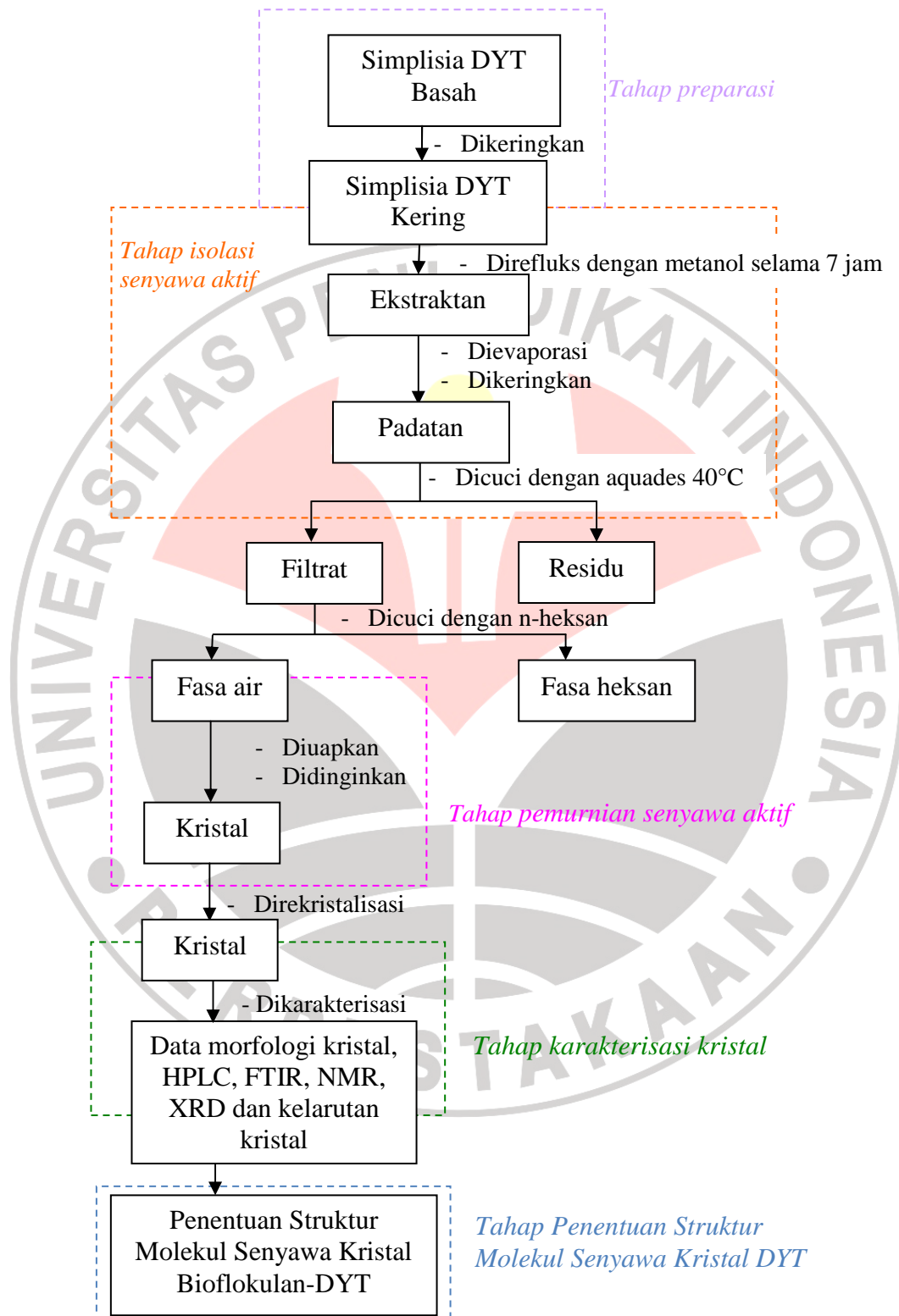
### 4. Tahap Karakterisasi Kristal Bioflokulan DYT

Pada tahap ini, kristal bioflokulan DYT dikarakterisasi menggunakan analisis mikroskopi, spektrofotometri UV-VIS, *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC), spektrofotometri *Fourier Transform Infra Red* (FTIR), *X-Ray Diffraction* (XRD), *Liquid Chromatography Mass Spectrometry* (LCMS), *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR), dan uji kelarutan.

### 5. Tahap Penentuan Struktur Senyawa Kristal DYT

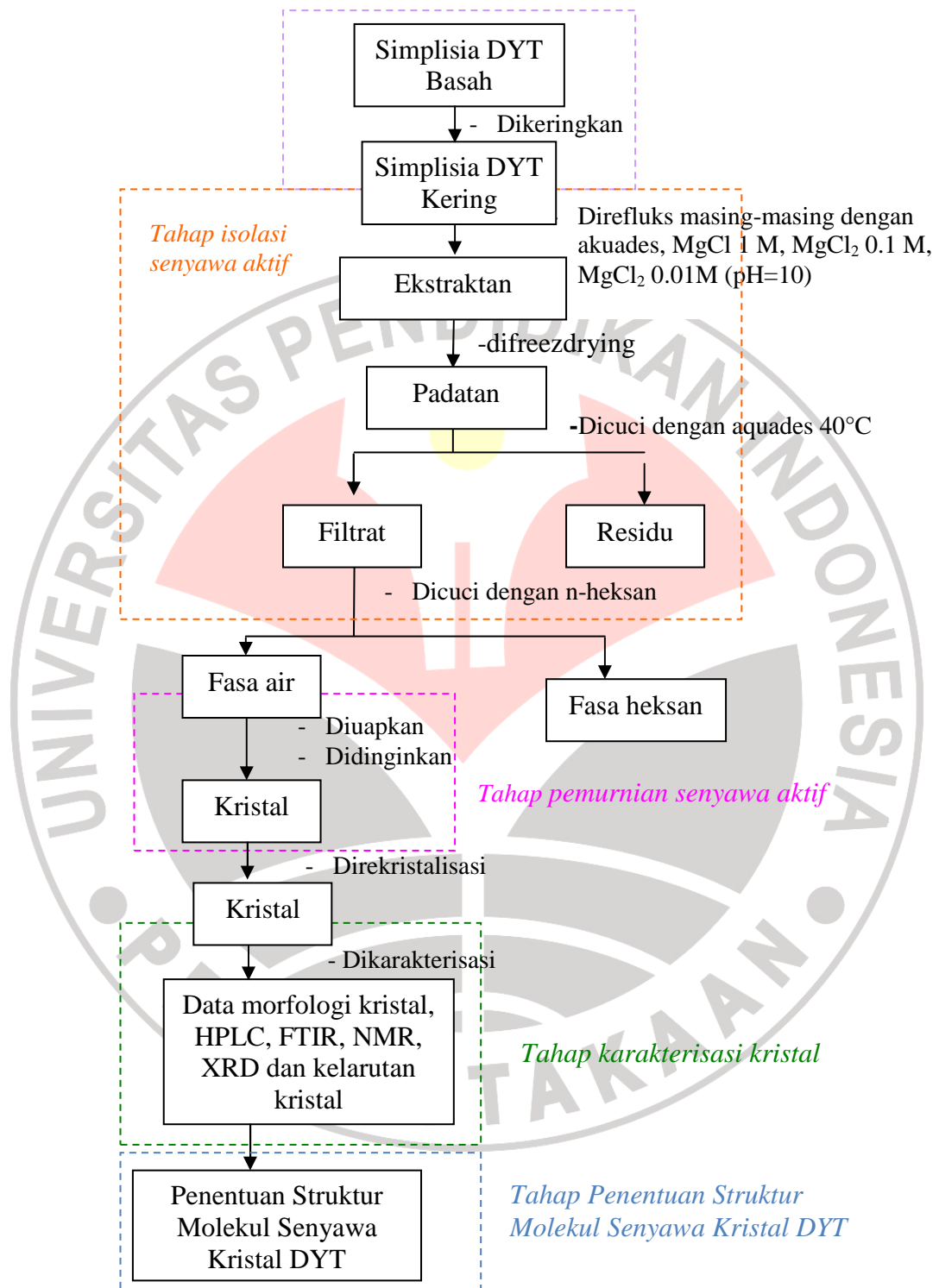
Pada tahap ini, informasi yang diperoleh dari XRD, FTIR, NMR, LCMS digunakan untuk menentukan struktur molekul senyawa yang mungkin dari kristal DYT.

Bagan alir dari penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 3.1.



**Gambar 3.1** Bagan Alir Penelitian

Bagan alir dari penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 3.2.



Gambar 3.2 Bagan Alir Penelitian

### 3.3 Alat dan Bahan

#### 3.3.1 Alat

1. Peralatan untuk tahap isolasi dan pemurnian

Satu buah blender merek Philips tipe HR 2815/a, 3 set alat refluks, 1 set *Rotary evaporator* merek Butchi Heating Bath B-490, 1 set neraca digital, 1 set *Waterbath* merek Eyela tipe SB 24, 1 buah corong Buchner, 1 buah labu erlenmeyer berpenghisap 500 mL, 4 buah gelas kimia masing-masing 50 mL, 100 mL dan 250 mL, 2 buah gelas kimia masing-masing 600 mL, 1000 mL dan 2000 mL, 3 buah termometer alkohol 100°C, 1 buah gelas ukur masing-masing 50 mL, 250 mL dan 1 L, 3 buah corong pisah 250 mL, 7 buah kaca arloji, Aluminium foil, Kain Keras.

2. Peralatan untuk tahap karakterisasi kristal

Satu set alat Mikroskop binokuler merek Shimadzu tipe 3905789, 1 set Spektrofotometer UV/VIS merek Shimadzu tipe 1240, 1 set alat HPLC merek Hitachi tipe D-7000, 1 set Spektrofotometer FTIR merek Shimadzu tipe 8400, 1 set alat XRD tipe N.N.-999 merk PANalytical, 1 set alat NMR 400Mhz, 1 set alat LCMS Hitachi L 6200.

#### 3.3.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan adalah sampel bioflokulan DYT, metanol teknis, n-heksan teknis, garam  $MgCl_2$ , serbuk kalium bromida, metanol p.a, aquabides.

### 3.4 Prosedur Kerja

#### 3.4.1 Pembuatan Larutan

##### 1. Pembuatan Larutan $\text{MgCl}_2$ 1 M

Padatan  $\text{MgCl}_2$  ditimbang sebanyak 95 gram kemudian dilarutkan dengan akuades dan dimasukkan ke dalam labu ukur 1 L. Setelah itu, ditambahkan akuades sampai volume larutan mencapai tanda batas. Dibuat secara duplo untuk memperoleh volume 2 liter larutan  $\text{MgCl}_2$  1 M.

##### 2. Pembuatan Larutan $\text{MgCl}_2$ 0,1 M

Padatan  $\text{MgCl}_2$  ditimbang sebanyak 9,5 gram kemudian dilarutkan dengan akuades dan dimasukkan ke dalam labu ukur 1 L. Setelah itu, ditambahkan akuades sampai volume larutan mencapai tanda batas. Dibuat secara duplo untuk memperoleh volume 2 liter larutan  $\text{MgCl}_2$  0,1 M.

##### 3. Pembuatan Larutan $\text{MgCl}_2$ 0,01M

Padatan  $\text{MgCl}_2$  ditimbang sebanyak 0.95 gram kemudian dilarutkan dengan akuades dan dimasukkan ke dalam labu ukur 1 L. Setelah itu, ditambahkan akuades sampai volume larutan mencapai tanda batas. Dibuat secara duplo untuk memperoleh volume 2 liter larutan  $\text{MgCl}_2$  0,01 M.

#### 3.4.2 Tahap Preparasi Sampel

Simplisia dikumpulkan lalu ditimbang massa basahya dan dibersihkan dari kotoran-kotoran yang menempel. Setelah itu, simplisia dikeringkan dengan cara diangin-angin di udara terbuka selama beberapa hari. Selama pengeringan, simplisia dihindarkan dari sinar matahari secara langsung serta dijaga agar tidak

membusuk. Simplisia yang telah kering kemudian dihaluskan menggunakan blender. Setelah itu, simplisia ditimbang massa keringnya.

### **3.4.3 Tahap Isolasi Senyawa Aktif Bioflokulan DYT**

Simplisia kering dimasukkan ke dalam labu dasar bulat sampai dua pertiga volume labu. Kemudian ditambahkan masing-masing pelarut yang telah ditentukan.. Setelah itu, campuran direfluks selama tujuh jam lalu disaring. Filtrat yang diperoleh kemudian dihilangkan pelarutnya menggunakan *rotary evaporator* sampai diperoleh ekstrak pekat. Ekstrak tersebut kemudian dibiarkan sampai mengering. Padatan yang diperoleh lalu dicuci dengan aquades 40°C. Setelah pencucian, campuran disaring di bawah vakum. Filtrat yang diperoleh kemudian dicuci dengan n-heksan dengan perbandingan volume 1 : 1. Pencucian tersebut dilakukan sampai fasa n-heksan tak berwarna. Fasa air yang diperoleh lalu dikristalisasi.

### **3.4.4 Tahap Pemurnian Senyawa Bioflokulan DYT**

Proses pemurnian dilakukan dengan cara kristalisasi. Ekstrak fasa air yang diperoleh, diuapkan pada suhu kamar kemudian didinginkan sampai terbentuk kristal. Kristal yang masih bercampur dengan pengotor, dicuci berulang kali dengan metanol dingin sampai diperoleh filtrat yang hampir tidak berwarna. Kristal yang telah bersih kemudian ditimbang massa totalnya.

Sebagian kristal direkristalisasi untuk mendapatkan kualitas kristal yang lebih baik. Beberapa gram kristal ditambah metanol dalam keadaan panas sampai



semua kristal larut. Kemudian, larutan dibiarkan sampai metanolnya menguap. Kristal yang terbentuk, dikumpulkan lalu ditimbang.

### **3.4.5 Tahap Karakterisasi Kristal Bioflokulan DYT**

#### **3.4.5.1 Bentuk Morfologi Kristal Bioflokulan DYT**

Satu bentuk kristal diambil dan ditempatkan di atas kaca preparat, kemudian diamati menggunakan mikroskop binokuler. Bentuk morfologi kristal bioflokulan DYT tersebut diamati di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 400 kali.

#### **3.4.5.2 Panjang Gelombang Maksimum Serapan Larutan Bioflokulan DYT**

Analisis ini dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV/VIS Shimadzu 1240. Larutan bioflokulan DYT dibuat dengan melarutkan sekitar 0,01 gram kristal bioflokulan DYT dengan aquabides sampai volume 10 mL. Absorbansi larutan di-*scan* pada rentang panjang gelombang 190-390 nm sehingga diperoleh nilai panjang gelombang maksimumnya. Panjang gelombang ini digunakan untuk analisis jumlah komponen menggunakan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC).

#### **3.4.5.3 Jumlah Komponen Kristal Bioflokulan DYT**

Analisis ini dilakukan dengan metode kromatografi cair kinerja tinggi fasa terikat menggunakan alat HPLC Hitachi D-7000. Larutan kristal bioflokulan DYT disuntikkan sebanyak 20  $\mu\text{L}$  ke dalam kolom C18 bersuhu 40°C. Fasa gerak metanol:air (1:1) dialirkan dengan laju alir 0,500 mL/menit. Komponen yang keluar dari kolom, dideteksi menggunakan detektor UV.



#### 3.4.5.4 Gugus Fungsi Kristal Bioflokulan DYT

Analisis ini menggunakan metode spektrofotometri *Fourier Transform Infra Red* (FTIR). Alat yang digunakan adalah spektrofotometer FTIR Shimadzu-8400. Beberapa miligram kristal bioflokulan DYT dicampur dengan serbuk KBr dan digerus di dalam alat *mortir agate* sampai halus dan campurannya merata. Campuran tersebut kemudian dimasukkan ke dalam suatu cetakan dan ditekan dengan penekan hidrolis sehingga diperoleh suatu lempeng tipis yang transparan. Setelah itu, lempeng tipis dimasukkan ke dalam *pellet holder* dan ditempatkan di dalam alat FTIR.

#### 3.4.5.5 Kelarutan Kristal Bioflokulan DYT

Uji kelarutan kristal dilakukan di dalam pelarut air dan metanol. Uji kelarutan dilakukan dengan cara mengambil sebagian kecil Kristal atau zat aktif hasil isolasi yang kemudian dimasukan ke dalam tabung reaksi kecil yang sudah terdapat macam-macam pelarut, pelarut tersebut yaitu n-heksana, kloroform, n-butanol, aseton, metanol dan air. Kemudian diamati kelarutan masing-masing Kristal atau senyawa aktif hasil isolasi tersebut terhadap pelarut yang berbeda.

#### 3.4.5.6 Difraksi sinar-X (XRD)

Uji difraksi sinar-x dilakukan dengan menggunakan instrumentasi XRD. Uji ini dilakukan dengan cara kristal diambil kira-kira sejung spatula kemudian digerus dalam lumpang, setelah halus Kristal diletakkan dalam prepat dan diratakan permukaanya dengan sentuhan spatula. Kemudian Kristal dimasukan ke dalam XRD dan parameter pengukuran diset melalui portable computer yang

terintegrasi langsung ke alat XRD. Parameter pengukuran tersebut yaitu *Start Position* [ $^{\circ}2\theta$ ] = 5.0084, *End position* [ $^{\circ}2\theta$ ] = 79.9954, *Step Size* [ $^{\circ}2\theta$ ] = 0.0170, *Scan Step Time* [s] = 4.1750, *Scan Type* = continuous, *Specimen Length* [mm] = 10.00, *Measurement Temperature* [ $^{\circ}\text{C}$ ] = 25.00, *Anoda Material* : Cu, K-Alpha1 [A] = 1.54060, *Generator Setting* : 30 mA, 40 kV. Setelah parameter diset maka langkah selanjutnya adalah scanning Kristal yang datanya kemudian langsung terintegrasi ke dalam komputer.

#### 3.4.5.7 Pengukuran NMR

Pengukuran NMR menggunakan pengukuran proton dan karbon untuk mengetahui struktur senyawa dengan informasi posisi atom H (proton) dan atom C (karbon) yang terdapat dalam senyawa hasil isolasi. Sampel dilarutkan dengan suatu pelarut yang dapat melarutkan sampel dengan baik. Pelarut yang digunakan merupakan pelarut yang terdeuterasi pada atom Hidrogennya. Pengukuran dilakukan dengan cara memasukkan sampel yang telah dilarutkan ke dalam tabung khusus untuk pengukuran NMR, sampel yang telah ada di tabung dimasukkan ke dalam alat NMR untuk diukur.

#### 3.4.5.8 Pengukuran LCMS

Dari instrumentasi LCMS ini diharapkan dapat diperoleh massa relatif dari molekul komponen dan massa relatif hasil pecahannya. Parameter pengukurannya adalah jumlah sampel yang diinjeksikan 20  $\mu\text{l}$ , flow rate 1ml/min, eluen yang digunakan MeOH+Air = 80 + 20, LC: Hitachi L 6200, System ESI (Electrospray Ionisation), *Positive ion mode*, Kolom C18 (RP 18) Supelco, Column length : 150 mm, ID : 2 mm, Particle size : 5  $\mu\text{m}$ .