

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Bahan dan Alat

3.1.1. Bahan

- *n*-heksana
- Kloroform
- Metanol
- Akuades
- Silika Gel 60 H
- Silika Gel GF₂₅₄
- Plat Kromatografi Lapis Tipis GF₂₅₄
- Kertas saring

3.1.2. Alat

- Gelas Beker
- Pipet tetes
- Pipet ukur
- Erlenmeyer
- Pengaduk
- Corong gelas

- Spatula
- Lampu UV tipe Spectroline ($\lambda = 254$ nm dan 365 nm)
- Pipa kapiler
- Chamber kromatografi
- Satu set alat kromatografi kolom vakum
- Oven
- "Rotary evaporator" tipe R-114 Buchi Switzerland
- "Fisher-Johns Melting Point"
- Spektrofotometer IR tipe Shimadzu FTIR-8201 PC
- GC-MS Shimadzu QP-5000

3.2. Metode Kerja

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kimia Bahan Alam Jurusan Kimia Universitas Diponegoro, sedangkan untuk analisis terhadap isolat yang diperoleh dilakukan di Laboratorium Instrumentasi Universitas Gajah Mada Yogyakarta.

3.2.1. Ekstraksi Sampel

Daun paitan dipotong-potong halus kemudian dikeringkan sampai benar-benar kering. Selanjutnya daun paitan yang sudah kering ditumbuk sampai halus. Ekstraksi dilakukan dengan metode perkolasi dengan menggunakan pelarut metanol. Setelah dilakukan perkolasi ± 2 hari, filtrat dituang dalam satu tempat. Residu dikeringkan kemudian dilakukan perkolasi kembali selama ± 2 hari. Filtrat yang diperoleh dijadikan satu tempat dengan filtrat sebelumnya.

3.2.2. Kromatografi Kolom Vakum

Tahap pertama pada metode ini adalah pembuatan kromatografi kolom vakum. Kolom dibersihkan dan dikeringkan dalam oven sampai keadaan bebas air. Silika gel GF₂₅₄ yang telah terbebas dari air dicampur dengan pelarut kloroform hingga menjadi bubuk yang kemudian dimasukkan dan dipadatkan dalam kolom dengan cara mengalirkan pelarut kloroform di dalamnya. Setelah silika gel sudah padat ekstrak dimasukkan dan siap untuk dielusi.

Tahap kedua adalah mengelusi ekstrak per 50 mL pelarut kloroform sampai diperkirakan sudah tidak ada senyawa yang terlarut. Hal ini dapat diketahui dengan kromatografi lapis tipis. Dari tahap ini akan diperoleh fraksi-fraksi yang kemudian dianalisis dengan kromatografi lapis tipis dengan eluen kloroform untuk mengetahui pola noda pada tiap fraksi. Fraksi yang mempunyai pola noda yang sama digabung menjadi satu. Fraksi yang sudah digabungkan dipekatkan dengan menguapkan pelarutnya menggunakan rotary evaporator atau diuapkan biasa sampai pelarutnya mengering.

Untuk analisis selanjutnya dipilih fraksi yang mempunyai volume terbesar yang diperkirakan bahwa dalam fraksi tersebut terkandung senyawa yang diinginkan.

3.2.3. Pemurnian

Fraksi hasil Kromatografi Kolom Vakum yang dipilih untuk analisa selanjutnya dimurnikan dengan mencucinya secara berulang-ulang menggunakan pelarut *n*-heksana dan metanol. Fraksi hasil Kromatografi Kolom Vakum yang dipilih

pertama-tama dicuci dengan *n*-heksana sampai diperkirakan tidak ada senyawa yang terlarut lagi dalam *n*-heksana tersebut. Hasil dari pencucian ini berupa filtrat *n*-heksana dan residu. Filtrat *n*-heksana diuapkan pelarutnya sampai kering. Residu hasil pencucian dengan *n*-heksana dicuci dengan metanol sampai diperkirakan tidak ada senyawa yang terlarut dalam metanol tersebut. Hasil dari pencucian dengan metanol berupa filtrat metanol dan residu. Filtrat metanol diuapkan pelarutnya sampai kering.

Kristal yang terbentuk pada filtrat metanol yang telah diuapkan dimurnikan lebih lanjut dengan rekristalisasi menggunakan campuran pelarut *n*-heksana – kloroform.

3.2.4. Analisis Kemurnian

Analisis awal dilakukan untuk mengetahui tingkat kemurnian kristal dilakukan dengan uji titik leleh dan kromatografi lapis tipis. Uji titik leleh dilakukan dengan alat Fisher-Johns Melting Point. Analisis dengan kromatografi lapis tipis dilakukan untuk mengetahui kemurnian dari suatu senyawa. Pelarut yang digunakan adalah *n*-heksana, kloroform, etil asetat dan metanol. Jika dihasilkan noda tunggal maka diperkirakan senyawa tersebut telah murni.

3.2.5. Uji Golongan Terhadap Kristal Hasil Isolasi

Uji golongan dilakukan untuk mengetahui golongan senyawa kristal hasil isolasi. Uji golongan dilakukan dengan menambahkan pereaksi FeCl_3 untuk uji fenol, Dragendorff untuk uji alkaloid dan Liebermann-Burchard untuk uji triterpen/steroid.

3.2.6. Analisis dengan Spektrofotometer Infra Merah

Sebanyak 0,5 – 1 mg kristal dibuat pelet dalam 100 mg KBr dengan alat “mini press”. Pelet KBr yang dibuat dianalisis dengan spektrofotometer infra merah seri Shimadzu FTIR-8201 PC, pada rentang bilangan gelombang 600 – 4000 $1/\text{cm}$.

3.2.7. Analisis dengan GC-MS

Kristal yang diperoleh dilarutkan dalam pelarut kloroform kemudian larutan tersebut diinjeksikan ke dalam alat GC-MS tipe Shimadzu QP-5000.

