

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Tempat penelitian

penelitian dilakukan di Laboratorium Recovery, PPP Bioteknologi, PUSPIPTEK, Serpong, Tangerang.

3.2. Alat dan Bahan

3.2.1. Alat

Alat-alat yang dipergunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Satu set peralatan Buchie Vacuum Rotary Evaporator
2. Plat Kromatografi Lapis Tipis Merck GF₂₅₄
3. Satu set peralatan Kromatografi kolom dengan diameter 2,5 cm dan panjang kolom 75 cm lengkap dengan *fraction collector*nya
4. Peralatan gelas
5. Spektrofotometer Ultraviolet-Tampak

3.2.2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

1. Serbuk angkana kering
2. Metanol p.a. dan teknis
3. Aquadest
4. Diklorometan p.a. dan teknis
5. Aseton
6. Etil asetat

7. Anisaldehyd
8. Natrium Hidroksida
9. Aluminium klorida
10. Natrium Asetat
11. Asam Borat
12. Asam Klorida
13. Asam sulfat

3.2. Cara kerja

Penelitian ini meliputi beberapa tahap, yaitu penyiapan sampel, ekstraksi, fraksinasi dan isolasi serta identifikasi senyawa flavonoid.

3.2.1. Penyiapan sampel

Daun angkana dikeringkan pada suhu kamar hingga warna daun berubah menjadi coklat. Daun angkana kering kemudian digiling halus menjadi serbuk.

3.2.2. Ekstraksi

Dua ratus gram serbuk daun angkana diekstraksi secara variasi menggunakan metanol dengan pengadukan selama 3x3 jam. Ekstrak metanol dipisahkan fasa nonpolarinya menggunakan n-heksana dan dipisahkan lemaknya menggunakan petroleum eter. Ekstrak metanol kemudian dipekatkan sehingga didapat ekstrak pekat.

3.2.3. Fraksinasi dan isolasi

Cuplikan crude dilarutkan dalam 5 ml metanol. Kemudian ditotolkan pada plat KLT GF₂₅₄, dimasukkan dalam bejana pengembang dengan menggunakan pengembang seperti metanol, diklorometan, etil asetat, dan aseton. Selanjutnya noda-noda komponen dilihat fluoresensinya di bawah lampu ultraviolet dengan panjang gelombang 254nm dan 365nm. Jenis pengembang yang paling baik pemisahannya digunakan sebagai eluen pada kromatografi kolom.

Pemisahan komponen menggunakan kromatografi kolom. Fasa diam digunakan silika gel G 60 berdiameter 0,062-0,2 mm sebanyak 50 g, dilarutkan dalam pelarut metanol sampai homogen dan dimasukkan ke dalam kolom. Agar fasa diam menjadi padat dan tidak patah-patah, kolom dipukul pelan-pelan sambil dielus menggunakan pelarutnya. Setelah padat, eluen dikurangi sampai tepat pada bagian atas dari fasa diam. Selanjutnya, 0,5 g sampel dimasukkan ke dalam kolom dengan cara melewatkan sampel pada dinding kaca kolom dan dielus menggunakan diklorometan:metanol dengan perbandingan 9:1. Fraksi-fraksi ditampung dalam alat fraction collector lengkap dengan tabung-tabungnya dan diatur waktunya setiap 15 menit.

3.2.4. Identifikasi senyawa flavonoid

Isolat-isolat yang didapat diuji warna menggunakan AlCl₃ 5%, NaOH 10%, H₂SO₄ pekat, dan Mg-HCl. Isolat yang menunjukkan hasil positif adalah isolat yang mengalami perubahan warna setelah ditambah reagen-reagen tersebut, terutama perubahan setelah ditambah Mg-HCl. Isolat yang diambil sebagai sampel adalah isolat yang menunjukkan hasil positif.

Identifikasi adanya gula dilakukan dengan menambahkan pereaksi Fehling A dan B pada isolat yang telah dilarutkan dalam metanol kemudian dipanaskan.

Uji kemurnian dilakukan dengan cara mengelusi senyawa yang diperoleh (isolat positif) menggunakan KLT dengan berbagai eluen.

Pada analisis menggunakan spektrofotometer ultraviolet-tampak, isolat positif dilarutkan dalam metanol untuk ditentukan spektrumnya menggunakan 3 pereaksi geser yaitu:

- a.) AlCl_3 , sampel yang telah dilarutkan dalam metanol, dimasukkan ke dalam kuvet yang diukur spektrumnya kemudian ditambahkan 6 tetes AlCl_3 5% dan diukur spektrumnya,
- b.) NaOH , larutan sampel dimasukkan dalam kuvet dan ditambah 3 tetes NaOH 2M, dikocok dan diukur spektrumnya,
- c.) NaOAc , larutan sampel dimasukkan ke dalam kuvet, ditambahkan sedikit serbuk NaOAc , dikocok sampai larut kemudian diukur spektrumnya.

Selain itu juga dilakukan hidrolisis asam menggunakan HCl 2M dan direfluks selama 4 jam. Setelah dingin, larutan dalam refluks diekstraksi menggunakan diklorometan. Fraksi diklorometan kemudian diuapkan, setelah kering dilarutkan dalam metanol dan diukur spektrumnya menggunakan spektrofotometer ultraviolet-tampak.