

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Sampel, Bahan, dan Alat

3.1.1. Sampel

Sampel berupa tanaman purwoceng (*Pimpinella alpina* Molk) yang diperoleh dari desa Sikunang, Dieng, Wonosobo.

3.1.2. Bahan

Pelarut yang digunakan untuk ekstraksi yaitu yang berkualitas teknis, sedangkan untuk analisis digunakan yang berkualitas p.a. Bahan-bahan yang digunakan adalah sebagai berikut:

- *N*-heksan (p.a. dan teknis)
- Kloroform (p.a. dan teknis)
- Metanol (p.a. dan teknis)
- Etil asetat p.a.
- Benzena p.a.
- Sikloheksan p.a.
- Petroleum benzena p.a.
- Etanol
- FeCl₃ 1%
- Asam asetat anhidrat

- Asam sulfat pekat
- Aseton
- Serbuk Mg
- Asam klorida
- Ammonia
- Pereaksi Mayer
- Plat KLT silika gel Merck Kiesiegel 60 F₂₅₄
- Silika gel G 60
- Silika gel 60
- Kertas saring

3.1.3. Alat

Peralatan yang mendukung penelitian ini, yaitu:

- Statif dan klem
- Kolom vakum
- Kolom
- Penguap putar vakum
- Oven
- Neraca analitis
- Peralatan gelas
- Chamber KLT
- Pipa kapiler
- Cawan porselin

- Spatula
- Botol vial 10 mL
- Lampu UV
- Alat Uji Titik Leleh Fisher – Johns
- UV-Vis Milton Ray Spectronic 3000
- IR Shimadzu FTIR – 820 IPC
- GC-MS Shimadzu QP – 5000

3.2. Metode Kerja

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia F-MIPA Universitas Diponegoro, dan analisis dengan spektrofotometer UV-Vis, FTIR, dan GC-MS dilakukan di Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia F-MIPA Universitas Gadjah Mada.

3.2.1. Ekstraksi

Tanaman purwoceng diekstraksi dengan metode sokletasi menggunakan pelarut metanol. Kemudian terhadap ekstrak metanol ini dilakukan kromatografi kolom vakum dengan pelarut *n*-heksan sehingga diperoleh fraksi *n*-heksan. Ekstrak ini dianalisis dengan KLT menggunakan pelarut-pelarut organik seperti *n*-heksan, kloroform, etil asetat, metanol, dan campuran dua pelarut dengan perbandingan tertentu. Eluen terbaik hasil KLT ini yang menjadi dasar pemisahan senyawa-senyawa dengan kromatografi kolom.

3.2.2. Skrining Fitokimia Fraksi *n*-heksan

Terhadap ekstrak fraksi *n*-heksan dilakukan uji golongan kimia meliputi alkaloid, flavonoid, senyawa fenolik, dan triterpen/steroid.

- Uji Alkaloid

Sampel dihaluskan dalam lumpang dengan menambahkan sejumlah pasir dan 10 mL kloroform. Kemudian ditambahkan 10 mL kloroform – ammonia 0,05 N, diaduk/digerus lagi perlahan. Larutan disaring dan hasil saringan dimasukkan tabung reaksi. Lalu ditambahkan 10 tetes asam sulfat 2 N, dikocok perlahan, dan dibiarkan sejenak sehingga terbentuk pemisahan lapisan asam dan kloroform. Selanjutnya diambil lapisan asamnya dan dipindahkan ke dalam tabung reaksi. Larutan ini ditambahkan setetes pereaksi Mayer. Reaksi positif ditandai dengan adanya kabut putih hingga gumpalan putih/endapan [Culvenor-Fitzgerald, 1963].

- Uji Flavonoid

Sampel dimaserasi dengan etanol panas, kemudian diuapkan. Kemudian ditambahkan kloroform dan air suling (1:1) sebanyak 5 mL masing-masing, dikocok, dan dibiarkan sejenak sehingga terbentuk dua lapisan kloroform – air. Lapisan kloroform di bagian bawah digunakan untuk pemeriksaan senyawa terpenoid dan steroid, sedangkan lapisan air untuk pemeriksaan kandungan flavonoid dan senyawa fenolik.

Sebagian dari lapisan air diambil dan dipindahkan dengan pipet ke dalam tabung reaksi kecil. Kemudian dimasukkan bubuk Mg dan beberapa tetes asam klorida pekat. Terbentuknya warna oranye sampai merah menandakan adanya flavonoid [Nordin, 1985].

- Uji Senyawa fenolik

Sebagian dari lapisan air dimasukkan ke dalam plat tetes dan kemudian ditambahkan pereaksi FeCl_3 . Terbentuknya warna biru/ungu menandakan adanya kandungan senyawa fenolik.

- Uji Triterpen/Steroid

Diambil sedikit lapisan kloroform, dan dimasukkan ke dalam lobang plat tetes dan dibiarkan sampai kering. Kemudian ditambahkan setetes asam asetat anhidrat dan setetes asam sulfat pekat. Terbentuknya warna biru ungu menandakan adanya steroid, sedangkan bila terbentuk warna merah menunjukkan adanya kandungan terpenoid.

3.2.3. Pemisahan Senyawa-senyawa

Terhadap ekstrak *n*-heksan dilakukan kromatografi kolom gravitasi dengan eluen terbaik hasil KLT. Eluat ditampung tiap 10 mL dan dianalisis kembali dengan KLT. Eluat dengan pola noda yang sama disatukan. Bila senyawa murni belum diperoleh, pemisahan senyawa-senyawa fraksi *n*-heksan dilakukan dengan KLT preparatif.

3.2.4. Analisis Isolat Murni

Analisis untuk mengetahui kemurnian senyawa yang diperoleh dilakukan dengan KLT beberapa pelarut murni dan penentuan titik leleh. Selanjutnya dilakukan uji golongan kimia, uji kelarutan, dan analisis dengan spektrofotometer UV-Vis, FTIR, dan GC-MS.

