

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Lokasi Penelitian

Waktu penelitian dimulai dari bulan Desember 2014 sampai Mei 2015. Lokasi penelitian dilakukan di berbagai tempat, antara lain :

- a. Proses preparasi sampel dan ekstraksi dilakukan di Laboratorium Riset Kimia Hayati FPMIPA Universitas Pendidikan Indonesia.
- b. Proses pemisahan dan pemurnian, standarisasi simplisia dilakukan di Laboratorium Riset Kimia Hayati FPMIPA Universitas Pendidikan Indonesia dan Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Bandung.
- c. Proses karakterisasi senyawa yaitu pengujian spektroskopi IR dilakukan di Laboratorium Kimia Instrumen FPMIPA Universitas Pendidikan Indonesia dan pengujian spektroskopi NMR dilakukan di Institut Teknologi Bandung.

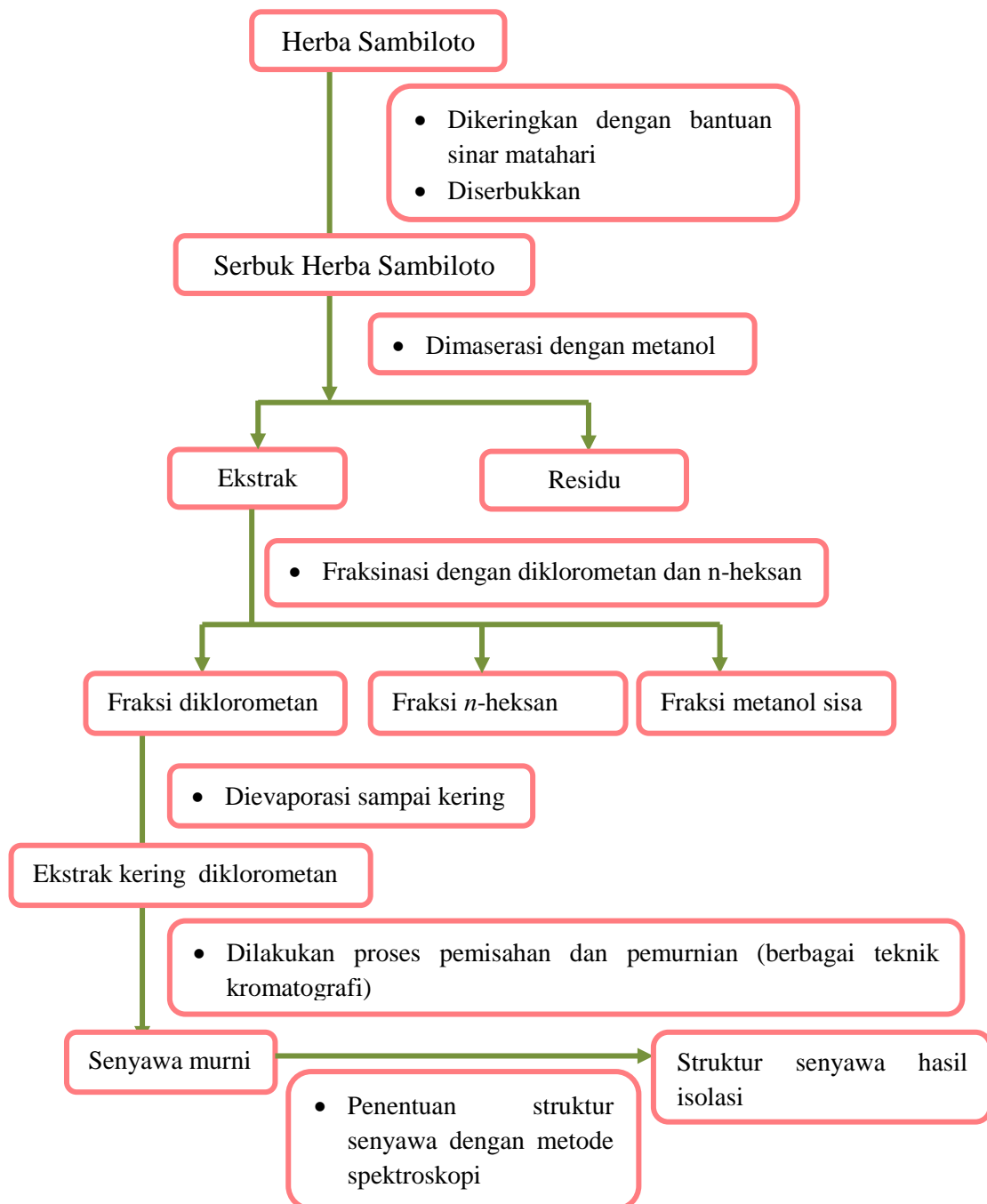
3.2 Alat dan Bahan Penelitian

Dalam penelitian ini digunakan beberapa peralatan yaitu alat-alat gelas, set peralatan destilasi, *vacuum rotary evaporator*, corong buchner, set peralatan Kromatografi Kolom Gravitasi, set peralatan Kromatografi Cair Vakum dengan ukuran diameter kolom 5 cm dan 7 cm, set instrumen *Infra Red* yaitu FTIR SHIMADZU 8400, dan set instrumen NMR yaitu NMR AGILENT 500 MHz (^1H NMR) dan 125 MHz (^{13}C NMR).

Sampel yang digunakan berupa herba tumbuhan sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.) yaitu seluruh bagian tanaman berupa akar, batang, dan daun yang diperoleh dari daerah Kota Bandung, Jawa Barat yang dikumpulkan pada bulan Desember 2014. Sedangkan bahan kimia yang digunakan antara lain berbagai pelarut organik meliputi metanol, *n*-heksan, etil asetat, diklorometana, dan aseton yang diperoleh dalam grade teknis (yang kemudian dilakukan destilasi) dan pro analis (p.a). Selain itu, digunakan berbagai jenis silika gel, antara lain silika gel Merck 60 (70-230 *mesh*) for *chromatography column*, silika gel Merck 60 PF₂₅₄ *containing gypsum for preparative layer chromatography*, dan plat KLT *silica gel* 60 GF₂₅₄ dengan ketebalan 0,25 mm.

3.3 Prosedur Penelitian

Penelitian yang dilakukan meliputi beberapa tahapan penelitian, yaitu preparasi sampel, ekstraksi dan fraksinasi, pemisahan dan pemurnian, serta karakterisasi senyawa dengan metode spektroskopi. Tahapan yang dilakukan pada penelitian ini ditunjukkan pada bagan alir penelitian gambar 3.1. Uraian dari masing-masing tahapan yang dilakukan adalah sebagai berikut :



Gambar 3.1 Bagan Alir Penelitian

3.3.1 Preparasi Sampel

Sampel herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.) dikumpulkan dari pasar di wilayah Kota Bandung, Jawa Barat. Herba sambiloto yang telah diperoleh ditimbang untuk mengetahui massa awal sampel. Kemudian herba sambiloto tersebut dibersihkan lalu dikeringkan dan diserbukkan.

3.3.2 Ekstraksi dan Fraksinasi

Serbuk herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.) diekstraksi menggunakan pelarut metanol. Teknik ekstraksi yang digunakan yaitu ekstraksi padat-cair dengan metode maserasi. Sampel direndam dalam pelarut metanol dengan perbandingan 3:1 terhadap jumlah sampel dengan waktu perendaman selama 2x24 jam dan dilakukan berulang sebanyak 3 kali. Ekstrak hasil maserasi kemudian disaring menggunakan corong Buchner lalu dipekatkan menggunakan *vacuum rotary evaporator*. Ekstrak metanol hasil evaporasi kemudian dilarutkan kembali dengan metanol dan difraksinasi cair-cair menggunakan diklorometan dan *n*-heksan sehingga diperoleh fraksi *n*-heksan, fraksi diklorometan, dan fraksi metanol sisa. Masing-masing ekstrak tersebut kemudian dipekatkan dengan cara penguapan menggunakan alat *vacuum rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak pekat dari masing-masing fraksi.

3.3.3 Pemisahan dan Pemurnian

Dalam tahap pemisahan dan pemurnian senyawa murni dilakukan dua tahapan kromatografi, antara lain Kromatografi Cair Vakum (KCV) (dengan kolom 7 cm dan dengan kolom 5 cm) dan Kromatografi Kolom Gravitasi (KKG). Sebelum dilakukan tahapan pemisahan dilakukan uji kromatografi lapis tipis terlebih dahulu untuk menentukan eluen yang tepat.

3.3.4 Karakterisasi Senyawa dengan Metode Spektroskopi

Pada penentuan struktur senyawa, dilakukan beberapa tahapan yaitu senyawa murni yang diperoleh dari hasil isolasi dikarakterisasi menggunakan beberapa teknik spektroskopi antara lain spektroskopi *Infra Red* (IR), dan spektroskopi NMR (*Nuclear Magnetic Resonance*) (^1H dan ^{13}C NMR). untuk mengidentifikasi struktur senyawa yang telah berhasil diisolasi.