

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Sampel, Bahan dan Alat

3.1.1. Sampel

Sampel berupa kulit batang mindi (*Melia azedarach* Linn) yang diperoleh dari daerah Salatiga, Jawa Tengah.

3.1.2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah n-heksan, kloroform, etil asetat, metanol, asam sulfat, asam asetat anhidrid, serium sulfat, larutan 1 % FeCl₃, NaCl, aquades, udang *Artemia salina* dan silika gel 60.

3.1.3. Alat

Peralatan yang dipakai dalam penelitian ini adalah peralatan umum laboratorium kimia seperti peralatan gelas, evaporator putar, plat KLT, lampu UV merk Spectroline, seperangkat kromatografi kolom vakum, serta spektrofotometer ultra violet tipe Milton Roy Spectronic 3000 ARRAY dan spektrofotometer infra merah tipe Shimadzu FTIR 8201 PC.

3.2. Metode Kerja

3.2.1. Perlakuan Awal Sampel

Sampel berupa kulit batang mindi dibersihkan dan dikeringkan pada temperatur kamar dengan cara diangin-anginkan. Setelah kering, kulit batang tersebut ditumbuk sampai diperoleh serbuk kasar. Selanjutnya serbuk kasar dihaluskan dengan blender sehingga didapatkan serbuk kulit batang mindi. Setelah ditimbang diperoleh serbuk kulit batang sebanyak 450 g. Sebelum dimaserasi dengan pelarut metanol, terlebih dulu serbuk kulit batang sebanyak 450 g dimaserasi dengan pelarut n-heksan sampai jernih, dilanjutkan dengan pelarut etil asetat masing-masing selama 2 x 24 jam. Selanjutnya dilakukan maserasi dengan pelarut metanol selama 2 x 24 jam. Ketiga ekstrak tersebut kemudian dipekatkan dengan evaporator putar sampai diperoleh ekstrak pekat (*crude*).

Terhadap ekstrak etil asetat dan ekstrak metanol dilakukan uji aktivitas dengan metode Brine Shrimp Lethality. Selanjutnya dilakukan pemisahan senyawa lebih lanjut terhadap ekstrak metanol yang menunjukkan aktivitas lebih tinggi.

3.2.2. Pemisahan Senyawa

Untuk mengetahui jumlah komponen yang ada dalam ekstrak metanol, maka dilakukan uji bercak dengan metode kromatografi lapis tipis, sebagai fasa diam digunakan silika gel GF₂₅₄ dan fasa geraknya dipakai

beberapa pelarut seperti n-heksan, kloroform, etil asetat dan metanol serta variasi dari campuran pelarut-pelarut tersebut.

Sampel ditotolkan dengan pipa kapiler pada lempeng kromatografi, kemudian dielusi dengan fasa geraknya. Sebagai penampak bercak digunakan lampu UV dan larutan serum sulfat. Dari hasil kromatografi lapis tipis diperoleh eluen yang paling baik adalah campuran n-heksan:kloroform (2 : 1).

Selanjutnya senyawa-senyawa yang terdapat dalam ekstrak kasar tersebut dipisahkan dengan kromatografi kolom vakum. Fasa diam yang digunakan adalah silika gel 60 G berukuran 30-70 mesh sebanyak 80 g yang kemudian dimasukkan ke dalam kolom dengan panjang 30 cm dan diameter 5 cm yang bagian bawahnya telah disumbat dengan porasi. Sampel dengan berat 3 g dilarutkan dalam metanol secukupnya dan dicampur dengan silika gel sampai semua silika gel terserap. Selanjutnya sampel tersebut dimasukkan ke dalam kolom. Fasa gerak yang digunakan adalah suatu seri pelarut dengan sistem gradien kepolaran yang meningkat dari n-heksan ke kloroform. Dari kromatografi kolom vakum, ditampung 15 fraksi dengan setiap fraksinya sebanyak 25 mL.

Untuk mengetahui jumlah komponen yang ada pada setiap fraksi hasil kromatografi kolom vakum, dilakukan uji bercak kromatografi lapis tipis dengan menggunakan perbandingan fasa gerak n-heksan : kloroform (2 : 1). Fraksi-fraksi yang mempunyai harga R_f sama digabungkan dan dipilih fraksi A yang mempunyai satu noda dengan harga R_f sebesar 0,86.

Terhadap fraksi A dilakukan penguapan pelarut pada suhu kamar hingga diperoleh padatan berwarna putih. Selanjutnya dilakukan uji kemurnian terhadap senyawa hasil isolasi dengan kromatografi lapis tipis menggunakan berbagai pelarut. Senyawa murni ditunjukkan dengan adanya noda tunggal pada lempeng KLT.

3.2.2. Analisis Senyawa Hasil Isolasi

Terhadap senyawa hasil isolasi dilakukan uji golongan senyawa, sedangkan analisis strukturnya dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer ultraviolet dan inframerah.

3.2.2.1. Analisis Spektra IR

Sampel dimasukkan ke dalam alat IR, dihasilkan grafik antara %T dan bilangan gelombang. Grafik tersebut memberikan informasi adanya gugus fungsional dalam senyawa hasil isolasi tersebut.

3.2.2.2. Analisis Spektra UV

Sejumlah cuplikan senyawa dilarutkan dalam kloroform, kemudian dimasukkan ke dalam cuvet dan disinari dengan sinar UV. Spektra yang dihasilkan menunjukkan panjang gelombang maksimum yang diserap oleh senyawa.