

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Sampel, Bahan dan Alat

3.1.1. Sampel

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

3.1.2. Bahan

Bahan yang digunakan adalah aseton t., n-heksan t., etil asetat t. sebagai pelarut ekstraksi, pereaksi Liebermann-Burchard dan larutan FeCl_3 untuk analisis golongan senyawa, silika gel 60 sebagai fase diam kolom vakum dan TLC preparatif, plat TLC E. Merck GF₂₅₄ untuk uji noda, etil asetat p.a., n-heksan p.a., metilen klorida p.a., metanol p.a. sebagai eluen TLC, serium sulfat, vanilin sulfat, 2,4-dinitrophenilhidrazin (2,4-DNP) sebagai reagen penampak noda.

3.1.3. Alat

Penelitian ini menggunakan peralatan laboratorium yang umum, satu set alat maserasi, corong pisah, evaporator putar merk Buchii, kromatografi kolom vakum, dan TLC preparatif untuk pemisahan senyawa, plat TLC untuk pemisahan noda, lampu UV merk spektrolin dan GC-MS GP5000 merk SHIMADZU untuk identifikasi senyawa hasil isolasi.

3.2. Metode Kerja

Penelitian dilakukan di laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia FMIPA Universitas Diponegoro Semarang, analisis GC-MS dilakukan di laboratorium Kimia Organik Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

3.2.1. Perlakuan Awal Sampel

Rimpang bengle segar sebanyak 5 kg dibersihkan, dikupas kulitnya kemudian diiris halus. Kemudian diblender sehingga didapatkan serbuk segar sebanyak 3 kg.

Serbuk bengle diekstraksi dengan pelarut aseton dengan metode maserasi selama 9 x 24 jam, tiap 3 x 24 jam diganti pelarutnya. Hasil ekstraksi tersebut diuapkan pelarutnya dengan evaporator putar sampai menjadi 1/5 bagian semula.

Terhadap ekstrak aseton dilakukan ekstraksi dengan pelarut n-heksan, menghasilkan fraksi n-heksan dan fraksi aseton. Fraksi aseton diekstraksi menggunakan pelarut etil asetat, menghasilkan fraksi etil asetat dan fraksi aseton. Fraksi etil asetat yang didapat selanjutnya dipekatkan dan dianalisis lebih lanjut.

3.2.2. Pemisahan dan Pemurnian Senyawa

Untuk mengetahui cacah komponen yang ada dalam fraksi etil asetat, maka dilakukan pemeriksaan dengan kromatografi lapis tipis. Sebelumnya telah dilakukan penentuan fase gerak terbaik dan didapatkan n-heksan : etil asetat dengan perbandingan volume 2 : 1.

Fraksi etil asetat tersebut kemudian dipisahkan dengan kromatografi kolom vakum. Fase diam yang digunakan adalah silika gel (Kiesel Gel E. Merck Art 7734 70 - 230 mesh) sebanyak 40 g yang kemudian dimasukkan ke dalam kolom dengan panjang 30 cm dan diameter 5 cm yang bagian bawahnya telah disumbat dengan *glas wool*. Ke dalam kolom tersebut dimasukkan sampel seberat 1,5 g yang telah dilarutkan dengan sedikit etil asetat dan digerus dengan 1 g silika gel. Fase gerak yang digunakan adalah suatu seri pelarut dengan sistem gradien kepolaran yang meningkat dari n-heksan sampai etil asetat.

Hasil fraksinasi dengan kromatografi kolom diuji dengan TLC, menggunakan eluen n-heksan : etil asetat (2 : 1). Fraksi-fraksi yang mempunyai jumlah noda dan harga R_f yang sama digabungkan, sehingga menghasilkan 9 fraksi. Untuk menampakkan bercak dilakukan penyemprotan dengan serum sulfat.

Dari kesembilan fraksi hasil kromatografi, yang dilanjutkan untuk pemurnian adalah fraksi V karena fraksi ini merupakan ekstrak terbanyak dengan pemisahan yang paling baik. Pemurnian kandungan senyawa fraksi V dilakukan dengan metode TLC preparatif. Eluen yang digunakan adalah metilen klorida : metanol dengan perbandingan volume 7 : 1. Noda dengan harga R_f sebesar 0,73 diambil dan dilarutkan dalam etil asetat, disaring, didapatkan filtrat etil asetat. Filtrat tersebut diuji kemurniannya dengan berbagai eluen dan dianalisis golongan serta gugus fungsinya dengan reagen analisis golongan dan gugus fungsi. Selanjutnya dilakukan analisis dengan spektroskopi GC-MS untuk identifikasi struktur senyawa.

3.2.3. Analisis Senyawa

Filtrat etil asetat hasil TLC preparatif ditotolkan pada plat TLC, kemudian dielusi dengan metilen klorida : metanol dengan perbandingan 7 : 1. Sebagai penampak noda digunakan penyinaran lampu UV, penyemprotan reagen vanilin sulfat dan 2,4-DNP untuk analisis gugus fungsi.

Cara pembuatan pereaksi semprot untuk analisis gugus fungsi:

Pereaksi Vanilin asam sulfat

Sebanyak 0,5 g vanilin dan 2 mL H_2SO_4 pekat sambil didinginkan ditambahkan ke dalam 8 mL etanol.

Pereaksi 2,4-dinitrofenilhidrazin (2,4-DNP)

Ditimbang 0,4 g 2,4-DNP dimasukkan ke dalam 100 mL HCl 2 M.

3.2.3.1. Analisis Golongan Senyawa

Filtrat etil asetat juga diuji golongan senyawanya meliputi uji triterpenoid, steroid dan fenolik.

Pereaksi yang dibuat untuk identifikasi golongan senyawa adalah sebagai berikut:

Pereaksi Liebermann-Burchard

Pereaksi ini terdiri dari anhidrida asam asetat dengan asam sulfat pekat yang dikemas terpisah.

Larutan 1 % $FeCl_3$

Ditimbang 1 g $FeCl_3$ ditempatkan pada labu takar 100 mL yang berisi 2 mL HCl 2M dan diencerkan dengan akuades sampai tanda batas.

3.2.3.2. Analisis Spektra

Terhadap noda hasil isolasi dilakukan analisis dengan kromatografi cairan gas-spektroskopi massa (GC-MS). Analisis dengan GC-MS dilakukan dengan kondisi sebagai berikut:

jenis pengionan : tumbukan elektron

jenis kolom : DB-1 (dengan panjang 30 m)

suhu kolom : 50 °C dengan kenaikan 10 °C permenit sampai dengan 270 °C

gas pembawa : Helium dengan tekanan sebesar 21 kPa

model injektor : Split 1 : 60

suhu detektor : 270 °C

