

### III. METODOLOGI PENELITIAN

#### 3.1. Peralatan dan Bahan Kimia yang Dibutuhkan

Alat-alat yang dipakai dalam penelitian ini adalah: rotary evaporator, kolom kromatografi, spektrometri 20 D UV/Vis, pH meter, mikropipet 200-1000 $\mu$ L, plat KLT, inkubator, autoclave dan lain-lain.

Bahan kimia yang dipergunakan antara lain adalah etanol absolut, heksana, etilasetat, metanol, asam linoleat, asam klorida, ferro klorida, buffer natrium fosfat pH 7, ammonium tiosianat,  $\alpha$ -tokoferol, etanol 75%, silika gel 70-230 mesh dan lain-lain.

#### 3.2. Persiapan Sampel

Tumbuhan daun dewa (*Gynura divaricata* DC) diambil daunnya kemudian dibersihkan. Daun tumbuhan ini dikeringkan dengan cara menganginkan ditempat yang terlindung dari sinar matahari. Daun yang telah kering ditumbuk menjadi bubuk dan siap untuk diekstrak dengan pelarut heksana dan metanol.

#### 3.3. Isolasi Senyawa Kimia dari Daun Dewa (*Gynura divaricata*)

Daun tumbuhan *Gynura divaricata* berupa bubuk kering diperkolasi terlebih dahulu dengan pelarut heksana sampai perkolat/ekstrak terakhir menunjukkan uji negatif terhadap pereaksi Liebermann-Burchard (L.B). Perkolat heksana ini diuapkan pelarutnya sehingga diperoleh ekstrak kental heksana. Residu setelah perkolasi dengan pelarut heksana kemudian diperkolasi kembali dengan pelarut metanol sampai perkolat terakhir menunjukkan uji negatif dengan pereaksi  $FeCl_3$ . Perkolat metanol ini diuapkan metanolnya, dan didapatkan ekstrak kental metanol. Ekstrak heksana dan ekstrak metanol ini akan dilakukan fraksinasi atau pemisahan dengan kromatografi kolom.

#### 3.4. Pemisahan Senyawa dengan Kromatografi Kolom

Ekstrak heksana dan ekstrak metanol dilakukan pemisahan/fraksinasi dengan kromatografi kolom. Untuk mencegah terjadinya oksidasi, kolom ditutup dengan aluminium

foil. Kromatografi kolom diekusi dengan eluen nonpolar seperti heksana dan ditingkatkan kepolarannya dengan etilasetat dan metanol. Hasil penggoloman ditampung dalam vial-vial kaca yang telah diberi nomor. Hasil penggoloman ini dilakukan kromatografi lapis tipis untuk melihat hasil pemisahan dan harga Rf masing-masing fraksi yang terpisah. Vial yang mempunyai Rf sama dijadikan menjadi satu fraksi dan pelarutnya diuapkan. Fraksi yang berupa padatan dilakukan pemurnian dengan cara kristalisasi sampai diperoleh senyawa murni.

Senyawa murni yang diperoleh dilakukan uji kemurnian dengan uji KLT dan penentuan titik leleh. Senyawa murni yang mempunyai satu noda pada KLT dengan berbagai sistem eluen dan mempunyai kisaran titik leleh  $\leq 2^\circ \text{C}$ , menunjukkan senyawa tersebut telah murni. Masing-masing fraksi dan senyawa murni yang diperoleh akan dilakukan uji aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode *ferric thiocyanate* (FTC). Sebagai senyawa pembanding dipergunakan  $\alpha$ -tokoferol.

Senyawa murni yang diperoleh dikarakterisasi dengan spektroskopi ultraviolet (UV) dan spektroskopi inframerah (IR).

### 3.5. Uji Aktivitas Antioksidan

Masing-masing fraksi hasil kromatografi kolom dan senyawa murni dilakukan uji aktivitas antioksidan, dengan prosedur sebagai berikut:

4 mg sampel/ekstrak dan 4,1 ml asam linoleat 2,51% dilarutkan dalam 8 ml etanol 99,5 % kemudian ditambahkan 8 ml buffer natrium fosfat (0,05 M, pH 7,0) dan 3,9 ml air. Campuran dimasukkan dalam tabung reaksi 20 ml ditutup rapat, kemudian disimpan di dalam inkubator pada suhu  $40^\circ \text{C}$ . Ke dalam 0,1 ml larutan ini (untuk blanko 0,1 ml air suling) ditambahkan 9,7 ml 75 % etanol dan 0,1 ml 30 %  $\text{Ni}_4\text{SCN}$ , setelah 3 menit ditambahkan 0,1ml  $\text{FeCl}_2$  0,02 M dalam HCl 3,5%.

Larutan berwarna merah yang muncul diukur adsorbansinya pada panjang gelombang 500 nm setiap 24 jam sampai satu hari sesudah larutan kontrol mencapai adsorbansi maksimum. Prosedur ini juga dilakukan untuk kontrol (tanpa sampel) dan senyawa  $\alpha$ -tokoferol sebagai pembanding.