

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan selama enam bulan, dimulai pada bulan Maret 2024 dan berakhir pada bulan Agustus 2024. Proses isolasi dan karakterisasi dilakukan di Laboratorium Riset Program Studi Kimia, FPMIPA, Universitas Pendidikan Indonesia.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Alat

Peralatan yang digunakan dalam tahap isolasi dan pemurnian pada penelitian ini meliputi berbagai alat laboratorium, seperti neraca analitik untuk mengukur massa dengan presisi tinggi, corong pisah dan corong Buchner untuk pemisahan dan penyaringan. Selain itu, digunakan juga gelas kimia berukuran 500 mL dan 250 mL, serta labu alas bulat berukuran 500 mL untuk tahap evaporasi. Pipa kapiler, pipet tetes, batang pengaduk, dan spatula digunakan untuk pengambilan dan pencampuran bahan. Botol vial dengan ukuran 250 mL, 100 mL, dan 10 mL, serta gelas ukur berkapasitas 100 mL dan 10 mL digunakan untuk penyimpanan dan pengukuran cairan. Proses pemisahan juga melibatkan penggunaan chamber Kromatografi Lapis Tipis (KLT), set *rotary evaporator*, set Kromatografi Cair Vakum (KCV), set Kromatografi Kolom Gravitasi (KKG), dan lampu UV dengan panjang gelombang 254 nm untuk analisis visual hasil kromatografi.

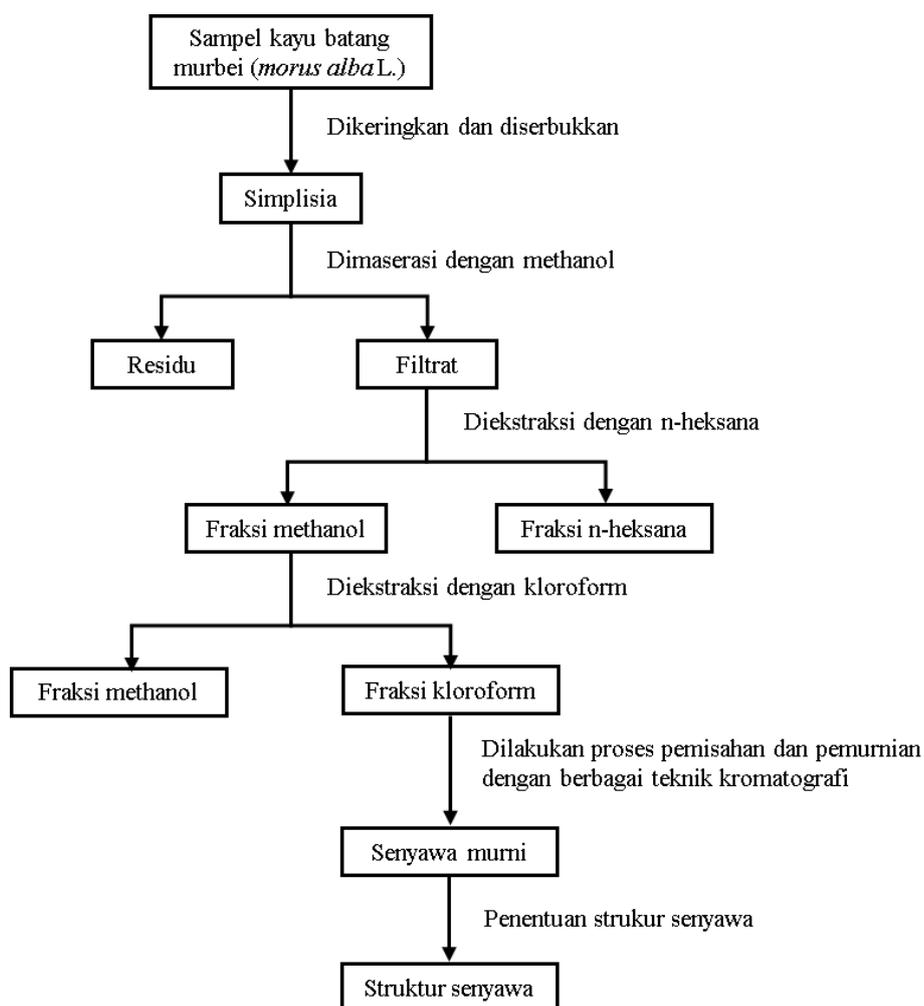
3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan untuk penelitian ini adalah ekstrak metanol kayu batang murbei (*morus alba* L.) asal Pemalang, Jawa Tengah. Bahan kimia lainnya yang digunakan pada penelitian ini diantaranya adalah pelarut methanol pro analisis dan teknis, etil asetat teknis, kloroform pro analisis, n-heksana teknis, aseton teknis dan pro analisis, dan aquadest. Adapun pada

tahap pemurnian digunakan bahan-bahan seperti silika gel 60 GF₂₅₄ untuk KCV.

3.3 Prosedur Penelitian

Tahap 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

Ada beberapa tahap yang dilakukan diantaranya yaitu ekstraksi, pemisahan dan pemurnian, dan karakterisasi senyawa hasil isolasi.

3.4.1 Ekstraksi

Kayu batang tanaman murbei putih (*Morus alba* L.) yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari Kabupaten Pemalang, Jawa Tengah, pada tahun 2023, dan telah dilakukan determinasi di Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, Institut Teknologi Bandung, Jawa Barat. Sebanyak 391,539 gram kayu batang murbei putih dikeringkan dan dihaluskan hingga menjadi serbuk simplisia. Serbuk simplisia ini kemudian diekstraksi menggunakan teknik maserasi dengan methanol teknis selama 2x24 jam, dengan pengambilan ekstrak setiap 1x24 jam. Ekstrak metanol yang diperoleh kemudian dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* vakum dan ditimbang untuk memperoleh massa total ekstrak metanol.

3.4.2 Pemisahan dan Pemurnian

3.4.2.1 Fraksinasi dan Pemurnian

Setelah mendapatkan massa ekstrak metanol pekat, kemudian 1,6 Liter ekstrak metanol pekat difraksinasi dengan teknik ekstraksi cair-cair menggunakan pelarut *n*-heksana. Hasil fraksi metanol sisa kemudian difraksinasi kembali dengan pelarut kloroform. Fraksi kloroform yang dipastakan memiliki massa 24,8036 gram lalu dilarutkan dalam aseton untuk selanjutnya dilakukan tahap Kromatografi Cair Vakum (KCV). Sebelum melakukan pemisahan dengan teknik KCV, fraksi kloroform dicek terlebih dahulu pada Kromatografi Lapis Tipis (KLT) untuk mengetahui eluen yang cocok.

Pada tahap KCV, fraksi kloroform yang telah dilarutkan dalam aseton kemudian diimpregnasi menggunakan silika gel. Teknik pemisahan KCV ini menggunakan kolom dengan diameter 7 cm. Eluen yang digunakan pada KCV dimulai dari *n*-heksana 100%, etil asetat 100%, dan campuran *n*-heksana dan etil asetat dengan perbandingan 9:1 sampai 1:1. Hasil dari KCV

pertama dicek kembali pada KLT, pola noda yang memiliki tinggi sama akan digabungkan dan ditimbang massanya. Teknik kromatografi yang dilakukan selanjutnya adalah dengan menggunakan Kromatografi Kolom Gravitasi (KKG) dan Kromatografi Lapis Tipis Preparatif.

Fraksi gabungan kloroform lalu dimurnikan kembali dengan kolom KCV yang memiliki diameter lebih kecil, Kromatografi Kolom Gravitasi, dan Kromatografi Lapis Tipis Preparatif hingga didapatkan fraksi akhir berupa isolat murni. Eluen pada tahap kromatografi dipilih sedemikian rupa sehingga sesuai untuk tahap pemurnian. Tahap penyesuaian eluen ini dilakukan beberapa kali dengan menggunakan KLT.

3.4.2.2 Analisis Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Analisis menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dilakukan dengan tujuan agar dapat diketahui perkiraan jumlah komponen yang dapat diisolasi, menetapkan perbandingan eluen untuk tahap 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 spektrometer *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR) 1D (¹H-NMR).