# III. METODOLOGI PENELITIAN

## A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan pada bulan Agustus 2012 -April 2013, bertempat di Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Lampung. Analisis spektroskopi yang digunakan adalah spektroskopi ultraungu-tampak (UV-Vis), *Fourier Trasform Infra Red* (FT-IR) dilakukan di Laboratorium Biomassa, spektroskopi resonansi magnetik nuklir (NMR) di Laboratorium NMR-LIPI Serpong, spektroskopi GC-massa (MS) dan spektroskopi massa (MS) di Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Gajah Mada, Yogyakarta.

## B. Alat dan Bahan

### 1. Alat-alat yang digunakan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi alat-alat gelas, penguap putar vakum, satu set alat kromatografi cair vakum (KCV), kromatotron, satu set alat kromatografi kolom (KK), pengukur titik leleh, lampu UV, pipet kapiler, penguap putar vakum, spektrofotometer FT-IR merk Scimitar 2000, spektrofotometer ultraungu-tampak (UV-VIS) merk Cary 50, spektrofotometer

NMR, spektrofotometer GC-massa (MS) merk Shimadzu QP-2010, dan spektofotometer massa (MS) merk Shimadzu QP-2010.

**2. Bahan-bahan yang digunakan**

Bahan yang digunakan adalah buah mahkota dewa yang telah dikeringkan dan dihaluskan, diperoleh dari daerah Way Halim Kecamatan Kedaton Kelurahan Labuhan Ratu Bandar Lampung. Pelarut yang digunakan untuk ekstraksi dan kromatografi berkualitas teknis yang telah didestilasi sedangkan untuk analisis spektrofotometer berkualitas pro-analisis (p.a). Bahan kimia yang dipakai meliputi etil asetat (EtOAc), metanol (MeOH), *n*-heksana (n-$C_6H_{14}$), aseton ($C_3H_6O_2$), akuades ($H_2O$), serium sulfat 1,5% dalam asam sulfat ($H_2SO_4$) 2N, benzena ($C_6H_6$), kloroform ($CH_3Cl$), diklorometana ($CH_2Cl_2$), silika gel Merck G 60 untuk impregnasi, silika gel Merck 60 (35-70 Mesh) untuk KCV dan KK, untuk KLT digunakan plat KLT silika gel Merck kiesegal 60 $F_{254}$ 0,25 mm, silika gel 60 $PF_{254}$ untuk plat kromatotron.

**C. Prosedur Penelitian**

**1. Pengumpulan dan Persiapan Sampel**

Sampel berupa buah mahkota dewa yang dipisahkan bijinya kemudian buah dibersihkan dan di potong kecil-kecil. Sampel buah yang telah dipotong kemudian dikeringkan lalu dihaluskan hingga menjadi serbuk halus.

**2. Ekstraksi dengan Etil Asetat**

Sebanyak 1500 gram buah mahkota dewa yang telah dihaluskan,dimaserasi 3 kali dengan menggunakan etil asetat (EtOAc) masing-masing selama 1x24 jam. Ekstrak etil asetat yang diperoleh disaring kemudian dipekatkan dengan menggunakan penguap putar vakum pada suhu 45$^{o}$-50$^{o}$C dengan laju putaran 120-150 rpm.

**3. Kromatografi Cair Vakum (KCV)**

Ekstrak kasar kemudian difraksinasi dengan KCV. Terlebih dahulu fasa diam silika gel halus sebanyak 3 kali berat sampel dimasukkan ke dalam kolom. Kemudian kolom dikemas kering dalam keadaan vakum menggunakan alat vakum. Eluen yang kepolarannya rendah, dimasukkan ke permukaan silikagel halus terlebih dahulu kemudian divakum kembali. Kolom dihisap sampai kering dengan alat vakum dan siap digunakan.

Ekstrak kasar yang telah dilarutkan dalam aseton dan diimpregnasikan kepada silika gel kasar, kemudian dimasukkan pada bagian atas kolom yang telah berisi fasa diam dan kemudian dihisap secara perlahan-lahan ke dalam kemasan dengan cara memvakumkannya. Setelah itu kolom dielusi dengan etil asetat/*n*-heksan 0% sampai dengan etil asetat 100%. Kolom dihisap dengan vakum sampai kering pada setiap penambahan eluen (tiap kali elusi dilakukan). Kemudian fraksi-fraksi yang terbentuk dikumpulkan berdasarkan pola fraksinasinya. Fraksinasi sampel dengan teknik KCV dilakukan berulang kali dengan perlakuan yang sama seperti tahapan KCV awal di atas.

**4. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)**

Sebelum difraksinasi, terlebih dahulu dilakukan uji KLT untuk melihat pola pemisahan komponen-komponen senyawa yang terdapat dalam ekstrak kasar. Uji KLT juga dilakukan terhadap fraksi-fraksi yang akan difraksinasi dan juga fraksi-fraksi yang didapat setelah perlakuan fraksinasi. Uji KLT dilakukan menggunakan sistem campuran eluen menggunakan pelarut *n*-heksana, etilasetat, kloroform, benzena, metanol, dan diklorometana. Hasil kromatogram tersebut kemudian disemprot menggunakan larutan serium sulfat untuk menampakkan bercak/noda dari komponen senyawa tersebut. Ketika diperoleh fraksi yang lebih sedikit bercak/noda dilihat dibawah lampu UV setelah dilakukan elusi terhadap plat KLT. Setiap fraksi yang menghasilkan pola pemisahan dengan Rf (*Retention factor*) yang sama pada kromatogram, digabung dan dipekatkan sehingga diperoleh beberapa fraksi gabungan yang akan difraksinasi lebih lanjut.

**5. Kromatotron**

Setelah sampel diidentifikasi dengan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT), kemudian difraksinasi menggunakan kromatotron dengan menggunakan plat silika 2 mm dan menggunakan eluen diklorometana/*n*-heksana. Sebelum digunakan plat silika diaktifkan terlebih dahulu dengan pemanasan lampu pijar selama 20 jam. Plat silika yang sudah aktif kemudian dipasang pada kromatotron dan dibasahi perlahan dengan pelarut *n*-heksana sampai menetes, kemudian sampel diteteskan perlahan ke dalam plat silika selagi basah. Setelah sampel diteteskan pada plat silika, kemudian sampel dibiarkan mengering ±10 menit.

Setelah sampel kering, kemudian dialirkan 100 mL *n*-heksana dilanjutkan dengan mengalirkan eluen diklorometana/*n*-heksana 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, dan 100% masing-masing sebanyak 100 mL. Hasil fraksinasi kemudian ditampung dalam botol-botol kecil berukuran ±10 mL. Setelah selesai fraksinasi, plat silika kemudian dicuci dengan mengalirkan aseton sebanyak 100 mL dilanjutkan dengan mengalirkan air-metanol 5% sebanyak 100 mL.

**6. Kromatografi Kolom (KK)**

Setelah dihasilkan fraksi-fraksi dengan jumlah yang lebih sedikit, tahapan fraksinasi selanjutnya dilakukan menggunakan teknik kromatografi kolom. Adsorben silika gel Merck (35-70 Mesh) dilarutkan dalam pelarut yang akan digunakan dalam proses pengelusian. *Slurry* dari silika gel dimasukkan terlebih dahulu ke dalam kolom, atur fasa diam hingga rapat (tidak berongga) dan rata. Selanjutnya masukkan sampel yang telah diimpregnasi pada silika gel ke dalam kolom yang telah berisi fasa diam. Pada saat sampel dimasukkan, usahakan agar kolom tidak kering/kehabisan pelarut karena akan mengganggu fasa diam yang telah dikemas rapat, sehingga proses elusi tidak akan terganggu.

**7. Analisis Kemurnian**

Uji kemurnian dilakukan dengan metode KLT dan uji titik leleh. Uji kemurnian secara KLT menggunakan beberapa campuran eluen. Kemurnian suatu senyawa ditunjukkan dengan timbulnya satu noda dengan berbagai campuran eluen yang digunakan, kemudian disemprot menggunakan larutan serium sulfat untuk

menampakkan bercak/noda dari komponen senyawa tersebut dan pereaksi Liebermann-Burchard untuk identifikasi senyawa steroid.

Untuk kristal yang berukuran besar, kristal terlebih dahulu digerus hingga berbentuk serbuk kemudian kristal yang akan ditentukan titik lelehnya diletakkan pada lempeng kaca, diambil sedikit dengan menggunakan pipet kapiler, alat dihidupkan dan titik leleh diamati dengan bantuan kaca pembesar. Suhu pada saat kristal pertama kali mulai meleleh sampai semua zat meleleh, itulah titik leleh dari senyawa tersebut.

**8. Spektroskopi Ultraungu–tampak (UV-VIS)**

Sampel berupa kristal murni sebanyak 0,001 gram dilarutkan dalam 10 mL etil asetat. Larutan ini digunakan sebagai persediaan untuk beberapa kali pengukuran. Pertama, sampel diukur serapan maksimumnya dalam etil asetat lalu sampel kristal tersebut dilarutkan dalam 10 mL etil asetat kemudian larutan diukur serapan maksimumnya.

**9. *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (FT-IR)**

Sampel kristal hasil isolasi yang telah murni dianalisis menggunakan spektrofotometer inframerah. Kristal yang telah murni dibebaskan dari air kemudian digerus bersama-sama dengan halida anorganik, KBr. Gerusan kristal murni dengan KBr dibentuk menjadi lempeng tipis atau pelet dengan bantuan alat penekan berkekuatan 8-10 ton per satuan luas kemudian pelet tersebut diukur puncak serapannya (Sudjadi, 1983).

**10. Spektroskopi Resonansi Magnetik Nuklir (NMR)**

Sampel berupa kristal murni yang akan diidentifikasi dilarutkan ke dalam pelarut inert yang tidak mengandung proton seperti $CCl_4$ dan $CDCl_3$, kemudian ditambahkan sedikit senyawa acuan. Larutan ini ditempatkan dalam tabung gelas tipis dengan tebal 5 mm di tengah-tengah kumparan frekuensi radio (rf) di antara dua kutub magnet yang sangat kuat kemudian energi dari kumparan rf ditambah secara terus-menerus. Energi pada frekuensi terpasang dari kumparan rf yang diserap cuplikan direkam dan memberikan spektrum NMR (Silverstein *et al.,*1986).

**11. Spektroskopi GC-Massa (MS)**

Spektroskopi GC-MS merupakan jenis kromatografi yang digunakan dalam kimia organik untuk pemisahan dan analisis. GC dapat digunakan untuk menguji kemurnian dari bahan tertentu atau memisahkan berbagai komponen dari campuran. Dalam beberapa situasi, GC dapat membantu dalam mengidentifikasi sebuah senyawa kompleks. Dalam kromatografi gas, fase yang bergerak atau *mobile phase* adalah sebuah operator gas yang biasanya gas murni seperti helium atau yang tidak reactive seperti gas nitrogen. *Stationary* atau fasa diam merupakan tahap mikroskopis lapisan cair atau polimer yang mendukung gas murni di dalam bagian dari sistem pipa-pipa kaca atau logam yang disebut kolom. Instrumen yang digunakan untuk melakukan kromatografi gas disebut gas *chromatograph* atau *aerograph* (gas pemisah) (Pavia *et al.*, 2006).

**12. Spektroskopi Massa (MS)**

Sampel diuapkan di bawah vakum dan diionkan menggunakan berkas elektron. Ion sampel dipercepat menggunakan medan listrik memasuki tabung penganalisis dan dilalukan dalam medan magnet. Dalam kekuatan medan magnet yang diberikan, hanya ion-ion positif dan radikal positif akan difokuskan ke detektor, sedang ion-ion yang lain (radikal netral) akan dibelokkan ke dinding tabung. Ion dengan *m/z* lebih besar akan mencapai detektor lebih dulu diikuti *m/z* yang lebih kecil. Arus listrik yang diterima detektor akan diperkuat dan spektrum massa dari sampel akan direkam (Tim Penyusun, 2007).