

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan selama 5 bulan dimulai dari bulan Maret 2022 sampai dengan bulan Juli 2022. Lokasi penelitian dilakukan pada dua tempat, antara lain:

- a. Proses pemisahan dan pemurnian senyawa dilakukan di Laboratorium Kimia Organik dan Biokimia FPMIPA Universitas Pendidikan Indonesia.
- b. Proses karakterisasi senyawa murni yaitu dengan pengujian spektroskopi NMR dilakukan di Laboratorium Institut Teknologi Bandung.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Alat

Dalam penelitian beberapa peralatan yang digunakan yaitu gelas kimia, gelas ukur, labu Erlenmeyer, pipet tetes, neraca analitik, spatula, batang pengaduk, corong buchner, corong pisah, pinset, gunting, *cutter*, botol vial 5 mL, 20 mL, 50 mL dan 100 mL, chamber kecil untuk kromatografi lapis tipis (KLT), chamber besar untuk kromatografi lapis tipis preparatif (KLTP), lampu UV 254 nm, set peralatan *vacuum rotatory evaporator*, set peralatan kromatografi cair vakum (KCV), serta set instrument NMR 1D dan NMR 2D.

3.2.2 Bahan

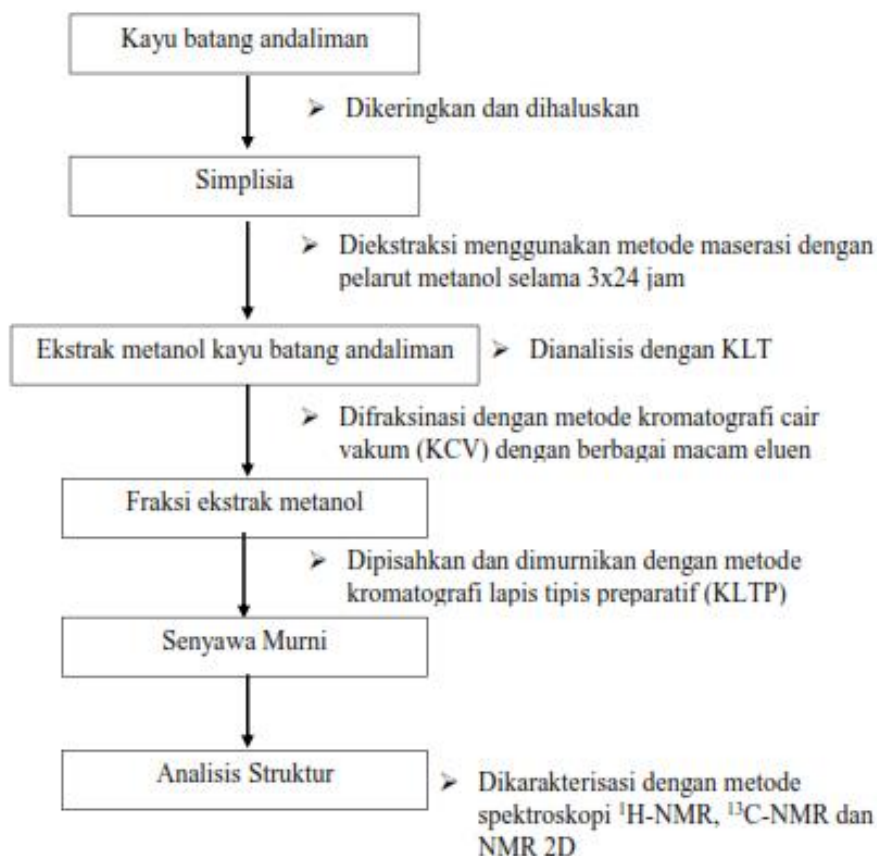
Pada penelitian ini bahan tumbuhan yang digunakan berupa kayu batang andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium*) yang diperoleh dari Toba Samosir, Sumatera Utara pada tahun 2018. Tumbuhan ini kemudian dideterminasi di Herbarium Bogoriense, Pusat Penelitian Biologi, LIPI, Cibinong, Jawa Barat.

Bahan-bahan lain yang digunakan antara lain terdiri atas beberapa pelarut teknis yaitu metanol, n-heksana, etil asetat teknis dan

pro analysis, serta aseton. Pada proses pemisahan dan pemurnian digunakan berbagai ukuran dan jenis silika gel, antara lain silika gel 60 GF₂₅₄ untuk kromatografi cair vakum, silika gel 60 GF₂₅₄ dengan ketebalan 0,25 mm untuk kromatografi lapis tipis dan silika gel berukuran 70-230 mesh untuk impregnasi.

3.3 Prosedur Penelitian

Penelitian dilakukan dalam beberapa tahapan yaitu preparasi sampel, pemisahan, pemurnian dan karakterisasi senyawa murni dengan berbagai metode spektroskopi NMR. Tahapan penelitian ditunjukkan dalam bagan alir pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1 Bagan Alir Penelitian

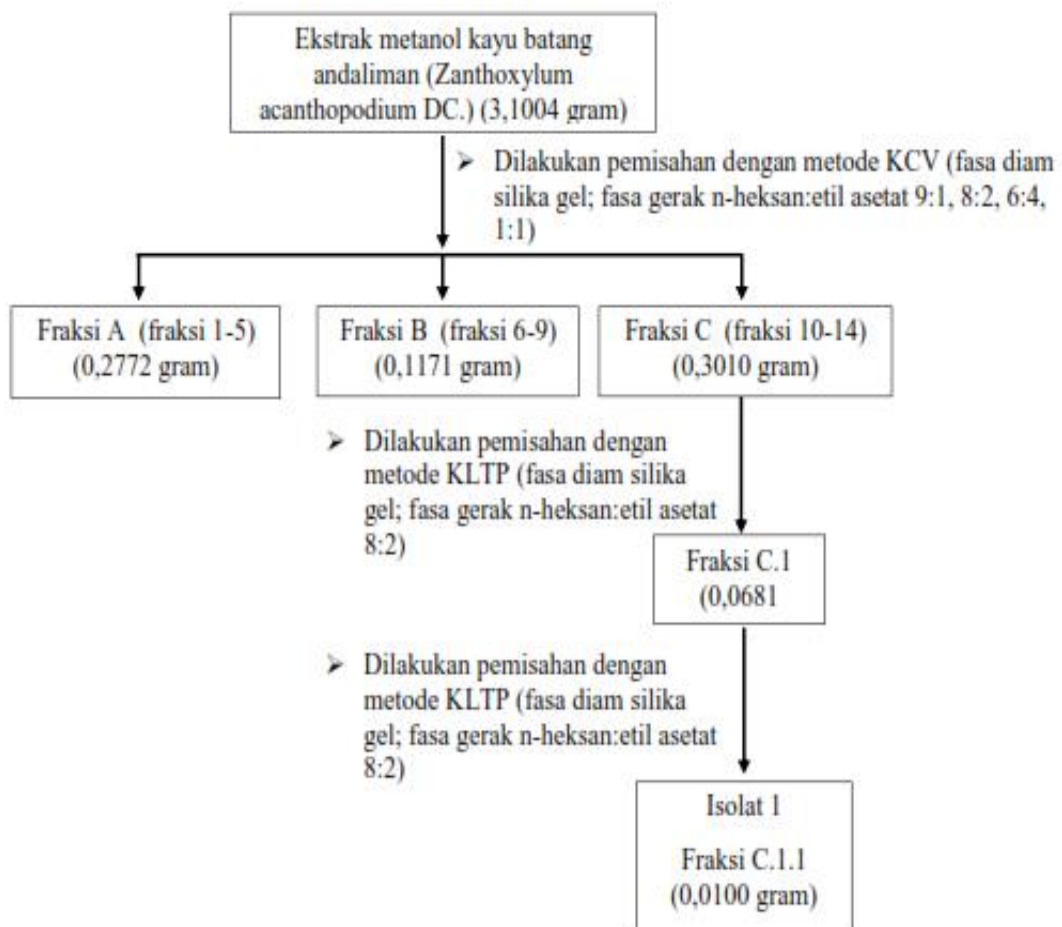
3.3.1 Persiapan Bahan dan Ekstraksi Sampel

Kayu batang andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium*) basah sebanyak 8 kg yang diperoleh dari Sumatera Utara dibersihkan dan dikeringkan kemudian dihasilkan 3 kg kayu batang andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium*) kering lalu dihaluskan dan diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut metanol selama 3×24 jam dengan pengambilan ekstrak setiap 24 jam sekali. Ekstrak metanol kayu batang andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium*) kemudian dipekatkan dengan menggunakan *vacuum rotatory evaporator* dan didapat ekstrak metanol hasil evaporator dan ditimbang massanya. Proses persiapan dan ekstraksi sampel ini dilakukan oleh peneliti sebelumnya sehingga penulis sudah mendapatkan ekstrak sampel yang telah tersedia.

3.3.2 Pemisahan dan Pemurnaian Senyawa Murni

Pemisahan dan pemurnian dilakukan dengan berbagai metode kromatografi yaitu kromatografi cair vakum (KCV) dan kromatografi lapis tipis preparatif (KLTP). Sebelum dilakukan pemisahan, ekstrak metanol kayu batang andaliman yang telah diperoleh dilakukan kromatografi lapis tipis (KLT) terlebih dahulu untuk menentukan eluen mana yang cocok digunakan dalam tahap pemisahan dengan kromatografi cair vakum (KCV). Pemisahan dengan kromatografi cair vakum (KCV) dilakukan dengan menggunakan kolom berdiameter 7 cm dengan eluen n-heksana, etil asetat dan metanol. Fraksi hasil kromatografi cair vakum (KCV) yang memiliki pola noda yang sama kemudian digabungkan dan dipekatkan menggunakan *vacuum rotatory evaporator* dan ditimbang massanya. Proses pemisahan ini dibantu dengan teknik kromatografi lapis tipis untuk mendeteksi senyawa aromatik yang kemudian diidentifikasi menggunakan pendaran sinar

UV pada panjang gelombang 254 nm. Fraksi yang teridentifikasi mengandung senyawa aromatik dijadikan fraksi target yang kemudian akan dipisahkan dan dimurnikan kembali dengan teknik kromatografi lapis tipis preparatif (KLTP) dengan eluen n-heksan dan etil asetat sehingga didapatkan senyawa murni. Tahapan proses pemisahan dan pemurnian ekstrak metanol kayu batang andaliman dapat dilihat dalam bagan alir pada Gambar 3.2.



Gambar 3.2. Bagan alir proses pemisahan dan pemurnian

3.3.3 Karakterisasi Senyawa Murni

Senyawa murni yang berhasil diisolasi dikarakterisasi dengan menggunakan berbagai macam spektroskopi NMR, seperti

spektroskopi resonansi magnet inti proton (^1H -NMR), spektroskopi resonansi magnet inti karbon (^{13}C -NMR), *Heteronuclear Single Quantum Coherence* (HSQC) dan *Heteronuclear Multiple Bond Connectivity* (HMBC).