

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Sampel, Bahan dan Alat

3.1.1. Sampel

Sampel berupa rimpang bengle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) yang diperoleh dari daerah Ungaran, Kab. Semarang, Jawa Tengah.

3.1.2. Bahan

Bahan yang digunakan adalah n-heksan t, metanol t, etil asetat t, akuades sebagai pelarut, pereaksi Liebermann-Burchard, pereaksi Meyer, logam Mg, HCl, NaOH dan FeCl₃ sebagai reagen skrining fitokimia, silika gel GF₂₅₄ sebagai fasa diam kolom vakum dan TLC preparatif, plat TLC E. Merck GF₂₅₄ untuk uji noda, metanol p.a., etil asetat p.a., dan n-heksan p.a. sebagai eluen TLC.

3.1.3. Alat

Penelitian ini menggunakan peralatan laboratorium yang umum, satu set alat soxhlet untuk pembebasan lemak, satu set alat maserasi, evaporator putar Buchii, kromatografi kolom vakum dan TLC preparatif untuk pemisahan senyawa, plat TLC untuk pemeriksaan noda, lampu UV Spektroline, spektrofotometer UV-Vis SHIMADZU dan GC-MS GP5000 SHIMADZU untuk identifikasi senyawa hasil isolasi.

3.2. Metode Kerja

Penelitian dilakukan di laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia FMIPA Universitas Diponegoro, analisis spektroskopi UV dan GC-MS dilakukan di laboratorium Kimia Organik Universitas Gadjah Mada.

3.2.1. Perlakuan Awal Sampel

Rimpang bengle segar sebanyak 3 kg dibersihkan, diiris halus dan dikeringkan pada temperatur kamar dengan cara diangin-anginkan. Setelah kering, rimpang tersebut dihaluskan sehingga didapatkan serbuk bengle kering sebanyak 700 g.

Serbuk bengle tersebut dibebaskan dari lemak dengan menggunakan pelarut n-heksan dengan cara penyarian berkesinambungan selama 4 jam. Selanjutnya serbuk bengle diekstraksi dengan pelarut metanol dengan metode maserasi. Hasil ekstraksi tersebut diuapkan pelarutnya dengan evaporator putar sampai berbentuk pasta dan kemudian dilanjutkan dengan penguapan alami dengan aliran udara bebas.

Terhadap ekstrak metanol tersebut kemudian dilakukan penapisan fitokimia terhadap golongan flavonoid, alkaloid, tanin, terpenoid, kuinon dan saponin dan diekstraksi partisi dengan pelarut etil asetat dan air. Ekstrak etil asetat yang didapat selanjutnya dipekatkan dan dianalisis lebih lanjut.

3.2.2. Pembuatan Pereaksi

Pereaksi yang dibuat untuk identifikasi golongan senyawa adalah sebagai berikut:

Pereaksi Liebermann-Burchad

Terdiri dari anhidrida asam asetat dengan asam sulfat pekat yang disimpan terpisah.

Pereaksi Meyer

Merkuri klorida sebanyak 1,36 g ditambahkan pada larutan 5 g kalium iodida (KI) dalam 10 mL akuades. Campuran keduanya diencerkan menjadi 100 mL dengan akuades. Disimpan dalam botol gelap.

Larutan 1 % FeCl₃

Ditimbang 1 g FeCl₃ dan ditempatkan dalam labu takar 100 mL dan diencerkan dengan akuades sampai dengan tanda batas.

3.2.3. Penapisan Fitokimia terhadap Rimpang Bengle

Serbuk rimpang bengle diekstraksi dengan metanol. Pada ekstrak ini dilakukan penapisan fitokimia yang meliputi analisis golongan triterpenoid, steroid, alkaloid, saponin, kuinon dan flavonoid.

- Pengujian adanya triterpenoid dan steroid

Sampel dimasukkan dalam cawan porselen dan ditambah 10 tetes anhidrida asam asetat dan 1 tetes asam sulfat pekat. Adanya triterpenoid ditandai dengan perubahan warna merah ungu, sedangkan warna biru menunjukkan adanya steroid

- Pengujian alkaloid

Sampel dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditambah dengan reagen Meyer. Hasil positif diperoleh jika timbul endapan putih.

- Pengujian saponin

Sampel dimasukkan dalam tabung reaksi, kemudian ditambah air dan dididihkan. Setelah sampel dingin kemudian dikocok kuat-kuat. Adanya saponin ditunjukkan dengan adanya busa yang stabil selama 30 menit.

- Pengujian Flavonoid

Sampel ditambah dengan akuades kemudian dipanaskan hingga mendidih. Air rebusannya dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan kemudian ditambahkan larutan 1 % FeCl_3 . Adanya senyawa flavonoid ditandai dengan perubahan warna dari hijau sampai hitam.

-Pengujian Kuinon

Sampel ditambah dengan beberapa tetes larutan 1N NaOH. Adanya kuinon ditandai dengan terbentuknya warna merah.

-Pengujian Tanin

Sampel ditambah dengan larutan 1% FeCl_3 . Adanya tanin ditandai dengan terbentuknya warna hijau violet.

3.2.4. Pemisahan dan Pemurnian Komponen

Untuk mengetahui jumlah komponen yang ada dalam fraksi etil asetat, maka dilakukan uji bercak dengan metode kromatografi lapis tipis, dimana sebelumnya telah dilakukan penentuan fasa gerak terbaik dan didapatkan n-heksan : etil asetat dengan perbandingan volume 4:1.

Fraksi etil asetat tersebut kemudian dipisahkan dengan kromatografi kolom vakum. Fasa diam yang digunakan adalah silika gel (Kiesel Gel E.Merck Art 7734 70 - 230 mesh) sebanyak 50 g yang kemudian dimasukkan ke dalam kolom dengan panjang 30 cm dan diameter 5 cm yang bagian bawahnya telah disumbat dengan *glass wool*. Ke dalam kolom tersebut dimasukkan sampel dengan berat 5,2 g yang telah dilarutkan dengan sedikit etil asetat dan digerus dengan 5 g silika gel. Fasa gerak yang digunakan adalah suatu seri pelarut dengan sistem gradien kepolaran

yang meningkat dari n-heksan → etil asetat → metanol. Pada kromatografi kolom ini ditampung 27 fraksi, dengan setiap fraksinya sebanyak 25 ml.

Untuk mengetahui jumlah komponen yang ada pada setiap fraksi hasil kromatografi kolom, dilakukan uji bercak kromatografi lapis tipis dengan menggunakan perbandingan fasa gerak n-heksan:etil asetat (4:1). Fraksi-fraksi yang mempunyai harga R_f yang sama digabungkan dan dipilih fraksi I - VI yang mempunyai komponen dominan berupa noda merah yang tampak dengan penampak bercak serium (II) sulfat.

Terhadap fraksi I - VI dilakukan isolasi dengan kromatografi lapis tipis preparatif untuk memisahkan noda merah. Hasil dari kromatografi lapis tipis preparatif diuji kemurniannya dengan berbagai eluen. Setelah didapatkan bahwa noda telah tunggal dengan semua eluen, maka dilakukan analisis spektroskopi untuk identifikasi senyawa.

3.2.5. Identifikasi Senyawa Hasil Isolasi

Terhadap noda hasil isolasi dilakukan analisis dengan spektroskopi ultra violet dan kromatografi gas-spektroskopi massa (GC-MS).

Analisis dengan spektroskopi ultra violet dilakukan pada panjang gelombang 200 - 400 nm dengan pelarut etil asetat, sedangkan analisis dengan GC-MS dilakukan dengan kondisi sebagai berikut:

- jenis pengionan : dampak elektron (*Electron Impact*)
- jenis kolom : DB - 1 (dengan panjang 30 m)
- suhu kolom : 80 °C s.d. 270 °C

- gas pembawa : Helium 21 kPa
- model injektor : Split 1: 60 (suhu 280 °C)
- suhu detektor : 280 °C

