

2.5. Metoda Pemurnian Senyawa Bahan Alam

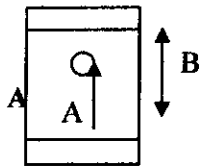
2.5.1. Metoda kromatografi

Penggunaan kromatografi sangat membantu dalam pendeteksian senyawa metabolit sekunder dan dapat dijadikan sebagai patokan untuk proses pengerjaan berikutnya dalam menentukan struktur senyawa. Kromatografi merupakan salah satu teknik pemisahan yang sering digunakan dalam setiap penelitian kimia (Wilcox and Wilcox Jr, 1995). Kromatografi digunakan untuk berbagai cara pemisahan berdasarkan partisi cuplikan antara fase gerak, dapat berupa gas atau cair, dan fase diam, dapat berupa zat cair atau padat (Johnson dan Stevenson, 1991).

2.5.2. Kromatografi lapis tipis

Kromatografi lapis tipis fasa diamnya berupa lapisan dan fasa geraknya mengalir karena kerja kapiler. Pada KLT, fasa cair berupa lapisan yang terdiri atas bahan padat yang dilapiskan kepada permukaan penyangga datar yang biasanya terbuat dari kaca, tetapi dapat pula terbuat dari plat polimer atau logam. Lapisan melekat kepada permukaan dengan bantuan bahan pengikat, biasanya kalsium sulfat atau amilum (pati). Pada KLT lapisan itu biasanya berfungsi sebagai permukaan padat yang menyerap, walaupun dapat pula dipakai sebagai penyangga zat cair.

Cara kerja KLT adalah: campuran yang akan dipisahkan dilarutkan kedalam pelarut yang sesuai, lalu ditotolkan pada plat yang sebelumnya telah diberi garis batas pada bagian atas dan bawahnya. Penotolan dilakukan dengan pipa kapiler. Hasil totolan yang berupa bercak pada plat dibiarkan menguap (kering), kemudian dimasukkan kedalam bejana yang berisi larutan pengembang yang cocok sebagai fasa gerak dan tempat eluen ditutup rapat, dibiarkan pelarut naik sampai pada garis batas plat (Gritter *et al.*, 1991). Bercak (noda) pemisahan yang diperoleh ditandai dengan pensil untuk menentukan harga R_f-nya. Harga R_f berkisar 0 sampai 1. Harga R_f dapat dihitung dengan membandingkan jarak yang ditempuh senyawa dengan jarak yang ditempuh pelarut.



$$R_f = \frac{A \text{ (Jarak yang ditempuh oleh senyawa)}}{B \text{ (Jarak yang ditempuh oleh eluen)}}$$

Gambar 1. Penentuan harga R_f

Untuk dapat menghitung jarak yang ditempuh oleh noda maka harus diketahui lokasi noda pada plat dengan tepat. Untuk noda yang berwarna dapat dilihat secara visual, tetapi untuk noda tertentu dapat diamati dibawah lampu UV. Sedangkan untuk komponen yang tidak berwarna harus terlebih dahulu diubah menjadi warna dengan menggunakan pereaksi penampak noda. Persamaan visualisasi warna dibandingkan dengan standar, dapat digunakan sebagai indikasi tambahan untuk mengidentifikasi suatu senyawa secara kualitatif, karena harga R_f belum tentu digunakan secara mutlak. Untuk senyawa-senyawa yang tidak berwarna harus dideteksi dengan cara penyinaran dengan lampu UV, memasukkan ke dalam uap iodium, atau dengan memakai pereaksi penampak noda. Pereaksi penampak noda yang sering digunakan misalnya pereaksi Lieberman-Burchard dan pereaksi serium sulfat (Gritter *et al.*, 1991).

2.5.3. Kromatografi kolom

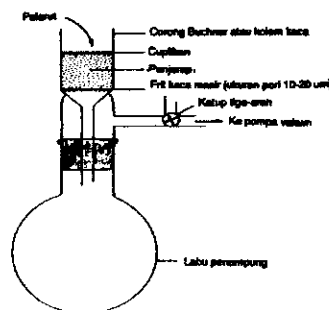
Kromatografi kolom merupakan salah satu metoda kromatografi dengan fase gerak cair dan fase diam padat. Kromatografi jenis ini digunakan untuk pemisahan skala preparatif dari miligram sampai puluhan gram. Pada kromatografi kolom, campuran yang akan dipisahkan diletakkan berupa pita pada bagian atas kolom adsorben yang berada dalam tabung kaca. Pelarut (fase gerak) dibiarkan mengalir melalui kolom karena aliran disebabkan oleh gaya berat atau didorong dengan tekanan. Pita senyawa akan bergerak melalui kolom dengan laju berbeda, memisah dan dikumpulkan berupa fraksi ketika keluar dari atas kolom (Gritter *et al.*, 1991).

Kolom kromatografi atau tabung untuk pengaliran karena gaya tarik bumi (gravitasi) atau sistem bertekanan rendah biasanya terbuat dari kaca yang

dilengkapi keran jenis tertentu pada bagian bawahnya untuk mengatur aliran pelarut. Jenis adsorben yang paling banyak digunakan dan mudah didapat berupa alumina dan silika gel (Gritter *et al.*, 1991).

2.5.4. Kromatografi cair vakum (VLC)

Kromatografi cair vakum (VLC) dikembangkan pertama kali oleh Targett dan kawan-kawan. VLC awalnya dikembangkan karena ketidak sabaran para kimiawan Australia yang masih menggunakan kromatografi kolom. VLC telah digunakan untuk mengisolasi diterpen senebrenoid dari terumbu karang lunak Australia (Hostettmann *et al.*, 1995).



Gambar 2. Kolom VLC

Pada kromatografi cair vakum, kolom kromatografi dikemas kering dalam keadaan vakum agar diperoleh kerapatan kemasan maksimum. Vakum dihentikan, pelarut yang kepolarannya rendah dituang ke permukaan fasa diam (silika gel) lalu divakumkan lagi. Kolom dihisap sampai kering dan sekarang siap dipakai secara perlahan-lahan ke dalam kemasan dengan memvakumnya. Kolom dielusi dengan campuran pelarut yang cocok, mulai dengan pelarut yang kepolarannya rendah lalu kepolaran ditingkatkan perlahan-lahan, kolom dihisap sampai kering pada setiap pengumpulan fraksi (Hostettmann *et al.*, 1995).

2.5.5. Kromatografi cepat (Flash Chromatography)

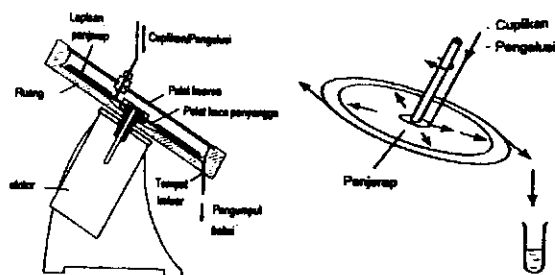
Kromatografi cepat merupakan salah satu teknik kromatografi yang cepat dan mudah. Pada kromatografi cepat, pelarut pengembang didorong dengan cepat (dengan tekanan gas) melalui kolom bergaris tengah besar, tetapi pendek, berisi penyerap (silika gel) basah yang ukuran partikelnya dikendalikan dengan agak ketat. Daerah linarut dielusi menjadi beberapa fraksi dan semua fraksi dianalisis dengan KLT (Gritter *et al.*, 1991).

Silika gel yang digunakan dalam kromatografi cepat berukuran antara 40-60 μm (230-240 mesh). Kolom kromatografi cepat dilengkapi dengan sistem katup jarum dan pengendali aliran. Tekanan dapat diperoleh dari pipa udara bersih atau tangki gas nitrogen yang disambungkan dengan pengatur aliran. Jika sistem dirakit, udara atau nitrogen keluar dari katup jarum terbuka. Jika katup ditutup atau ditutup sebagian, tekanan akan meningkat. Hal ini menyebabkan pengembangan kromatogram secara cepat (Gritter *et al.*, 1991).

2.5.6. Kromatografi radial (Chromatotron)

Salah satu teknik kromatografi yang digunakan untuk memisahkan senyawa-senyawa kimia bahan alam adalah teknik kromatografi radial. Pelat kromatografi radial adalah pelat kaca bundar bergaris tengah 24 cm yang dilapisi dengan fasa diam (silika gel) yang cocok sehingga terbentuk lapisan tipis untuk pemisahan preparatif (Hostettmann *et al.*, 1995).

Kromatografi radial yang telah dibuat dipasang pada poros motor listrik dan diputar pada 800 rpm. Ketebalan fasa diam 1-4 mm dan sampel yang dapat dipisahkan sebanyak 0,1-1 g dengan perbedaan R_f antara 0,2-0,5. pada awal pemisahan pelarut yang digunakan mulai dari kepolaran rendah kemudian ditingkatkan kepolarannya secara bergradien (Hostettmann *et al.*, 1995).



Gambar 3. Bagan Chromatotron dan prinsip kerja Chromatotron.

Rotor terdapat dalam ruang yang tertutup dengan pelat kaca kuarsa. Penutup ini memungkinkan kita mengamati bercak tanwarna tetapi dapat menyerap sinar UV dengan memakai lampu UV. Gas nitrogen dialirkan ke dalam ruang pelat untuk mencegah pengembunan pelarut pengelusi dan untuk mencegah oksidasi cuplikan (Hostettmann *et al.*, 1995).

Keuntungan kromatografi radial yaitu cara kerja sederhana, pemisahan cepat, pelarut yang digunakan sedikit, rotor yang sudah dilapisi dapat didegradasi dan perolehan kembali senyawa yang dipisah lebih besar dari pada KLT preparatif. Kelemahan kromatografi radial yaitu fasa diam yang dapat dipilih terbatas, rotor yang sudah dilapisi tidak ditemukan dalam perdagangan, daya pisah terbatas dan cara pendeteksiian terbatas (Hostettmann *et al.*, 1995).

2.5.7. Rekristalisasi

Hasil pemisahan berupa padatan atau kristal yang belum murni, dilakukan rekristalisasi untuk menghilangkan kotoran atau zat warna yang masih melekat pada kristal. Rekristalisasi dilakukan dengan melarutkan padatan yang didapat dengan pelarut yang sesuai, padatan tersebut dapat larut dalam keadaan panas dan tidak dapat larut dalam keadaan dingin. Padatan yang telah larut dalam keadaan panas langsung disaring dan kemudian didinginkan. Adanya kristal yang terbentuk disaring dengan corong Buchner dan dicuci dengan pelarut dingin lalu dikeringkan. Hasil rekristalisasi ini di uji kemurniannya dengan uji KLT di dalam berbagai eluen dan uji titik lelehnya.

2.5.8. Uji titik leleh

Titik leleh merupakan temperatur keadaan suatu kristal mulai meleleh sampai kristal meleleh seluruhnya. Pemeriksaan titik leleh suatu senyawa yang tidak dikenal dapat dilakukan dengan menggunakan alat-alat yang sederhana, misalnya Ordinary, Thiele, Fisher-Jones. Pengamatan titik leleh yang telah dilakukan harus secermat mungkin, terutama bila diperkirakan telah mendekati titik lelehnya.

Menurut Sharp *et al*, (1989) kegunaan penentuan titik leleh suatu senyawa adalah penentuan kemurnian. Pada penentuan titik leleh suatu senyawa, bila harga yang diperoleh memiliki selisih angka yang lebih kecil dari 2°C , maka senyawa tersebut dapat dikatakan memiliki kemurnian yang baik, tetapi jika selisihnya lebih besar dari 2°C , maka senyawa tersebut belum murni.

2.6. Metoda Karakterisasi dan Identifikasi

Secara umum ada beberapa teknik spektroskopi utama yang digunakan untuk mengkarakterisasi dan mengidentifikasi senyawa bahan alam. Teknik-teknik tersebut adalah spektrofotometer ultraviolet-tampak (ultraviolet-visible UV-Vis), inframerah (infrared, IR), spektroskopi massa (Mass Spectroscopy, MS) dan resonansi magnet inti (Nuclear Magnetic Resonance, NMR). Semua metoda ini menghasilkan data spektroskopi yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi dan mengkarakterisasi senyawa-senyawa bahan alam.

2.6.1. Spektroskopi inframerah

Spektroskopi IR digunakan untuk menentukan informasi-informasi secara struktural dari senyawa-senyawa organik (Wingrove and Caret, 1981). Spektroskopi IR spesifik digunakan untuk mendeteksi dan mengidentifikasi gugus-gugus fungsi. Daerah radiasi spektroskopi IR berkisar pada bilangan gelombang 4000 cm^{-1} sampai 625 cm^{-1} (Ternay, 1979). Absorpsi radiasi sinar IR dapat menentukan tipe ikatan uluran dan tekukan suatu molekul. Panjang gelombang dari absorpsi oleh suatu tipe ikatan tertentu, bergantung pada bermacam getaran dari ikatan tersebut. Oleh karena itu, tipe ikatan yang berlainan

(C-H, C-C, O-H dan sebagainya) menyerap radiasi pada panjang gelombang karakteristik yang berlainan (Ternay, 1979).

Metoda IR merupakan cara yang paling sederhana, paling cepat dan paling dapat diandalkan dalam menentukan gugus fungsi. Frekwensi vibrasi suatu ikatan dapat dihitung dengan menggunakan hukum Hooke (Wingrove and Caret, 1981):

$$V = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{k}{\frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2}}}$$

Dimana :

- V = frekwensi vibrasi (s^{-1})
- K = konstanta gaya untuk ikatan kimia ($N\ cm^{-1}$)
- m_1, m_2 = massa atom yang terlibat (gram)
- c = kecepatan cahaya ($3 \times 10^{10}\ cm^{-1}$)

2.6.2. Spektroskopi ultraviolet dan sinar tampak

Penyerapan sinar tampak dan ultraviolet oleh suatu molekul akan menghasilkan transisi diantara tingkat energi elektronik molekul tersebut, dinamakan spektroskopi elektronik (Sudjadi, 1983). Spektrum tampak terentang dari sekitar 400 nm (ungu) sampai 750 nm (merah). Spektrum ultraviolet terentang dari sekitar 100 sampai 400 nm (Wilcox and Wilcox Jr, 1995). Untuk keperluan penentuan struktur, spektroskopi UV dan sinar tampak digunakan untuk mengukur jumlah ikatan rangkap atau konjugasi aromatik di dalam suatu molekul (Sudjadi, 1983).

Dua hukum empiris telah merumuskan intensitas serapan, yaitu hukum Lamber dan Hukum Beer. Hukum Lamber menyatakan bahwa fraksi penyerapan sinar tidak bergantung dari intensitas cahaya. Hukum Beer menyatakan bahwa penyerapan sebanding dengan jumlah molekul yang menyerap. Dari hukum

Lamber-Beer dapat diketahui hubungan antara transmitansi, tebal cuplikan dan konsentrasi (Ternay, 1979).

$$\text{Log } \frac{I_0}{I} abc = A$$

Dimana :

- I_0 = intensitas sinar awal
- I = intensitas sinar yang diteruskan
- a = absorptivitas molar
- b = tebal sel (cm)
- c = konsentrasi (mol/L)
- A = absorbansi

2.6.3. Spektroskopi GC-MS

Kromatografi gas berfungsi sebagai alat pemisah atau pemurni, misalnya untuk pemisahan senyawa kompleks, senyawa organometalik, minyak atsiri dan lain-lain. Semua alat kromatografi gas harus mempunyai gas pembawa yang bertindak sebagai fasa mobil. Disamping itu terdapat kolom yang biasanya terletak di dalam oven. Sampel dimasukkan ke dalam aliran gas melalui sistem injeksi dan komponen-komponen yang telah dipisahkan dideteksi oleh detektor yang digabungkan dengan rekorder (Gritter *et al.*, 1991).

Kromatografi gas merupakan metode yang tepat dan cepat untuk memisahkan campuran yang rumit. Waktu yang dibutuhkan beragam, mulai dari beberapa detik untuk campuran sederhana sampai berjam-jam untuk campuran yang rumit. Komponen campuran dapat diidentifikasi dengan menggunakan waktu retensi yang khas pada kondisi yang tepat. Waktu retensi adalah waktu yang menunjukkan berapa lama suatu senyawa tertahan dalam kolom (Gritter *et al.*, 1991).

Spektroskopi massa adalah metode penentuan senyawa organik yang berdasarkan kepada pengukuran massa dan fragmen-fragmen dari senyawa-senyawa yang akan ditentukan. Saat ini penggunaan spektroskopi massa telah dikenal luas karena telah ditemukan alat yang dapat menguapkan hampir semua

senyawa organik dan mengionkan uap tersebut, dan fragmen bermuatan yang dihasilkan dari ion molekul dapat dihubungkan dengan struktur molekulnya.

Pada spektrokopi massa, reaksi pertama suatu molekul adalah ionisasi awal (pengambilan) sebuah elektron. Hilangnya sebuah elektron menghasilkan ion molekul. Setelah ionisasi awal, ion molekul akan mengalami fragmentasi. Sebuah ion molekul tidak pecah secara acak, melainkan cenderung membentuk fragmen-fragmen yang stabil. Pada spektroskopi massa dapat ditentukan nilai m/z atau berat molekul dari suatu senyawa organik. Potensial ionisasi kebanyakan senyawa organik adalah antara 185-300 kkal/mol. Struktur dan massa fragmen memberikan petunjuk mengenai struktur molekul induknya, dan menentukan bobot molekul suatu senyawa dari spektrum massanya (Fessenden and Fessenden, 1986).

Dengan teknologi modern GC dapat digabungkan dengan MS atau yang dikenal dengan GC-MS. Alat ini dapat mengidentifikasi langsung senyawa-senyawa dengan membandingkan dengan database yang ada atau lebih dikenal dengan library.

2.6.4. Spektroskopi NMR

Metode spektroskopi ini didasarkan pada pengukuran absorpsi radiasi elektromagnetik oleh partikel yang sedang berputar pada daerah frekuensi 4-600 MHz atau panjang gelombang 15-0,5 m. Spektroskopi NMR yang biasa digunakan adalah spektroskopi proton, yang memberikan informasi struktural mengenai atom-atom hidrogen dalam suatu molekul organik, dan spektroskopi NMR karbon-13 yang menghasilkan karbon-karbon dalam suatu molekul organik (Fessenden and Fessenden, 1986).

TMS digunakan sebagai pembanding dalam pada NMR, dan geseran-geseran kimia diukur kebawah medan dari *peak* TMS. Kebanyakan proton dalam spektra ^1H NMR menunjukkan absorpsi antara 0-10 ppm (nilai δ) dibawah medan pada NMR. Absorpsi ^{13}C NMR dijumpai antara 0-200 ppm dibawah medan TMS (Fessenden and Fessenden, 1986). Penggunaan TMS sudah jarang digunakan karena puncak dari pelarut dapat pula digunakan sebagai standar.