

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan untuk mengisolasi senyawa triterpenoid dari kulit batang Mindi dalam fraksi etil asetat. Dengan menggunakan metode maserasi dan kromatografi serta dengan pendekatan fitokimia dan kemotaksonomi, diasumsikan akan diperoleh senyawa yang sama pada batang akarnya.

3.1. Sampel, Bahan, dan Alat

3.1.1. Sampel

Sampel berupa kulit batang mindi (*Melia azedarach* Linn) yang diperoleh dari Desa Ngemplak, Kecamatan Sidomukti, Salatiga, Jawa Tengah, dipotong kecil-kecil dan diblender hingga didapat serbuk seberat 425 gram.

3.1.2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

1. Untuk pelarut: n-heksan, Etil asetat, Metanol, Aseton, Metilen klorida, dan Kloroform.
2. Untuk reagen uji Lieberman-Buchard: Asam sulfat pekat dan asam asetat anhidrid.
3. Untuk kromatografi kolom: Silika gel G 60.

3.1.3. Alat

Peralatan yang dipakai dalam penelitian ini adalah peralatan gelas, rotaryevaporator, plat KLT, alat maserasi, lampu UV merk Spectroline, seperangkat alat kromatografi kolom vakum, spektrofotometer UV Milton Roy Spectronic 3000 ARRAY, spektrofotometer IR Shimadzu FTIR 8201 PC, Fischer John Melting Point.

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 yang halus. Setelah ditimbang diperoleh serbuk kulit batang Mindi sebanyak 425 gram.

Serbuk kulit batang dimaserasi dengan pelarut n-heksan selama 2 x 48 jam. Filtrat dari maserasi n-heksan ditampung dan terhadap ampasnya dilakukan maserasi dengan etil asetat selama 2 x 48 jam. Filtrat yang didapat ditampung dalam botol-botol kecil dan selanjutnya dipekatkan dengan menggunakan rotaryevaporator sampai diperoleh ekstrak pekat ("crude").

Selanjutnya terhadap "crude" ini dilakukan pemisahan senyawa dengan kromatografi kolom vakum.

3.2.2. Pemisahan Senyawa

Untuk mengetahui pelarut yang cocok untuk digunakan dalam kromatografi kolom vakum, maka dilakukan analisa KLT terlebih dahulu. "Crude" yang diperoleh diambil sedikit dan dilarutkan dalam etil asetat. Selanjutnya dilakukan analisa KLT dengan fasa geraknya adalah beberapa jenis pelarut, baik pelarut tunggal maupun campuran pelarut, dan sebagai fasa diam digunakan silika gel G 60.

Sampel ditotolkan dengan pipa kapiler pada plat KLT kemudian dielusi dengan fasa geraknya. Sebagai penampak bercak, plat yang telah ditotol dengan sampel diletakan di bawah lampu UV dengan $\lambda = 254$ nm. Pelarut yang menghasilkan jumlah noda paling banyak pada analisa KLT ini selanjutnya digunakan sebagai fasa gerak pada kromatografi kolom vakum.

Pemisahan senyawa yang terdapat dalam "crude" dilakukan dengan kromatografi kolom vakum. Fasa diam yang digunakan adalah silika gel G 60 sebanyak 80 gram. Silika gel tersebut dibuat bubuk terlebih dahulu menggunakan pelarut n-heksan:etil asetat (1:4), kemudian dituang ke dalam kolom. Filtrat yang dihasilkan ditampung ke dalam botol-botol kecil dan masing-masing botol dilakukan analisa KLT untuk mengetahui jumlah senyawa yang terdapat di dalamnya. Botol-botol yang memberikan jumlah noda sama dikelompokkan ke dalam 1 fraksi. Selanjutnya terhadap masing-masing fraksi diuapkan pelarutnya dan dilakukan uji spesifik terhadap triterpenoid, yaitu dengan menggunakan pereaksi Lieberman-Buchard (5 tetes asam asetat anhidrid + 1 tetes asam sulfat pekat).

Fraksi memberikan hasil positif bila memberikan hasil warna merah ungu. Fraksi yang memberikan hasil positif selanjutnya dimurnikan dengan cara direkristalisasi.

3.2.3. Analisis Senyawa Hasil Isolasi

Terhadap senyawa hasil isolasi dilakukan uji kelarutan, uji KLT 1 dimensi dan KLT 2 dimensi, uji titik leleh, dan analisis Spektrofotometer UV dan IR.

3.2.3.1. 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 yang diserap oleh senyawa.

3.2.3.2. Analisis Spektra IR

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