

## **BAB III**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **3.1. Sampel, Bahan, Alat**

##### **3.1.1. Sampel**

Sampel berupa akar tanaman pasak bumi yang diperoleh dari PT. Sido Muncul Jawa Tengah.

##### **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: kloroform (p.a dan teknis), etil asetat (p.a dan teknis), *n*-heksana (p.a dan teknis), metanol (p.a dan teknis), anhidrida asam asetat p.a, asam sulfat pekat teknis, plat KLT silika gel Merck Kiesegel 60 F p.a, silika gel G 60 p.a, dan kertas saring.

##### **3.1.3. Alat**

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat-alat gelas laboratorium, satu set alat sokletasi, satu set alat kromatografi kolom vakum, satu set alat kromatografi kolom gravitasi, satu set alat penguap putar vakum, oven, neraca analitis, chamber KLT, lampu UV, dan seperangkat KG-SM Shimadzu QP-5000.

### 3.2. Metode Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia FMIPA Universitas Diponegoro, dan analisis Kromatografi Gas-Spektrometer Massa dilakukan di Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia FMIPA Universitas Gajah Mada.

#### 3.2.1. Ekstraksi

Akar tanaman pasak bumi dikeringkan, kemudian dihaluskan untuk mempermudah proses ekstraksi. Selanjutnya diekstraksi menggunakan metode sokletasi dengan pelarut metanol sehingga diperoleh ekstrak metanol. Pada fraksi metanol dilakukan kromatografi kolom vakum dengan pelarut *n*-heksana sehingga diperoleh fraksi *n*-heksana. Kemudian kromatografi kolom vakum dilanjutkan dengan pelarut kloroform sehingga diperoleh fraksi kloroform. Ekstrak ini dianalisis dengan KLT menggunakan pelarut-pelarut organik seperti *n*-heksana, etil asetat, kloroform, metanol, dan campuran dua pelarut dengan perbandingan tertentu. Eluen terbaik hasil KLT menjadi dasar pemisahan senyawa-senyawa dengan kromatografi kolom gravitasi.

#### 3.2.2. Uji Steroid/Triterpenoid

Metode Liebermann-Burchard dilakukan terhadap ekstrak fraksi *n*-heksana dan kloroform untuk menguji adanya steroid/triterpenoid. Diambil sedikit lapisan *n*-heksana dan kloroform dan dimasukkan ke dalam lobang plat tetes dan dibiarkan sampai kering. Kemudian ditambahkan setetes anhidrida asam asetat

dan setetes asam sulfat pekat. Terjadinya perubahan warna menjadi merah menunjukkan senyawa triterpenoid, sedangkan warna biru-ungu menunjukkan adanya steroid (Culvenor-Fitzgerald, 1963). Perubahan warna yang terjadi dibandingkan dengan standar, yaitu kolesterol untuk steroid dan mahoni untuk triterpenoid.

### 3.2.3. Pemisahan Senyawa-senyawa

Akar pasak bumi disokletasi dengan metanol, kemudian dilanjutkan dengan kromatografi kolom vakum menggunakan pelarut *n*-heksana, kloroform dan metanol. Fraksi *n*-heksana diidentifikasi menggunakan KG-SM. Terhadap ekstrak kloroform dilakukan kromatografi kolom gravitasi dengan eluen terbaik hasil KLT. Eluat ditampung setiap 10 mL dan dianalisis kembali dengan KLT. Eluat dengan pola noda yang sama disatukan. Bila senyawa murni belum diperoleh, pemisahan senyawa-senyawa fraksi kloroform dilakukan dengan KLT preparatif.

### 3.2.4. Identifikasi Senyawa-senyawa

Analisis untuk mengetahui pemisahan senyawa yang diperoleh dilakukan dengan KLT beberapa pelarut murni dan uji steroid, selanjutnya identifikasi dengan KG-SM.