

## BAB III METODE PENELITIAN

### A. Objek dan Lokasi Penelitian

Objek atau bahan yang digunakan untuk penelitian ini adalah tanaman dengan kode AGF yang diperoleh dari daerah Cihideng-Bandung. Penelitian berlangsung sekitar 9 bulan, terhitung dari bulan November 2014 sampai Juli 2015. Penelitian ini terdiri dari tiga tahap yaitu tahap preparasi sampel, tahap ekstraksi dan pemisahan, dan tahap analisis dan karakterisasi.

Tempat penelitian pada masing-masing tahapan berbeda-beda, antara lain : Tahap preparasi sampel, ekstraksi dan pemisahan dilakukan di Laboratorium Riset Kimia Makanan FPMIPA UPI Bandung dan di Laboratorium Institut Teknologi Bandung. Sedangkan tahap analisis dan karakterisasi dilakukan di Laboratorium Kimia Instrumen Departemen Pendidikan Kimia FPMIPA UPI Bandung.

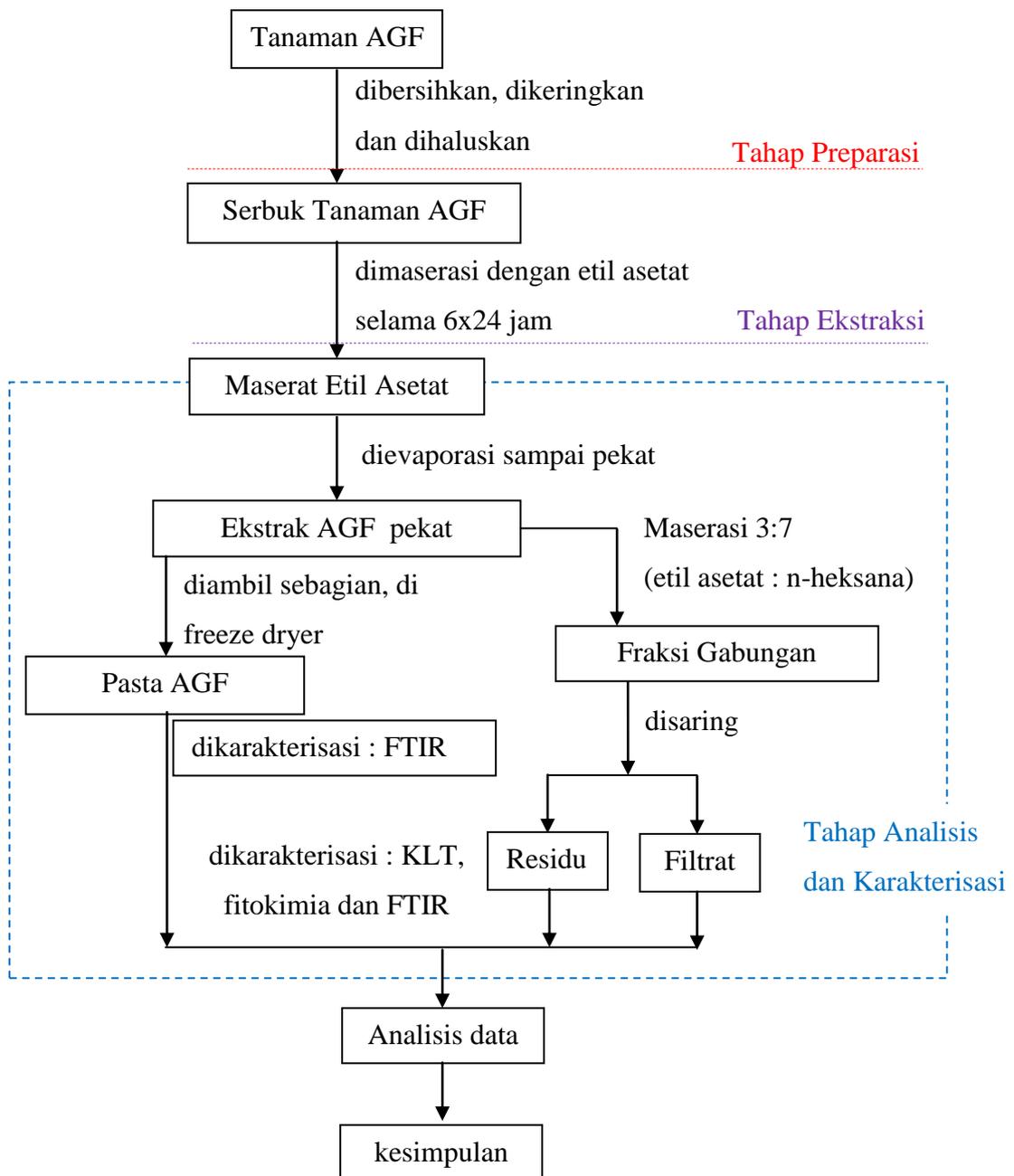
### B. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan adalah gelas kimia (200 mL, 500 mL, 1L dan 3L), gelas ukur (10 mL, 100 mL dan 500 mL), kaca arloji, timbangan digital, botol semprot, kertas saring, kertas label, spatula, batang pengaduk, plastik *wraps*, aluminium *foil*, pipet tetes, lumpang dan alu, labu erlenmeyer 1 L, labu erlenmeyer berpenghisap, corong buchner, mantel (pemanas listrik), *magnetic stirrer*, set alat destilasi, set alat evaporator, pompa vakum, botol kaca 1L, botol pial 20 ml, tabung reaksi, rak tabung, penjepit tabung reaksi, pinset, *chamber*, set alat freeze dryer Eyela FD-5N, spektroskopi FTIR (Shimadzu 8400).

Bahan utama yang digunakan adalah ekstrak dari tanaman dengan kode AGF, sedangkan bahan kimia yang digunakan untuk tahap maserasi dan pemisahan ialah etil asetat teknis, n-heksana teknis, lempeng tipis KLT, dan pada skrining fitokimia digunakan pereaksi Mayer, pereaksi Wagner, aquades, HCl 1%, larutan FeCl<sub>3</sub>, kloroform, dan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M.

### **C. Prosedur Penelitian**

Tahap penelitian ini dibagi menjadi tiga tahap utama, yakni pertama tahap preparasi sampel tanaman AGF, Kedua tahap ekstraksi dan pemisahan dengan menggunakan metode maserasi, dan ketiga tahap analisis dan karakterisasi dengan menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT), skrining fitokimia, dan spektroskopi FTIR. Bagan alur penelitian secara umum dapat dilihat pada Gambar 3.1 di bawah ini.



**Gambar 3.1.** Bagan Alur Penelitian

Uraian dari masing-masing langkah kerja adalah sebagai berikut :

### **1. Penyiapan Sampel Tanaman AGF**

Sampel tanaman AGF yang akan digunakan dibersihkan terlebih dahulu dari kotoran seperti tanah dan tanaman parasit lain. Setelah itu dirajang kemudian dijemur sampai kering. Selanjutnya tanaman dihaluskan dengan cara ditumbuk dengan menggunakan lumpang dan alu hingga menjadi serbuk. Serbuk tanaman AGF kemudian diayak agar serbuk tersebut menjadi halus dan memiliki ukuran yang homogen sebelum dimaserasi.

### **2. Ekstraksi Tanaman AGF dengan Metode Maserasi**

Metode yang digunakan untuk mengekstrak AGF adalah dengan metode maserasi. Metode maserasi merupakan metode ekstraksi padat-cair. Serbuk tanaman AGF ditimbang sebanyak 1,5 kg kemudian diekstraksi menggunakan pelarut etil asetat. Pelarut etil asetat yang di gunakan adalah sebanyak 9.250 mL pada hari pertama atau hingga seluruh serbuk terendam. Setelah satu hari proses perendaman, maserat kemudian disaring menggunakan corong buchner sehingga diperoleh ekstrak AGF etil asetat dan residunya. Residu yang dihasilkan di maserasi kembali dengan etil asetat sebanyak 6.035 mL. Kemudian disaring dan residu yang diperoleh di maserasi kembali dengan 5.405 mL etil asetat selama 6x24 jam. Filtrat hasil maserasi keseluruhan dipekatkan hingga menjadi 245 ml dengan menggunakan *vacum rotary evaporator*.

Kedalam maserat pekat yang diperoleh ditambahkan pelarut etil asetat dan n-heksana dengan perbandingan 3:7 sampai volume 500 mL, dikocok menggunakan *magnetic stirrer*. Hal ini dilakukan untuk menghomogenkan ekstrak AGF tersebut. Kemudian dilakukan penyaringan dengan menggunakan corong *buchner* dan hasilnya dikarakterisasi dengan metode kromatografi lapis tipis, skrining fitokimia, dan spektroskopi FTIR.

### **3. Analisis Ekstrak AGF dengan Metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT)**

Tahap analisis yang dilakukan adalah dengan metode KLT. Adapun langkah kerja yang dilakukan adalah sebagai berikut :

Kromatografi lapis tipis digunakan dalam penentuan eluen yang tepat untuk proses pemisahan (fraksinasi) dengan teknik KVC. Selain itu, KLT juga digunakan untuk menganalisis senyawa hasil pemisahan dengan KVC telah terpisah dengan baik atau telah murni.

Dalam pengerjaannya, lempeng tipis dengan silika gel 60 F<sub>245</sub> disiapkan dengan ukuran panjang 5 cm sedangkan lebarnya 1 cm. Pada bagian atas dan bawah lempeng diberi garis atas dengan jarak 0,5 cm dari tepi lempeng. Sampel yang akan dianalisis ditotolkan pada bagian tengah garis batas bawah dengan menggunakan pipa kapiler. Lakukan penotolan berulang kali hingga cukup tebal dan dibiarkan beberapa saat agar kering. *Chamber* diisi dengan eluen yang akan digunakan untuk mengelusi lempeng tipis, dihomogenkan, dan didiamkan beberapa saat dengan kondisi tertutup agar *chamber* jenuh dengan uap eluen. Lempeng tipis yang telah disiapkan sebelumnya, kemudian dimasukkan ke dalam *chamber* dengan menggunakan pinset hingga bagian bawah lempeng tercelup sebagian. Lempeng tipis tersebut diletak tegak bersandar pada dinding *chamber* kemudian ditutup.

#### **4. Karakterisasi Fraksi AGF dengan skrining Fitokimia dan Spektroskopi FTIR**

Karakterisasi yang di lakukan adalah dengan skrining fitokimia dan spektroskopi FTIR. Adapun langkah kerja yang di lakukan adalah sebagai berikut:

##### **a. Karakterisasi Fraksi Ekstrak AGF dengan Skrining Fitokimia**

Fraksi gabungan (FG) bionutrien AGF hasil dari tahap pemisahan, diidentifikasi komponen fitokimianya dengan metode uji warna. Uji fitokimia ini bertujuan untuk mengetahui kelompok senyawa metabolit sekunder yang terkandung di dalam FG bionutrien AGF. Skrining fitokimia ini dilakukan terhadap metabolit sekunder golongan alkaloid, tanin, dan terpenoid.

Adapun prosedur kerja yang dilakukan adalah sebagai berikut :

##### **1) Identifikasi Alkaloid**

Sebanyak 3 mL konsentrat etil asetat FG bionutrien AGF dimasukkan masing-masing ke dalam tabung reaksi A dan B. Kemudian di campurkan dengan 3 mL HCl 1 % di dalam *steam bath*. Tabung reaksi A ditambahkan

pereaksi mayer dan tabung reaksi B ditambahkan pereaksi Wagner. Terbentuknya endapan putih mengindikasikan adanya alkaloid (Kavit Mehta, B.N. Patel, B.K. Jain, 2013).

a) Pembuatan Pereaksi Mayer

Sebanyak 1 gram KI dialurkan dalam 20 mL aquades. Kemudian ditambahkan 0,2 gram  $\text{HgCl}_2$  dan diaduk hingga larut (Fadlie M., 2011).

b) Pembuatan Pereaksi Wegner

Sebanyak 2,5 gram  $\text{I}_2$  dan 2 gram KI dimasukkan ke dalam 10 mL aquades. Kemudian dilarutkan dan diencerkan dengan aquades hingga mencapai volume 200 mL (Diana K.M., Pringgenies D., Karna O.R., 2012)

2) Identifikasi Tanin

Sebanyak 2 mL konsentrat dicampurkan dengan 2 mL aquades. Campuran tersebut ditambahkan sedikit larutan  $\text{FeCl}_3$ . Terbentuknya endapan berwarna hijau menunjukkan adanya tanin (Kavit Mehta, *et.al.*, 2013).

3) Identifikasi Terpenoid

Sebanyak 2 mL konsentrat ditambahkan 2 mL Kloroform dan dievaporasi hingga kering. Setelah itu ditambahkan 2 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  dan dipanaskan kembali selama 2 menit. Terbentuknya warna keabu-abuan menunjukkan adanya terpenoid (Kavit Mehta, *et.al.*, 2013).

#### **b. Karakterisasi Fraksi AGF dengan Spektroskopi FTIR**

FG bionutrien AGF dikarakterisasi dengan menggunakan spektroskopi FTIR untuk mengetahui gugus fungsi yang terkandung dalam senyawa yang terdapat pada FG bionutrien AGF. Alat spektroskopi FTIR yang digunakan adalah FT-IR Shimadzu 8400.