

## BAB III

### METODOLOGI PENELITIAN

#### 3.1 Objek dan Lokasi Penelitian

Objek atau bahan penelitian ini adalah daging buah paria (*Momordica charantia* L.) yang diperoleh dari Kampung Pipisan, Indramayu. Dan untuk memastikan identitas dari tanaman paria yang didapatkan maka dilakukan uji determinasi di Laboratorium Fisiologi Tumbuhan Jurusan Biologi FPMIPA UPI.

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

#### 3.2 Alat dan Bahan

##### 3.2.1 Alat

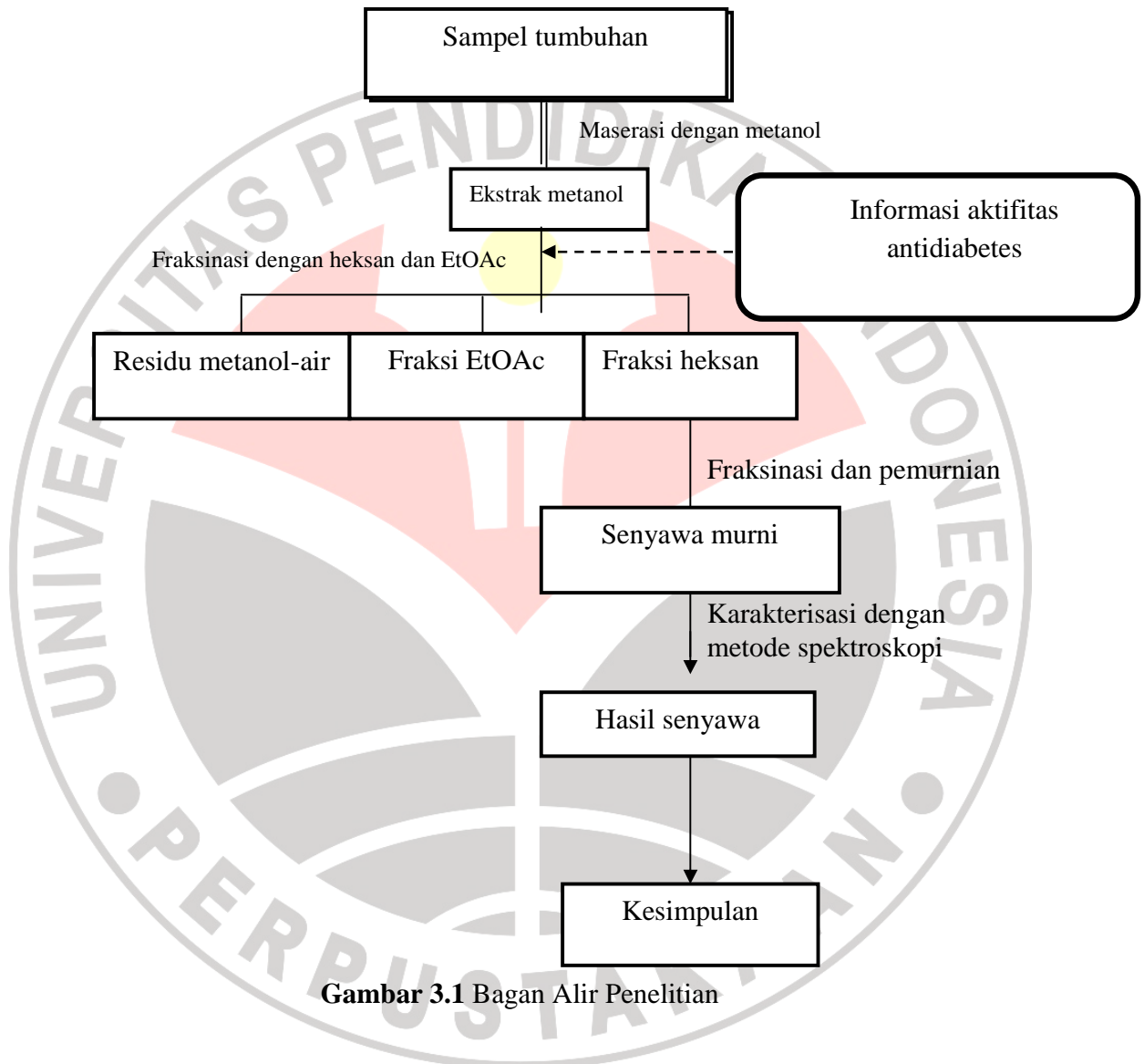
Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah peralatan gelas kimia, set alat destilasi, penguap putar vakum (*Rotatory evaporator vacuum*) Buchi, pompa vakum, kromatografi lempeng tipis, set alat gelas kromatografi cair vakum dan kromatografi *flash*, spektrofotometer FT-IR Shimadzu 8400, NMR <sup>1</sup>H JEOL ECA 500-500 MHz, dan NMR <sup>13</sup>C JEOL ECA 500-125 MHz.

##### 3.2.2 Bahan

Penelitian ini menggunakan bahan utama daging buah *Momordica charantia* Linn yang telah dikeringkan dan dihaluskan sebanyak 5,3 Kg. untuk bahan-bahan kimia yang digunakan terdiri dari bahan teknis dan bahan pro analis (p.a). Bahan berkualitas teknis didestilasi terlebih dahulu sebelum digunakan. Bahan kimia yang digunakan adalah metanol, heksan, aseton, etil asetat, kloroform, aseton, aquadest,

*silica gel 60 GF<sub>254</sub> for TLC, silica gel 60 230-400 mesh for CC. Kloroform terdeuterasi untuk analisis NMR.*

### 3.3 Bagan Alir Penelitian



**Gambar 3.1** Bagan Alir Penelitian

### 3.4 Cara Kerja

#### 3.4.1 Penyiapan Sampel

Tahap awal penelitian ini dimulai dengan pengambilan sampel buah paria (*Momordica charantia* Linn) dari daerah Indramayu. Sampel buah paria yang

digunakan dipetik langsung dari tanamannya lalu diiris tipis untuk selanjutnya dikeringkan di bawah sinar matahari. Sampel yang telah kering kemudian dihaluskan dengan blender hingga menjadi serbuk.

#### **3.4.2 Maserasi dan fraksinasi**

Serbuk daging buah paria kering sebanyak 5,3 Kg dimaserasi dengan menggunakan metanol teknis yang telah didestilasi sebanyak 3 kali masing-masing 1 liter. Ekstrak disaring lalu dipekatkan dengan *Rotary evaporator vacum* sampai didapat ekstrak pekat berwarna hijau. Selanjutnya ekstrak pekat metanol difraksinasi dengan menggunakan pelarut heksan dengan perbandingan ekstrak metanol:pelarut heksan 1:3, fraksi heksan yang diperoleh dipekatkan seperti perlakuan terhadap ekstrak metanol.

#### **3.4.3 Pemisahan dan Pemurnian Senyawa**

Pemisahan dan pemurnian senyawa dalam penelitian ini dilakukan melalui dua tahap yaitu kromatografi cair vakum dan kromatografi *flash*. Akan tetapi sebelum dilakukan proses keduanya, terlebih dahulu dilakukan kromatografi lempeng tipis untuk mencari eluen yang tepat.

##### **• Kromatografi Lapis Tipis (KLT)**

- 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. Bagian atas dan bawah diberi garis batas dengan jarak 0,5 cm dari ujung tepi lempeng tipis dengan menggunakan pensil.

- c. Sampel yang akan dianalisa ditotolkan dengan pipa kapiler tepat pada garis batas bagian bawah.
- d. *Chamber* (wadah proses KLT) kemudian didisi dengan eluen yang akan digunakan untuk mengelusi lempeng tipis kemudian dibiarkan beberapa saat dengan kondisi tertutup hingga *chamber* tersebut menjadi jenuh dengan eluen.
- e. Lempeng tipis yang telah disiapkan sebelumnya kemudian dimasukkan ke dalam *chamber* hingga bagian bawahnya terendam eluen. Lempeng tipis diletakkan tegak bersandar pada dinding *chamber*.
- f. Eluen dibiarkan naik hingga garis batas bagian atas. Lempeng diangkat dengan menggunakan pinset lalu dibiarkan kering di udara terbuka. Noda pada lempeng tipis dilihat di bawah sinar UV, selanjutnya dilakukan penyemprotan larutan asam 5% pada permukaan lempeng, selanjutnya dipanaskan di dalam oven sampai terlihat warna kecoklatan pada lempeng tipis.

• **Kromatografi Cair Vakum (KCV)**

Fraksi heksan buah paria yang diperoleh dilakukan proses KLT untuk dapat menentukan pelarut yang selanjutnya digunakan pada proses pemisahan menggunakan KVC.

- a. Silika dimasukkan ke dalam kolom di dalam lemari asam, kemudian dihisap menggunakan vakum hingga padat agar tidak terbentuk rongga pada silika dalam kolom.
- b. Di atas permukaan silika dilapis dengan kertas saring, kemudian dielus dengan menggunakan salah satu pelarut 100% sebanyak 100 mL.

- c. Sampel diimpregansi menggunakan pelarut yang cocok dan silika impreg, dengan perbandingan silika:impreg yaitu 1:2. silika yang digunakan untuk mengimpregansi sampel berukuran 60-70 mesh ASTM.
- d. Kertas saring pada kolom diambil, kemudian silika impreg dimasukkan kedalam kolom secara perlahan –lahan agar merata di bagian permukaan silika KCV dan kertas saring yang tadi diletakkan di atas silika impreg.
- e. Sampel pada kolom dielusi dengan eluen yang telah ditentukan.
- f. Eluat ditampung dalam botol terpisah sesuai dengan volume eluen yang digunakan, kemudian din beri label.

• **Kromatografi *Flash* (KF)**

Setelah proses KVC, fraksi yang belum murni dilakukan pemisahan dengan menggunakan kromatografi *flash* (KF). Fraksi yang dipilih untuk KF merupakan fraksi mayor. Eluen yang digunakan pada KF diperoleh dari hasil uji dengan menggunakan plat KLT.

a. *Packing* kolom

- Silika dengan ukuran 230-400 mesh dimasukkan ke dalam kolom sampai setinggi 17 cm.
- Kolom yang siap dipakai jika silika sudah membentuk gel, dengan cara mengalirkan eluen.
- Kolom siap dipakai dengan disisakan eluen setinggi  $\pm 3$  cm.

b. Impregnasi sampel

- Silika impreg ditimbang sebanyak 2 kali berat sampel.
- Sampel dilarutkan dengan aseton.

- Sampel dalam pipet diteteskan ke silika impreg diaduk-aduk hingga kering.
- c. Elusi
- Silika impreg dimasukkan ke dalam kolom dan diratakan.
  - Eluen yang telah ditentukan sebelumnya dimasukkan ke dalam kolom.
  - Kolom diberi tekanan dari atas, lalu hasil elusi ditampung pada botol 10 mL.
  - Elusi dihentikan apabila diperkirakan senyawa sudah terelusi oleh eluen.
- d. Pembersihan kolom
- Kolom dikeringkan dari eluen.
  - Silika di dalam kolom dibilas dengan pelarut yang lebih non polar terlebih dahulu dan dilanjutkan dengan pelarut yang paling polar hingga warna pelarut terakhir hasil bilasan menjadi tidak berwarna seperti semula, dan diakhiri dengan pelarut yang digunakan pertama sampai warna kolom seperti semula.

#### 3.4.4 Identifikasi Senyawa Murni

- **Pemeriksaan IR**

Pemeriksaan IR untuk mengetahui gugus-gugus fungsi yang terdapat dalam senyawa hasil isolasi dari daging buah *M. charantia*. Penentuan gugus-gugus fungsi dilakukan dengan menggunakan Spektrometri FT-IR (*Fourier Transform-Infra Red*) Shimadzu 8400.

- **Pemeriksaan NMR  $^1\text{H}$  dan  $^{13}\text{C}$**

Pemeriksaan NMR  $^1\text{H}$  dan  $^{13}\text{C}$  dilakukan untuk mengetahui gambaran berbagai jenis atom hidrogen dan karbon dalam molekul yang terdapat dalam fraksi heksan. Spektrum NMR  $^1\text{H}$  dan  $^{13}\text{C}$  dapat memberikan informasi jumlah atom hidrogen dan karbon serta struktur dari senyawa yang berhasil

diisolasi. Penentuan struktur senyawa dilakukan dengan menggunakan Spektrometri NMR  $^1\text{H}$  JEOL ECA 500-500 MHz dan NMR  $^{13}\text{C}$  JEOL ECA 500-125 MHz.

