BAB III
METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Alat dan Bahan

3.1.1 Alat-alat yang digunakan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah seperangkat alat destilasi, seperangkat alat kromatografi vakum cair, satu unit *rotary evaporator*, kolom kromatografi, *chamber*, pipa kapiler,lampu UV, alat penentu titik leleh Fisher Jhon, spektrofotometer IR merk Shimadzu tipe IR Prestige-21, spektrofotometer UV-Visible merk Hitachi U-2001, spektrofotometer NMR merk JOEL tipe ECA 500 dengan frekwensi 500 MHz untuk proton dan 125 MHz untuk karbon dan alat-alat gelas yang umum digunakan di laboratorium.

3.1.2 Bahan-bahan yang digunakan

Sebagai sample yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun tumbuhan *Tabernaemontana sphaerocarpa* Bl. Bahan yang digunakan adalah n-heksan, etil asetat, metanol, diklorometan, kloroform, serium sulfat, silika gel 60 GF_{254} (Merck), silika gel 70-230 mesh (Merck), plat KLT GF_{254} (Merck), pelarut untuk analisis NMR adalah CD_3OD, dan aquades.

3.2 Prosedur Kerja

3.2.1 Pengambilan sampel

Daun *Tabernaemontana sphaerocarpa* Bl diambil dari daerah Logas Tanah Darat Kabupaten Kuantan Singingi Propinsi Riau yang merupakan koleksi Laboratorium Kimia Organik. FMIPA UNRI dengan kode koleksi LTD-12. Nama spesiesnya diidentifikasi di Lembaga Herbarium Bogoriensis LIPI-Bogor dan dinyatakan sebagai spesies *Tabernaemontana sphaerocarpa* Bl dari famili Apocynaceae.

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/

3.2.2 Pengolahan sampel

Bahan tumbuhan yang akan digunakan berupa daun tumbuhan *Tabernaemontana sphaerocarpa* Bl. Daun tumbuhan dibersihkan dari kotoran yang melekat, kemudian dikeringkan tanpa pemanasan oleh sinar matahari langsung tetapi dengan aliran udara yang baik, setelah itu dipotong kecil-kecil dan dihaluskan dengan blender. Bubuk ini lalu ditimbang berat totalnya hingga konstan.

3.2.3 Uji fitokimia daun *Tabernaemontana sphaerocarpa* Bl

Beberapa cara uji fitokimia adalah sebagai berikut:

1. Uji Terpenoid

Sampel dipotong kecil-kecil ditambah etanol secukupnya dan didihkan. Kemudian disaring dan diuapkan alkoholnya sampai kering. Ekstrak yang tertinggal ditambahkan $CHCl_3$ dan air, sehingga terdapat dua lapisan. Kemudian lapisan $CHCl_3$ ditambahkan dengan pereaksi Liebermann-Burchard yang menghasilkan warna merah kecoklatan.

2. Uji Alkaloid

4 gram sampel digerus ditambah 10 ml $CHCl_3$ dan 10 ml $CHCl_3$ beramonia, kemudian disaring. Filtratnya ditambah dengan H_2SO_4 2N dan dikocok. Lapisan asam diuji dengan pereaksi Mayer terbentuk endapan putih (positif alkaloid) dan Dragendorff terbentuk endapan orange.

3. Uji Fenolik

Sampel dipotong kecil-kecil ditambah etanol secukupnya dan didihkan. Kemudian disaring dan diuapkan alkoholnya sampai kering. Ekstrak yang tertinggal ditambahkan $CHCl_3$ dan air, sehingga terdapat dua lapisan. Lapisan air diuji dengan menambahkan $FeCl_3$ maka terbentuk endapan biru pekat.

4. Uji Flavonoid

Sampel dipotong kecil-kecil ditambah etanol secukupnya dan dididihkan. Kemudian disaring dan diuapkan alkoholnya sampai kering. Ekstrak yang tertinggal ditambahkan $CHCl_3$ dan air, sehingga terdapat dua lapisan. Lapisan air diuji dengan

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/

menambahkan HCl pekat dan logam Mg, bila timbul marna merah berarti positif flavonoid. Tetapi sampel ini tidak menimbulkan warna merah.

5. Uji Saponin

Sampel dipotong kecil-kecil ditambah etanol secukupnya dan dididihkan. Kemudian disaring dan diuapkan alkoholnya sampai kering. Ekstrak yang tertinggal ditambahkan $CHCl_3$ dan air, sehingga terdapat dua lapisan. Lapisan air dikocok-kocok selama 15 menit bila timbul busa stabil selama 30 menit. Tetapi sampel ini tidak menimbulkan busa stabil.

3.2.4 Maserasi dengan metanol

Sebanyak 1.428 kilogram sampel kering dari daun *Tabernaemontana sphaerocarpa* Bl yang telah dihaluskan, selanjutnya dimaserasi 1 x 24 jam menggunakan pelarut metanol hingga maserat yang diperoleh tidak berwarna lagi. Maserat dikumpulkan dan pelarutnya diuapkan dengan alat *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak total metanol sebanyak 77.169 gram. Kemudian residunya dikeringanginkan.

3.2.5 Pemeriksaan ekstrak total metanol dengan KLT

Cara kerja KLT adalah sampel berupa campuran yang akan dipisahkan dilarutkan dalam pelarut yang sesuai. Sampel tersebut ditotolkan pada garis bawah plat dengan menggunakan pipa kapiler. Bila noda telah kering, plat dimasukkan ke dalam *chamber* yang telah jenuh dengan pelarut yang telah dipilih sebagai fase gerak. Pelarut bergerak melalui plat sampai batas yang telah ditentukan. Plat di ambil dan dikeringkan. Lalu diukur jarak perpindahan noda tersebut dan tentukan harga Rf-nya.

Untuk noda yang berwarna dapat langsung dilihat visual, tetapi untuk noda yang tidak berwarna harus terlebih dahulu diubah menjadi warna dengan menggunakan pereaksi penampak noda. Penampak noda yang digunakan adalah pereaksi Liebermann-Burchard, yaitu campuran asam sulfat dan asam asetat anhidrat, dan pereaksi Serium Sulfat, yaitu larutan 15% asam sulfat dan ditambah dengan sedikit kristal serium sulfat.

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/

Ekstrak total metanol diuji dengan KLT untuk menentukan jumlah komponen dalam ekstrak tersebut. Banyaknya komponen ditandai dengan banyaknya noda yang dihasilkan pada plat KLT. Selain untuk menentukan banyaknya komponen juga digunakan untuk mencari eluen dalam pola pemisahan yang baik pada ekstrak total metanol.

3.2.6 Pemisahan dengan kromatografi vakum cair (VLC)

Sebanyak 20 gram ekstrak total metanol dipisahkan dengan menggunakan kromatografi vakum cair. Pemisahan ini bertujuan untuk mempartisi ekstrak total metanol sehingga diperoleh fraksi heksan, fraksi etil asetat dan fraksi metanol. Ekstrak total metanol yang akan difraksinasi, terlebih dahulu dipreadsorbsi dengan silika gel dan dimasukkan ke dalam kolom. Selanjutnya dielusi secara bergradien menggunakan tiga eluen yang memiliki kepolaran meningkat, dimulai dari n-heksan 100%, kemudian dilanjutkan dengan etil asetat 100% dan diakhiri dengan metanol 100%. Pelarut yang ada diuapkan dengan *rotary evaporator* dan selanjutnya dilakukan uji KLT untuk mengetahui jumlah komponen dari ketiga fraksi. Kemudian fraksi etil asetat ini dipisahkan dengan kromatografi kolom. Hasil partisi menggunakan kromatografi vakum cair diperoleh fraksi heksan 0,8 gram, fraksi etil asetat 7 gram dan fraksi metanol 2 gram.

3.2.7 Pemeriksaan fraksi etil asetat dengan KLT

Fraksi etil asetat hasil pemisahan kromatografi vakum cair diuji dengan KLT. Plat KLT diberi batas atas dan bawah. Masing-masing komponen ditotolkan pada batas bawah, kemudian diberi nomor sesuai nomor urut sesuai urutan nomor vial. Plat dimasukkan ke dalam bejana pengembang yang telah jenuh dengan uap eluen. Selanjutnya plat dielusi dengan eluen sampai batas atas plat yang telah ditandai kemudian plat diangkat dan dikeringkan eluennya. Tandai noda dengan pensil. Jika noda yang dihasilkan tidak tampak bisa dibantu melihatnya dengan lampu UV atau pereaksi penampak noda. Kemudian ditentukan harga Rf-nya.

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/

3.2.8 Pemisahan fraksi etil asetat dengan kromatografi kolom

Fraksi etil asetat hasil kromatografi vakum cair selanjutnya dipisahkan dengan menggunakan kromatografi kolom. Sebanyak 2 gram fraksi etil asetat yang dibutuhkan untuk pemisahan ini.. Silika gel yang dibutuhkan untuk pembuatan kolom adalah sebanyak 40 gram. Kolom dapat dibuat dengan membuat bubur silika gel yang berfungsi sebagai zat penyerap, dengan cara merendamnya dengan heksan dan diaduk rata. Kemudian dituangkan ke dalam kolom secara perlahan-lahan. Silika gel dalam kolom dibuat padat dan permukaannya jangan sampai kering. Pengelusian kolom dilakukan dengan berbagai eluen yang memiliki kepolaran meningkat, mulai dari n-heksan 100%, perbandingan n-heksan dengan etil asetat sampai metanol 100%. Sampel dipreabsorpsi terlebih dahulu sebelum dimasukkan ke dalam kolom, kemudian dielusi dengan pelarut hingga terbentuk pita-pita. Hasil fraksinasi yang keluar ditampung dalam vial yang telah diberi nomor. Hasil pemisahan dengan kromatografi kolom ini diperoleh 241 vial.

3.2.9 Pemeriksaan hasil kromatografi kolom fraksi etil asetat dengan KLT

Fraksi-fraksi hasil pemisahan dengan kromatografi kolom selanjutnya dilakukan uji dengan KLT. Masing-masing fraksi ditotolkan pada plat KLT yang telah diberi nomor sesuai dengan nomor vial dengan menggunakan pipa kapiler kemudian dielusi dengan eluen yang sesuai dengan hasil KLT ekstrak kasar metanol sampai garis atas plat KLT. Proses elusi pada KLT, eluen dimasukkan ke dalam *chamber* agar tekanannya homogen. Setelah tekanan homogen, KLT dielusi sampai batas atas plat, lalu plat dikeluarkan dan dikeringkan. Untuk melihat noda yang dihasilkan dapat dilakukan dengan penyinaran lampu UV dan pereaksi penampak noda. Selanjutnya ditentukan harga Rf dari masing-masing noda. Vial-vial yang memiliki harga Rf yang sama digabungkan menjadi satu fraksi dan diuapkan pelarutnya. Hasil uji dengan KLT ini dihasilkan 6 fraksi. Pada fraksi pertama diperoleh padatan berwarna putih kekuningan sebanyak 25 mg.

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/

3.2.10 Rekristalisasi

Padatan berwarna putih kekuningan yang diperoleh dari pemisahan kromatografi kolom selanjutnya dimurnikan dengan cara rekristalisasi. Rekristalisasi dilakukan dengan cara melarutkan padatan dalam pelarut yang dapat melarutkannya dalam keadaan panas dan tidak larut dalam keadaan dingin. Padatan yang telah larut langsung disaring dan kemudian didinginkan sampai terbentuk kristal yang sempurna. setelah diperoleh kristal murni selanjutnya diuji titik lelehnya dengan menggunakan alat Fisher John. Untuk memastikan kemurnian dari kristal ini kemudian dilakukan uji KLT dengan eluen-eluen yaitu n-heksan 100%; Rf = 0,24, n-heksan : etil asetat (8:2); Rf = 0,75 dan n-heksan : etil asetat (5:5); Rf = 0.86.

Kristal yang telah murni ditandai dengan adanya 1 noda berbentuk bulat pada hasil uji KLTnya. Keempat eluen berbeda di atas yang digunakan untuk uji KLT menunjukkan bahwa kemungkinan kristal yang diperoleh telah murni. Kristal ini diberi nama TsM 1.

3.3 Karakterisasi

Sebanyak 10,7 miligram kristal TsM 1 dikarakterisasi dengan menggunakan spektroskopi ultraviolet (UV), spektroskopi inframerah (IR), dan spektroskopi resonansi magnetik inti (NMR 1D dan 2D) di Laboratorium Pusat Penelitian Kimia LIPI-Serpong.

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/