

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### 3.1. Sampel, Bahan, Alat

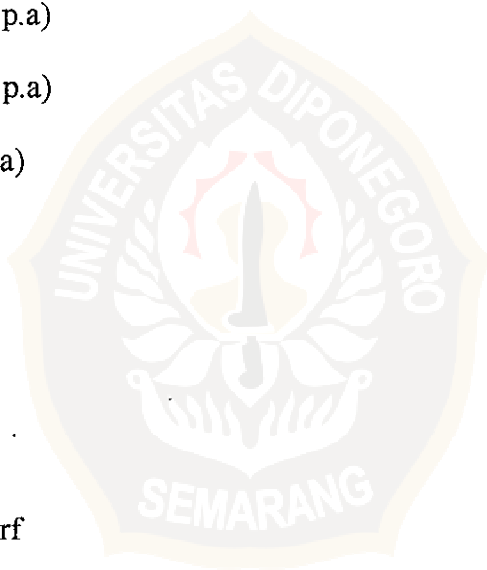
##### 3.1.1. Sampel

Sampel berupa bunga *Tithonia diversifolia*, Gray yang diambil dari Bukit Gombel, Semarang.

##### 3.1.2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

- *n*-heksana (teknis, p.a)
- kloroform (teknis, p.a)
- metanol (teknis, p.a)
- aseton p.a
- etil asetat p.a
- benzena p.a
- pereaksi FeCl<sub>3</sub>
- pereaksi Dragendorf
- pereaksi Mayer
- pereaksi Leibermann-Burchard
- kristal iodium
- silika gel 60G
- silika gel GF254

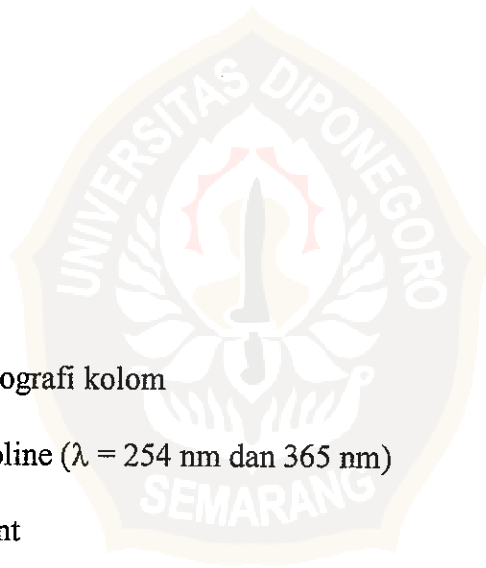


- plat Kromatografi Lapis Tipis GF254
- akuades

### 3.1.3. Alat

Peralatan yang dipakai dalam penelitian ini adalah:

- Gelas beker
- Pipet tetes
- Pipet ukur
- Pengaduk
- Corong gelas
- Spatula
- Evaporator putar
- Plat KLT
- Pipa kapiler
- Seperangkat alat kromatografi kolom
- Lampu UV merk spectroline ( $\lambda = 254 \text{ nm}$  dan  $365 \text{ nm}$ )
- Fisher-John Melting Point
- Spektrofotometer UV tipe Milton Roy Spectronic 3000 array
- Spektrofotometer IR tipe Shimadzu FTIR 8201 PC
- GC-MS Shimadzu QP-5000



### 3.2. Metode Kerja

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia Organik, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, UNDIP, Semarang sedangkan analisis terhadap isolat yang diperoleh dilakukan di Laboratorium Instrumentasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

#### 3.2.1. Ekstraksi Sampel

Sampel yang sudah dikeringkan, ditumbuk halus, kemudian diperkolasi menggunakan pelarut metanol selama 2 x 24 jam, filtrat dituang di suatu tempat. Residu dikeringkan, kemudian diperkolasi kembali selama 2 x 24 jam dan filtrat yang diperoleh digabung dengan filtrat sebelumnya .

Filtrat yang didapat dipekatkan dengan evaporator putar sehingga diperoleh ekstrak kasar metanol sebanyak 24,72 g.

Ekstrak metanol inilah yang kemudian akan difraksinasi secara berturutan menggunakan kromatografi kolom vakum dengan pelarut *n*-heksana, kloroform, dan metanol

#### 3.2.2. Pembuatan Kromatografi Kolom

Kolom kromatografi dibilas dengan menggunakan pelarut metanol. Adsorben silika gel 60G diaktifkan dalam oven pada suhu 110 °C selama 2 x 24 jam. Setelah dingin, silika gel 60G dibuat menjadi bubuk menggunakan pelarut metanol. Silika bubuk dimasukkan ke dalam kolom yang telah diisi pelarut

metanol. Adsorben dielusi dengan pelarut sambil dipukul pelan-pelan pada sisi kolom sehingga adsorben padat.

### 3.2.3. Pemisahan dengan Kromatografi Kolom Vakum

Ekstrak metanol bunga paitan dicampur dengan sedikit silika gel kering sampai homogen. Kemudian dimasukkan ke dalam kolom yang sudah berisi silika gel dan dielusi dengan pelarut *n*-heksana, kloroform, dan metanol sampai diperkirakan sudah tidak ada senyawa yang terlarut. Fraksi yang keluar dari kolom ditampung dalam botol-botol kaca. Dari seluruh fraksi yang diperoleh dilakukan uji KLT, yang menghasilkan noda sama digabung menjadi satu, kemudian pelarutnya diuapkan dengan evaporator putar hingga diperoleh fraksi kental.

### 3.2.4. Pemisahan Senyawa

Untuk mengetahui jumlah komponen yang ada dalam fraksi metanol maka dilakukan uji bercak dengan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Sebagai fasa diam digunakan silika gel GF254 dan fasa geraknya digunakan beberapa pelarut seperti *n*-heksana, kloroform, etil asetat, metanol, serta variasi dari campuran pelarut-pelarut tersebut.

Dalam analisis KLT sampel ditotolkan dengan pipa kapiler pada lempeng KLT kemudian dielusi dengan fasa geraknya. Sebagai penampak bercak digunakan lampu UV. Dari hasil uji KLT diperoleh eluen yang paling baik yaitu campuran dari *n*-heksana : kloroform (2 : 1)

Selanjutnya senyawa yang terdapat dalam fraksi metanol tersebut kemudian dipisahkan dengan kromatografi kolom gravitasi. Fasa diam yang digunakan adalah silika gel 60G sebanyak 100 gram dan eluen yang digunakan sebagai fasa gerak adalah campuran dari *n*-heksana : kloroform (2 : 1).

Kolom kromatografi dibilas dengan menggunakan pelarut *n*-heksana : kloroform (2 : 1). Adsorben silika gel 60G diaktifkan dalam oven pada suhu 110 °C selama 2 jam. Setelah dingin, silika gel 60G dibuat menjadi bubuk menggunakan pelarut *n*-heksana : kloroform (2 : 1). Silika bubuk kemudian dimasukkan ke dalam kolom yang telah berisi pelarut.

Untuk memisahkan senyawa dalam fraksi metanol, sampel dicampur dengan silika gel kering sampai homogen dan dimasukkan ke dalam kolom gravitasi yang telah berisi silika gel, kemudian sampel dielusi menggunakan pelarut *n*-heksana : kloroform (2 : 1).

Eluat dari kolom gravitasi ditampung dalam botol-botol kaca dan dilakukan uji KLT untuk masing-masing botol, yang mempunyai tipe noda sama kemudian digabung menjadi 1 fraksi.

### 3.2.5. Pemurnian

Kristal yang diperoleh dimurnikan dengan cara rekristalisasi menggunakan pelarut sikloheksana. Kristal dilarutkan dalam sikloheksana panas kemudian didinginkan dan disaring dalam keadaan panas. Ketika dingin kristal akan terbentuk kembali dan kemudian dipisahkan dari pelarutnya. Rekristalisasi diulang beberapa kali sehingga diperoleh kristal berwarna putih.

### 3.2.6. Analisis Senyawa Hasil Isolasi

#### 3.2.6.1. Analisis dengan Metode Kromatografi Lapis Tipis

Untuk menguji kemurnian kristal dilakukan analisis KLT dengan pelarut metanol, kloroform, *n*-heksana, aseton, benzena, dan campuran dari beberapa pelarut tersebut. Jika noda yang terbentuk telah tunggal maka kristal yang dihasilkan diharapkan telah murni.

#### 3.2.6.2. Analisis Titik Leleh

Kristal hasil isolasi diuji titik leleh menggunakan peralatan Fisher John melting point. Sejumlah kecil kristal ditempatkan pada plat kaca kemudian diamati suhunya saat senyawa mulai meleleh sampai habis.

#### 3.2.6.3. Uji Golongan Terhadap Kristal Hasil Isolasi

Uji golongan dilakukan untuk mengetahui golongan senyawa kristal hasil isolasi. Uji golongan dilakukan dengan menambahkan pereaksi  $\text{FeCl}_3$  1 % untuk uji fenolik, pereaksi Dragendorf untuk uji alkaloid, pereaksi Lieberman-Burchard untuk uji triterpen/steroid. Sedangkan untuk uji golongan seskuiterpen lakton kristal langsung diidentifikasi dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). KLT dilakukan pada silika gel GF254 memakai pengembang campuran benzena : aseton (4 : 1). Adanya lakton dapat dideteksi berupa bercak coklat bila pelat yang telah dikembangkan diletakkan dalam bejana yang berisi kristal Iodium <sup>[1]</sup>.

#### **3.2.6.4. Analisis dengan Spektrofotometer Ultraviolet**

Sejumlah cuplikan isolat dilarutkan ke dalam pelarut kloroform, kemudian larutan tersebut diinjeksikan ke dalam alat spektrofotometer UV tipe Milton Roy Spectronic 300 array.

#### **3.2.6.5. Analisis dengan Spektrofotometer Infra Merah**

Isolat yang diperoleh dilarutkan dalam pelarut kloroform kemudian larutan ini dianalisis dengan spektrofotometer inframerah seri Shimadzu FTIR-8201 PC, pada rentang bilangan gelombang  $600 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ .

#### **3.2.6.6. Analisis dengan GC-MS**

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

