

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Objek dan Tempat Penelitian

Objek atau bahan yang digunakan untuk penelitian ini adalah tanaman AGF yang diperoleh dari daerah Soreang dan Sumedang. Tempat penelitian menggunakan empat laboratorium, antara lain Laboratorium Riset Kimia Lingkungan FPMIPA UPI Bandung, Laboratorium Kimia Organik dan Biokimia FPMIPA UPI Bandung, Laboratorium Kimia Instrumen FPMIPA UPI Bandung dan Laboratorium *Basic Science* FMIPA ITB Bandung.

3.2 Alat Bahan

3.2.1 Alat

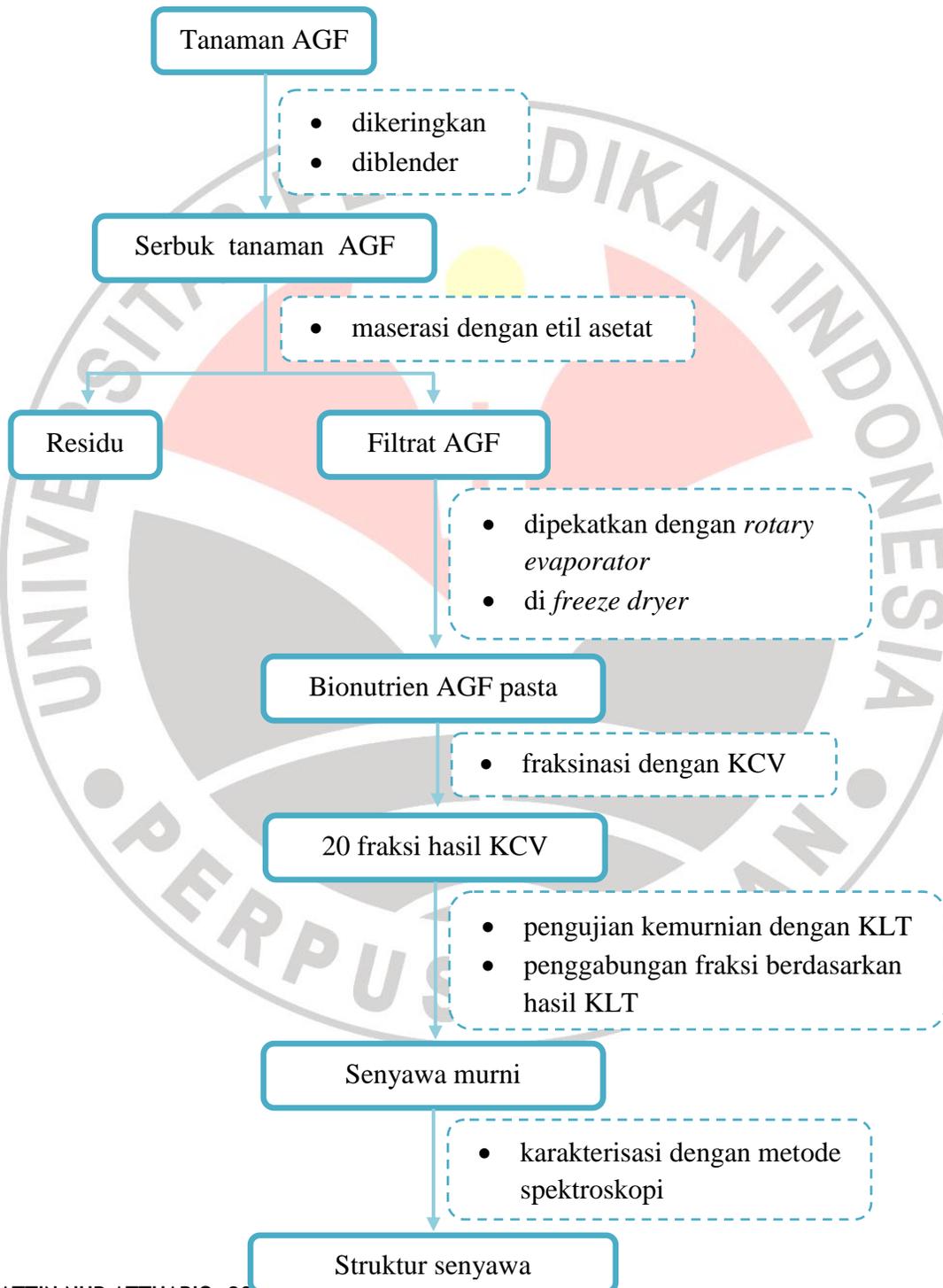
Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi alat-alat gelas, penguap berputar vakum (*vacuum rotary evaporator*), pompa vakum, set alat destilasi, set alat kromatografi kolom cair vakum (KCV) diameter 7 cm, set alat *Freeze Dryer* Eyela FD-5N, Spektrofotometer FT-IR (*Fourier Transform-Infra Red*) Shimadzu 8400, GS-MS Shimadzu QP-5050 *series* Class-5000 Ver 2.2 dan Agilent NMR (*Nuclear Magnetic Resonance*) 500MHz DD2 *system*.

3.2.2 Bahan

Pada penelitian ini, bahan utama yang digunakan adalah tanaman AGF. Bahan dengan kualitas teknis seperti etil asetat dan n-heksana didestilasi terlebih dahulu sebelum digunakan. Bahan-bahan lain yang digunakan adalah aseton, *silica gel* 60 GF₂₅₄ *for TLC*, *silica gel* 60 230–400 mesh *for CC*, kloroform p.a, diklorometana p.a, methanol p.a, aquades dan kertas saring.

3.3 Alur Penelitian

Pelaksanaan penelitian dilakukan dengan beberapa tahapan. Tahapan tersebut yaitu penyiapan sampel, ekstraksi, pemisahan dan pemurnian, karakterisasi dengan metode spektroskopi. Bagan alir penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.1. berikut.



Gambar 3.1 Bagan alir penelitian

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

3.3.1 Penyiapan Sampel Tanaman AGF

Sebelum melakukan tahapan isolasi, dilakukan persiapan sampel yang akan digunakan. Tanaman AGF dibersihkan kemudian dikeringkan selama \pm 3-4 minggu (hingga benar-benar kering). Pengeringan dilakukan pada temperatur kamar. Selanjutnya tanaman dihaluskan dengan cara *diblender* sehingga menjadi serbuk tanaman AGF.

3.3.2 Ekstraksi

Serbuk tanaman AGF ditimbang sebanyak 1 kg kemudian diekstraksi menggunakan pelarut etil asetat. Teknik ekstraksi yang digunakan ialah ekstraksi cair-padat dengan metode maserasi. Pelarut etil asetat yang digunakan adalah sebanyak 4 L (hingga seluruh serbuk terendam). Setelah satu hari proses perendaman, filtrat kemudian dipisahkan sehingga terdapat ekstrak AGF dan residunya. Residu yang dihasilkan dimaserasi kembali dengan etil asetat sampai berulang lima kali. Ekstrak hasil maserasi keseluruhan kemudian disaring. Filtrat yang diperoleh dipekatkan menjadi 500 mL menggunakan penguap berputar vakum (*vacuum rotary evaporator*).

3.3.3 Pemisahan dan Pemurnian

Pemisahan dan pemurnian senyawa dalam penelitian ini dilakukan menggunakan metode kromatografi vakum cair. Sebelum dilakukan proses pemisahan dilakukan terlebih dahulu kromatografi lapis tipis untuk menentukan

ATTIN NUR ATTHARIQ, 2013

Isolasi dan identifikasi senyawa metabolit sekunder
Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu

eluen yang tepat pada proses pemisahan menggunakan kromatografi kolom.

a. Kromatografi Lapis Tipis

Chamber diisi dengan eluen yang akan digunakan untuk mengelusi lempeng KLT dan biarkan dalam kondisi tertutup hingga *chamber* jenuh dengan uap eluen. Lempeng KLT dengan adsorben silika gel 60 GF₂₅₄ disiapkan dengan ukuran panjang 7 cm dan lebar yang disesuaikan dengan jumlah fraksi yang akan ditotolkan. Beri garis sebagai tanda batas dengan jarak 1 cm pada bagian atas dan bawah menggunakan pensil. Totolkan pada garis batas bagian bawah sampel yang akan dianalisis menggunakan pipa kapiler. Lakukan penotolan berulang kali sampai cukup tebal.

Lempeng KLT yang telah siap kemudian dimasukkan ke dalam *chamber* hingga bagian bawahnya tercelup sebagian ke dalam eluen. Lempeng KLT diletakkan tegak bersandar pada dinding *chamber*. 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.

b. Kromatografi Cair Vakum (KCV)

Silika gel 60 230–400 mesh ditimbang sebanyak 100 g. Bionutrien AGF pasta sebanyak 20 g diimpregnasi menggunakan pelarut aseton ke dalam silika impreg. Silika impreg dimasukkan kedalam kolom kemudian diratakan dan letakkan kertas saring di atas permukaan silika impreg. Sampel pada kolom dielusi dengan eluen yang telah ditentukan. Eluat ditampung dalam botol terpisah sesuai dengan

ATTIN NUR ATTHARIQ, 2013

Isolasi dan identifikasi senyawa metabolit sekunder
Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu

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.

3.3.4 Karakterisasi dengan Metode Spektroskopi

Fraksi yang telah murni berdasarkan hasil KLT dikarakterisasi senyawa yang terdapat di dalamnya dengan menggunakan spektroskopi IR, NMR dan MS. Untuk spektroskopi IR menggunakan alat FTIR Shimadzu 8400, dan Agilent NMR 500MHz DD2 *system* yang beroperasi pada 500 MHz (^1H) dan 125 MHz (^{13}C) Jeol ECA-500. Sedangkan spektroskopi massa menggunakan alat GS-MS Shimadzu QP-5050 *series* Class-5000 Ver 2.2.