

BAB III METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Alat dan Bahan

3.1.1. Alat-alat yang digunakan

Alat-alat yang digunakan adalah seperangkat destilasi sederhana (Elektromantel MX), neraca analitik, ultrasonik Kery Pulsatron, *rotary evaporator* (Rotavapor R-114), corong pisah (*separatory funnel*), seperangkat alat VLC, seperangkat alat kromatografi radial seri No. 96 E USA, spektrometer NMR (Bruker Avance DRX 500), GC-MS (Seri Agilent 6890 dengan detektor FID dan MSD, kolom SGE BPX-5 50 m), lampu UV, oven, lumpang dan alat-alat gelas yang biasa dipakai di laboratorium.

3.1.2. Bahan yang digunakan

Sebagai bahan tumbuhan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun tumbuhan *Artabotrys sp.* Pelarut dan bahan kimia yang digunakan adalah: *n*-heksan, etilasetat, butanol p.a, metanol, aseton, serum sulfat, CDCl_3 , silika gel 60 GF₂₅₄, silika gel 60 PF₂₅₄ dan plat KLT preparatif.

3.2. Prosedur Kerja

3.2.1. Pengambilan sampel

Daun tumbuhan akar silayu (*Artabotrys sp.*) diambil dari Kecamatan Logas Tanah Darat Kabupaten Kuantan Singingi, Provinsi Riau. Dengan pendekatan fitokimia yang meliputi penelitian untuk jenis senyawa tertentu yang ada dalam tumbuh-tumbuhan. Tumbuhan yang diambil harus lengkap organnya, seperti organ vegetatif (batang dan daun) dan organ generatif (bunga, buah, biji, dan umbi) agar proses identifikasi lebih cepat dan akurat. Bagian tumbuhan yang dikoleksi selain untuk pembuatan herbarium juga digunakan untuk uji fitokimia. Nama spesiesnya diidentifikasi pada Lembaga Herbarium Universitas Andalas (ANDA) Padang dan dinyatakan sebagai spesies *Artabotrys sp.*

3.2.2. Perlakuan sampel

Bahan tumbuhan yang digunakan adalah daun tumbuhan *Artabotrys sp*, terlebih dahulu daunnya dibersihkan dari kotoran yang melekat, kemudian dikeringkan tanpa pemanasan oleh sinar matahari langsung tetapi dengan aliran udara yang baik, setelah itu digunting kecil-kecil, lalu dirajang dan dihaluskan dengan menggunakan blender.

3.2.3. Isolasi senyawa kimia dari daun *Artabotrys sp*

Bahan tumbuhan *Artabotrys sp* sebanyak 1.400 gram yang berupa serbuk dimaserasi dengan menggunakan pelarut berdasarkan prinsip kepolaran yaitu metanol. Perendaman dilakukan selama kurang lebih 48 jam, kemudian maseratnya ditampung. Hal ini dilakukan berulang-ulang sampai maserat yang dihasilkan tidak berwarna lagi. Kemudian maserat diuapkan dengan *rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak kental dan ditimbang beratnya.

3.2.4. Penentuan jumlah komponen dengan KLT

Untuk menentukan banyaknya jumlah komponen dalam bahan tumbuhan dapat digunakan kromatografi lapis tipis. KLT dilakukan dengan menggunakan perbandingan pelarut yang sesuai. Banyaknya jumlah komponen ditandai dengan banyaknya noda yang terpisah dengan baik pada plat KLT (Gritter *et al.*, 1991).

3.2.5. Pemisahan dengan kromatografi cair vakum (VLC)

Pemisahan senyawa-senyawa dalam cuplikan salah satunya dengan menggunakan metode kromatografi cair vakum. Teknik pemisahan menggunakan pompa penghisap untuk mempercepat proses elusi, eluen ditambahkan secara bertahap dalam volume tertentu dan elusi dilakukan hingga kering sebelum penambahan eluen berikutnya (Hostettmann *et al.*, 1995).

Pembuatan eluen dilakukan sebagai berikut: pertama pengisian kolom dengan adsorben sambil dihisap oleh penghisap. Kemudian sampel ditempatkan pada bagian atas dan elusi dimulai dari atas dengan eluen yang nonpolar terlebih

dahulu. Eluen yang keluar ditampung dalam jumlah volume tertentu (Hostettmann *et al.*, 1995).

Untuk memisahkan senyawa-senyawa yang ada dalam ekstrak dilakukan fraksinasi dengan menggunakan kromatografi cair vakum. Kromatografi cair vakum dibuat dengan fasa diam silika gel 60GF₂₅₄. Ekstrak yang akan difraksinasi dilakukan preabsorpsi, selanjutnya dimasukkan pada bagian atas kolom. Kolom di elusi (dibantu alat vakum) secara bergradien menggunakan pelarut *n*-heksan dan etilasetat. Peningkatan kepolaran ditingkatkan secara perlahan-lahan. Pengerjaan ini dapat dilakukan dalam waktu 3 jam. Hasil pemisahan ditampung dalam erlenmeyer yang telah diberi nomor (Hostettmann *et al.*, 1995).

3.2.6. Pemisahan dengan kromatografi radial (Chromatotron).

Pemisahan dengan kromatografi radial menggunakan plat kaca yang berbentuk bundar dilapisi dengan bubuk silika gel 60 PF₂₅₄ dan akuades dingin. ketebalan silika gel yang dipakai sesuai dengan banyaknya sampel yang akan dipisahkan yaitu: 1 mm, 2 mm dan 4 mm. Perbandingan antara silika gel dengan akuades dingin yang ditetapkan yaitu untuk 1 mm (45:90), 2 mm (65:130) dan 4 mm (115:200).

Pembuatan plat kaca dilakukan dengan mencampurkan silika gel dan akuades dingin sesuai perbandingan yang telah ditentukan. Bubur tersebut diratakan pada pelat kaca, pada bagian pinggir atau tepi plat diberi selotip agar bubuk silika gel tidak tumpah kemudian bubuk diratakan dengan suatu alat dengan cara memutar plat pada satu arah secara perlahan. Setelah plat selesai dibuat, plat dapat dikeringkan selama ± 24 jam atau dapat dikeringkan dalam oven pada suhu 60-70 °C.

Plat kromatografi radial yang telah dibuat dipasang pada poros listrik dan diputar pada 800 rpm. Ketebalan fasa diam 1-4 mm dan sampel yang dapat dipisahkan sebanyak 0,1-1 g. Pada awal pemisahn pelarut yang digunakan mulai dari kepolaran rendah kemudian ditingkatkan kepolaran secara bergradien. Rotor terdapat dalam ruang yang tertutup dengan plat kaca kuarsa. Penutup ini memungkinkan kita mengamati bercak tak berwarna tetapi dapat menyerap sinar

UV dengan memakai lampu UV. Hasil pemisahan kromatografi radial ditampung didalam vial.

3.2.7. Pengujian Hasil Pemisahan dengan KLT

Untuk mengetahui hasil pemisahan kromatografi cair vakum dan pemisahan kromatografi radial maka dilakukan uji dengan KLT. Plat KLT diberi garis kurang lebih 1 cm dari bawah dan atas. Masing-masing komponen ditotolkan pada batas bawah, kemudian diberi nomor sesuai dengan urutan vial. Plat dimasukkan ke dalam bejana pengembang yang telah jenuh dengan uap eluan. Eluen akan merambat keatas sesuai dengan gaya kapilaritas. Setelah eluen sampai digaris batas atas, plat dikeluarkan, sisa eluen diuapkan dengan udara terbuka. Noda dinampakkan dengan menggunakan lampu UV atau pereaksi penampak noda seperti serium sulfat dan uap iodium (Gritter *et al.*, 1991).

3.2.8. Pemisahan dengan KLT preparatif

KLT preparatif adalah suatu teknik pemisahan yang sangat sederhana untuk pemisahan cuplikan kecil (50 mg sampai 1 g). Cuplikan yang akan dipisahkan ditotolkan berupa garis pada salah satu sisi plat dan dikembangkan. Setelah terbentuk pita, maka pita tersebut dikerok dan disaring. Cuplikan yang didapat dilakukan KLT.

3.2.9. Rekristalisasi dan penentuan titik leleh

Untuk memurnikan hasil yang berupa padatan atau kristal pada uji KLT belum memberikan noda yang tunggal maka dilakukan rekristalisasi, yaitu kristal larut dalam keadaan panas dan mengkristal kembali dalam keadaan dingin. Kristal yang telah larut dalam pelarut panas, disaring panas-panas, kemudian pelarut yang telah disaring didinginkan, kemudian akan terbentuk kristal lalu disaring dengan corong buchner. Hasil rekristalisasi ditentukan titik lelehnya dengan alat pengukur titik leleh Fisher-Johns. Pembacaan titik lelehnya dilakukan pada saat kristal mulai meleleh sampai kristal meleleh seluruhnya. Harga range titik leleh adalah $< 2^{\circ}\text{C}$, hal ini menunjukkan kemurnian kristal.

3.3. Karakterisasi dan Identifikasi Senyawa Murni

Kristal atau padatan yang telah murni, ditimbang dan dilarutkan dengan pelarut organik yang sesuai kemudian dilakukan karakterisasi dengan spektrometer ^1H NMR. Ekstrak *n*-heksana dan metanol yang diperoleh dilakukan identifikasi menggunakan GC-MS.

3.3.1. Cara kerja NMR

NMR digunakan untuk mengkarakterisasi senyawa yang telah murni. Spektra NMR diperoleh menggunakan spektrometer Bruker Avance DRX-500 dengan perangkat lunak Xwin-NMR. Spektra ^1H -NMR dicatat pada 500.13 MHz, menggunakan pelarut berdeuterium dengan puncak pelarut sebagai standar. Semua pergeseran kimia (δ) ditandai dengan satuan part per million (ppm).

3.3.2. Cara kerja GC-MS

GC-MS digunakan untuk mengidentifikasi ekstrak *n*-heksana dan metanol yang dioperasikan pada 70 eV dan menggunakan kolom SGE BPX-5 50 m. Suhu oven diatur pada 50 $^{\circ}\text{C}$ untuk 1 menit, kemudian ditingkatkan sampai 300 $^{\circ}\text{C}$ (pada 4 $^{\circ}\text{C}/\text{menit}$) dengan 10 menit waktu akhir. Helium digunakan sebagai gas pembawa, dengan aliran tetap 1,9 ml/menit. Suhu injektor dan detektor diatur pada 250 $^{\circ}\text{C}$. Volume injeksi yang digunakan sebanyak 1 μl .