

BAB III METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Alat dan Bahan

3.1.1. Alat yang digunakan

Alat-alat yang digunakan di dalam penelitian ini adalah *rotary evaporator*, seperangkat alat destilasi, lumpang, neraca elektrik, spektrometer UV-Vis Shimadzu UV mini 1240, spektrometer FT-IR Perkin Elmer 1600, spektrometer NMR JEOL JNM_ECA 500 MHz, LC-MS ESI *Mariner Biospectrometry post ion*, kromatografi kolom, lampu UV tangan, alat pengukur titik leleh Fisher-John, bejana KLT, termostat, vial, pipa kapiler, plat KLT Kieselgel GF₂₅₄ 0,25 mm buatan Merck dan alat-alat gelas yang umum digunakan di laboratorium kimia.

3.1.2. Bahan yang digunakan

Bahan-bahan yang digunakan adalah n-heksana teknis, metanol teknis, diklorometana teknis, etil asetat teknis, n-heksana p.a, diklorometana p.a, etilasetat p.a, serium sulfat, asam asetat anhidrat, anisaldehida, Si-gel 60 (70-230 mesh dan 230-400 mesh) buatan Merck.

3.2. Prosedur Kerja

3.2.1. Pengambilan sampel

Sampel yang digunakan adalah daun tumbuhan *M. atropurpurea* yang diambil oleh Tim Organik Bahan Alam dari hutan di Desa Perantian Luas Kecamatan Logas Tanah Darat Taluk Kuantan Kabupaten Kuantan Singingi Provinsi Riau dengan koordinat 00° 22,223' LS dan 101° 41,187' BT pada ketinggian 69 meter di atas permukaan laut. Pengambilan sampel dilakukan pada tanggal 20 Oktober 2004. Tumbuhan ini memiliki nama daerah "Patame". Spesimen ini diberi kode LTD-12 dan kemudian diidentifikasi di Lembaga Herbarium Bogoriense LIPI-Bogor sebagai *Millettia atropurpurea*.

3.2.2. Persiapan sampel

1200 gram daun tumbuhan *M. atropurpurea* dibersihkan, dikeringanginkan, dipotong kecil-kecil kemudian dihaluskan dengan menggunakan lumpang. Serbuk halus yang didapatkan ditimbang seberat 1150 gram.

3.2.3. Isolasi senyawa kimia

1150 gram serbuk halus daun tumbuhan *M. atropurpurea* dimaserasi dengan pelarut metanol selama 24 jam kemudian disaring. Maserasi dilakukan beberapa kali sampai maserat agak bening. Maserat dikumpulkan dan selanjutnya diuapkan menggunakan *rotary evaporator*. Didapatkan 44,795 gram ekstrak total metanol. 20 gram ekstrak total metanol dilarutkan dengan sedikit metanol dan diekstraksi dengan n-heksana, selanjutnya diuapkan dengan *rotary evaporator*. Didapatkan 11,255 gram ekstrak metanol dan 8,021 gram ekstrak n-heksana.

3.2.4. Pemeriksaan dengan KLT

Untuk mengetahui jumlah komponen dalam ekstrak, digunakan uji KLT. Sedikit ekstrak dilarutkan, selanjutnya cuplikan larutan ini ditotolkan pada plat KLT yang telah diatur garis batasnya. Plat ini kemudian dikembangkan dengan menggunakan perbandingan pelarut yang berbeda-beda antara n-heksana, etilasetat atau metanol.

3.2.5. Pemisahan dengan menggunakan kromatografi kolom

Ekstrak n-heksana dipisahkan dengan kromatografi kolom. Hasil fraksinasi ditampung dalam vial-vial yang telah diberi nomor secara berurutan. Hasil pemisahan yang ada dalam vial-vial dilakukan uji KLT. Vial-vial yang memiliki harga R_f yang sama digabungkan menjadi satu fraksi. Hasil yang diperoleh berupa fraksi-fraksi.. Fraksi yang belum satu noda dipisahkan dengan menggunakan kolom fraksi. Fraksi senyawa yang sudah satu noda dan berupa padatan dilakukan rekristalisasi.

3.2.6. Rekristalisasi

Untuk memurnikan senyawa yang diperoleh dari hasil isolasi, dilakukan rekristalisasi. Senyawa yang diperoleh dilarutkan dengan pelarut yang sesuai pada keadaan panas dan kemudian disaring untuk memisahkan partikel yang tidak larut. Filtrat kemudian dibiarkan dingin sampai kristal terbentuk maksimum. Kristal disaring dan dicuci dengan pelarut dan kemudian dikeringkan. Untuk menguji kemurnian senyawa yang telah direkristalisasi, digunakan uji KLT. Jika hasil uji KLT sudah menunjukkan satu noda, selanjutnya dilakukan uji titik leleh.

3.2.7. Penentuan titik leleh

Untuk menentukan kemurnian senyawa yang diperoleh dapat digunakan alat penentu titik leleh Fisher-John. Sedikit senyawa ditempatkan pada tempat sampel yang tersedia kemudian dilihat titik lelehnya. Titik leleh adalah temperatur pada saat senyawa mulai meleleh sampai meleleh seluruhnya.

3.3. Karakterisasi

Senyawa murni yang didapatkan kemudian dikarakterisasi UV, IR, NMR dan MS. Untuk pengukuran spektrum UV, sampel dilarutkan dengan n-heksana sedangkan untuk pengukuran spektrum IR, sampel digerus dengan kalium bromida. Untuk karakterisasi NMR digunakan kloroform terdeuterasi sebagai pelarut. Untuk MS, sampel diinjeksi langsung ke dalam LC-MS ESI.