

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Objek dan Lokasi Penelitian

Objek atau bahan penelitian yang digunakan adalah daging buah paria (*Momordica charantia* L.) yang diperoleh dari daerah Indramayu, Jawa Barat. Dan untuk memastikan identitas dari tanaman paria yang didapatkan maka dilakukan uji determinasi di Jurusan Pendidikan Biologi UPI (Lampiran 1).

Lokasi penelitian dilaksanakan di Laboratorium Riset, Laboratorium Kimia Instrumen Jurusan Pendidikan Kimia UPI Bandung.

3.2. Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1. Alat

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini meliputi alat-alat gelas, penguap berputar vakum (*vaccum rotary evaporator*), pompa vakum, set alat destilasi, set alat kromatografi kolom Vakum Cair diameter 7 cm, set alat kromatografi kolom diameter 5 cm, Spektrofotometer FT-IR (*Fourier Transform-Infra Red*) Shimadzu 8400, dan NMR (*Nuclear Magnetic Resonance*) Jeol ECA-500 (untuk proton diukur pada 500 MHz dan karbon diukur pada 125 MHz)

3.2.2. Bahan

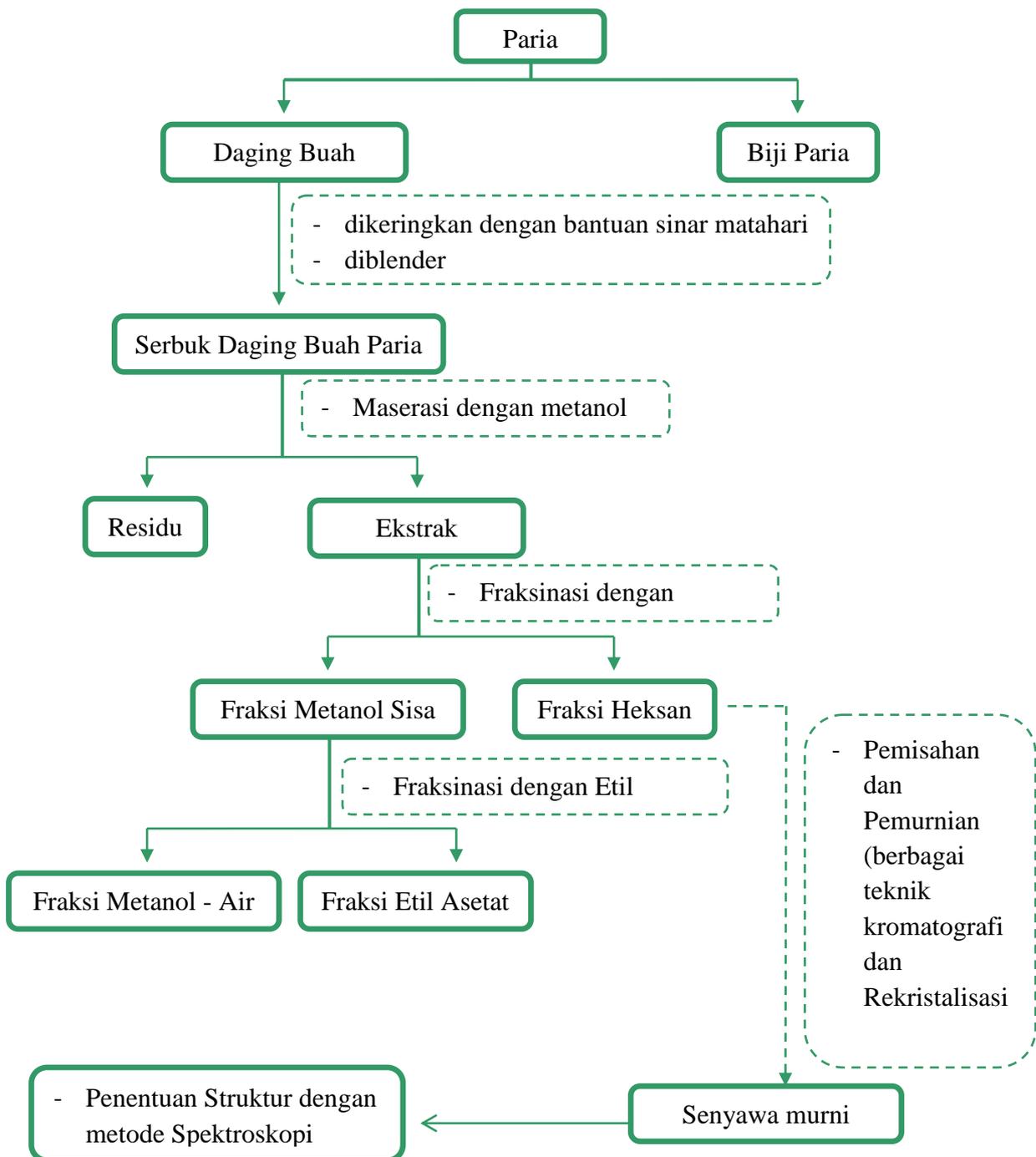
Pada penelitian ini, bahan utama yang digunakan adalah daging buah *Momordica charantia*. Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari bahan teknis. Bahan dengan kualitas teknis didestilasi terlebih dahulu sebelum digunakan. Bahan-bahan yang digunakan adalah metanol, heksan, etil asetat, aseton, *silica gel 60 GF₂₅₄ for TLC*, *silica gel 60 230-400 mesh for CC*, kloroform p.a, H₂SO₄ pekat, aquades dan kertas saring.

3.3. Metodologi Penelitian

Pelaksanaan penelitian dilakukan dengan beberapa tahapan. Tahapan tersebut yaitu

1. Penyiapan sampel
2. Ekstraksi dan faksinasi
3. Pemisahan dan pemurnian
4. Karakterisasi dengan metode spektroskopi

Bagan alir penelitian yang dilakukan dapat dilihat pada gambar 3.1:



Gambar 3.1. Bagan Alir Penelitian

Uraian dari masing-masing pekerjaan yang dilakukan adalah sebagai berikut:

3.3.1. Penyiapan Sampel Tumbuhan

Tahap awal penelitian dimulai dari pengambilan sampel buah paria yang berumur 14 hari dari daerah Indramayu, Jawa Barat. Buah paria yang akan digunakan dibersihkan terlebih dahulu dari kotoran yang menempel. Setelah itu, dipisahkan antara daging buah dengan biji yang kemudian diiris-iris dan dikeringkan dengan bantuan sinar matahari sampai kering. Sampel yang telah kering kemudian dihaluskan dengan blender sampai terbentuk serbuk. Kemudian serbuk daging buah paria yang diperoleh ditimbang untuk mengetahui berat daging buah dalam kondisi yang telah dikeringkan.

3.3.2. Proses Ekstraksi dan Fraksinasi

Serbuk daging buah paria (*Momordica charantia* L.) diekstraksi menggunakan pelarut metanol. Teknik ekstraksi yang digunakan ialah ekstraksi cair-padat dengan metode maserasi. Sampel direndam dalam pelarut metanol 3 x 1 liter berturut-turut selama 24 jam.

Ekstrak hasil maserasi kemudian disaring menggunakan corong *buchner* Lalu filtratnya dipekatkan menjadi setengah volume awal menggunakan *rotary evaporator* dalam keadaan vakum.

Ekstrak metanol yang telah dipekatkan difraksinasi berturut-turut dengan heksan (3 x 50 ml) setiap kali ekstraksi, etil asetat (3 x 50 ml) setiap kali ekstraksi, sehingga diperoleh fraksi heksan, etil asetat dan metanol sisa. Masing-masing fraksi yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan cara penguapan menggunakan

alat *rotary evaporator* sampai diperoleh massa yang tetap dari masing-masing fraksi.

3.3.3 Pemisahan dan Pemurnian

Pemisahan dan pemurnian senyawa dalam penelitian ini dilakukan melalui dua tahap yaitu kromatografi cair vakum dan rekristalisasi. Sebelum dilakukan proses pemisahan dilakukan terlebih dahulu kromatografi lapis tipis untuk menentukan eluen yang tepat pada proses pemisahan menggunakan kromatografi kolom..

Kromatografi Lapis Tipis

- a. Lempeng tipis dengan adsorben silika gel (KLT GF254) disiapkan dengan ukuran panjang 5 cm dan lebar yang disesuaikan dengan jumlah fraksi yang akan ditotolkan.
- b. Pada bagian atas dan bawah diberi tanda batas berupa garis dengan jarak 0.5 cm dari ujung tepi dengan menggunakan pensil. Garis tersebut merupakan garis atas dan bawah.
- c. Sampel yang akan dianalisis ditotolkan dengan pipa kapiler pada garis batas bagian bawah. Penotolan dilakukan berulang sampai cukup tebal agar pola pemisahan sampel terlihat jelas.

- d. *Chamber* kemudian diisi dengan eluen yang akan digunakan untuk mengelusi lempeng tipis kemudian dibiarkan beberapa saat dengan kondisi tertutup hingga *chamber* tersebut jenuh dengan uap eluen.
- e. Lempeng tipis yang telah disiapkan sebelumnya kemudian dimasukkan ke dalam *chamber* hingga bagian bawahnya tercelup sebagian ke dalam eluen. Lempeng tipis dilerakkan tegak bersandar pada dinding *chamber*.
- f. Eluen dibiarkan naik hingga mencapai garis batas atas. Lempeng diangkat dengan menggunakan pinset lalu dibiarkan kering di udara terbuka. Noda pada lempeng tipis dilihat dibawah sinar UV dan apabila tidak terlihat pendaran dibawah sinar UV maka dilakukan penyemprotan dengan asam sulfat 5% kemudian dimasukkan dalam oven agar terjadi reaksi oksidasi terhadap sampel dan akan menimbulkan noda pada lempeng.

Kromatografi Cair Vakum (KCV)

Pada fraksi heksan daging buah paria yang diperoleh dilakukan KLT dengan berbagai eluen. Eluen yang dipilih harus mampu memisahkan sampel dengan baik, hal tersebut ditandai dengan pola pemisahan yang terlihat pada kromatogram KLT. Setelah diperoleh eluen yang tepat maka dapat dilakukan KCV, tahapan dari KCV adalah sebagai berikut:

- a. Menimbang silika yang akan dimasukkan ke dalam kolom, berat silika yang dimasukkan tergantung diameter kolom.

- b. Silika dimasukkan ke dalam kolom di dalam lemari asam kemudian silika dipadatkan dengan cara dihisap menggunakan vakum kemudian ditekan sehingga kolom tidak berongga.
- c. Diatas permukaan silika dilapisi kertas saring, kemudian dielusi dengan menggunakan heksan 100% sebanyak 100 ml.
- d. Fraksi heksan padat sebanyak 4.1 gram diimpregnasi menggunakan pelarut aseton ke dalam silika impreg, dengan perbandingan massa sampel: massa silika impreg yaitu 1 : 2. silika yang digunakan untuk mengimpregnasi sampel berukuran 60-70 mesh.
- e. Kertas saring pada kolom diambil, lalu silika impreg dimasukkan kedalam kolom kemudian diratakan dan kertas saring tadi diletakkan diatas permukaan silika impreg.
- f. Sampel pada kolom dielusi dengan eluen yang telah ditentukan.
- g. Eluat ditampung dalam botol terpisah sesuai dengan volume eluen yang digunakan, kemudian diberi label.

Pada tahap ini diperoleh beberapa fraksi yang kemudian akan digabungkan berdasarkan kesamaan Rf pada analisa KLT hasil KCV.

Rekristalisasi

Jika hasil pemisahan dengan menggunakan kromatografi menghasilkan kristal, maka dapat dipisahkan dengan cara rekristalisasi. Rekristalisasi

dilakukan dengan cara menentukan kelarutan kristal dan pengotor pada berbagai pelarut. Setelah diketahui kelarutan kristal dan pengotor, mula-mula hasil pemisahan yang berupa kristal dilarutkan dengan pelarut yang dapat melarutkan pengotor dan kristal yang diinginkan, setelah itu larutan tersebut dijenuhkan dengan cara ditambahkan pelarut yang tidak melarutkan salah satu kristal atau dengan didinginkan jika rekristalisasi dilakukan dengan menggunakan kelarutan berdasarkan kenaikan suhu. Hasil rekristalisasi kemudian di KLT untuk menentukan kemurniannya.

3.3.4 Penentuan Karakterisasi Senyawa dalam Fraksi

Masing-masing fraksi di karakterisasi senyawa yang terdapat di dalamnya dengan beberapa cara, yaitu :

a. Pengukuran dengan Spektrometri FT-IR (*Fourier Transform-Infra Red*)

Pegukuran IR untuk mengetahui gugus-gugus fungsi yang terdapat dalam senyawa hasil pemisahan dan pemurnian fraksi heksan dari ekstrak metanol daging buah *M. charantia*. Penentuan gugus-gugus fungsi dilakukan dengan menggunakan Spektrometri FT-IR (*Fourier Transform-Infra Red*) Shimadzu 8400. Sampel dibuat pelet dengan cara mencampurkannya dengan KBr dan dibentuk menjadi pelet yang berbentuk seperti tablet. Sampel yang telah dibuat pelet dimasukkan ke dalam alat FT-IR (*Fourier Transform-Infra Red*) Shimadzu 8400

b. 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.