III. BAHAN DAN METODA

3.1. Alat dan Bahan

3.1.1. Alat-alat yang digunakan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :peralatan distilasi, neraca analitik, *rotary evaporator* (Rotavapor R-114), *ultrasonicator* Kery Pulsatron, lumpang, kolom kromatografi, seperangkat alat kromatografi vakum cair, *chamber*, vial, pipa kapiler, lampu ultraviolet (Model UVL-56), vortek, spektrofotometer UV Visible Shimadzu 1240, spektrofotometer ^{1}H NMR merk JEOL type ECA 500 dengan medan magnet 500,1599 MHz dan peralatan gelas yang biasa dipakai di laboratorium kimia.

3.1.2. Bahan-bahan yang digunakan

Sebagai sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah kulit batang tumbuhan *Polyalthia sp* (DA-TN 052). Bahan yang digunakan adalah n-heksan, etil asetat, metanol, diklorometan, etanol absolut, kloroform pa, DPPH, BHT, silika gel 70-230 mesh, silika gel 60 GF_{254}, plat KLT GF_{254}, reagen penampak noda anisaldehid, alumunium foil dan aquadest.

3.2. Prosedur Penelitian

3.2.1. Penyediaan sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah kulit batang *Polyalthia sp* (DA-TN 052) yang diperoleh dari Tesso Nilo Provinsi Riau. Sampel terlebih dahulu dibersihkan, kemudian dipotong kecil-kecil dan dikeringkan tanpa terkena sinar matahari langsung, setelah itu diblender hingga halus. Selanjutnya ditimbang beberapa kali sampai beratnya tidak berubah.

3.2.2. Isolasi senyawa metabolit sekunder

3.2.2.1. Ekstraksi

Sampel kering yang sudah halus dari kulit batang *Polyalthia sp* (DA-TN 052) sebanyak 1 kg dimaserasi menggunakan pelarut metanol selama 24 jam, kemudian maseratnya dipisahkan. Sebelum dilakukan pemisahan, sampel

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

pelarutnya diuapkan dengan alat *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental metanol. Hal ini dilakukan berulang-ulang. Kemudian ekstrak keseluruhan ditimbang.

3.2.2.2. Pengujian dengan KLT

Ekstrak kental metanol dilakukan uji KLT untuk menentukan jumlah komponen dalam ekstrak tersebut. Banyaknya komponen ditandai dengan banyaknya noda yang dihasilkan pada plat KLT. Selain untuk menentukan banyaknya komponen, digunakan juga untuk mencari eluen yang tepat yang dapat menghasilkan pola pemisahan yang baik.

Sampel ekstrak metanol diambil sedikit dan dilarutkan dengan metanol sampai larut. Kemudian sampel ditotolkan menggunakan pipa kapiler pada batas bawah plat KLT yang telah dipotong dan telah diberi garis batas bawah dan batas atas. Selanjutnya dimasukkan ke dalam *chamber* yang telah dijenuhkan dengan eluen dan diberi kertas saring lalu ditutup agar tekanannya homogen. Setalah sampai batas atas plat, lalu plat dikeluarkan dan dikeringkan. Untuk melihat noda yang dihasilkan dapat dilakukan dengan penyinaran lampu UV atau dengan pemberian pereaksi penampak noda yang kemudian dipanaskan di atas *hot plate* sampai tampak noda yang jelas kemudian ditandai dengan pensil.

3.2.2.3. Partisi

Partisi merupakan salah satu metoda ekstraksi yang prinsipnya adalah memisahkan suatu komponen cair dari larutan campurannya dengan penambahan pelarut lain yang sifatnya sedikit bercampur atau tidak bercampur, dengan demikian komponen tersebut akan terdistribusi dengan sendirinya di kedua pelarut dan membentuk 2 lapisan.

Ekstrak kental metanol sebanyak 15 g dilarutkan dengan pelarut metanol dan air dengan perbandingan 7:3, kemudian dimasukkan ke dalam corong pisah. Selanjutnya dipartisi dengan pelarut n-heksan (1:1). Setelah membentuk dua lapisah, kemudian lapisan n-heksan ditampung. Hal ini dilakukan berulang-ulang. Lalu dilanjutkan dengan pelarut diklorometan (1:1) dengan cara yang sama. Lapisan yang sudah ditampung kemudian diuapkan pelarutnya dengan *rotary*

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

evaporator sehingga diperoleh ekstrak kental metanol, diklorometan dan n-heksan.

3.2.2.4. Pemisahan dengan kromatografi vakum cair

Hasil uji KLT dari ketiga ekstrak tersebut menunjukkan ekstrak diklorometan mengandung komponen senyawa yang cukup baik pemisahannya. Untuk memisahkan senyawa-senyawa tersebut dilakukan fraksinasi dengan menggunakan kromatografi kolom vakum cair. Kolom diisi dengan silika gel 60 GF_{245} setinggi lebih kurang 5 cm. Pengisian kolom dilakukan dalam keadaan vakum, agar diperoleh kerapatan kemasan maksimum. Sampel yang akan dipisahkan sebanyak 2,5 gr sebelumnya dilakukan preadsorbsi dan dimasukkan ke dalam kolom. Selanjutnya dielusi secara bergradien menggunakan perbandingan pelarut dari n-heksan : etilasetat (5:5) sampai etilasetat : metanol (5:5). Hasil pemisahan ditampung dalam erlenmeyer yang telah diberi nomor.

3.2.2.5. Pengujian hasil pemisahan dengan KLT

Fraksi-fraksi hasil pemisahan secara kromatografi vakum cair dilakukan uji KLT dengan cara menotolkan masing-masing fraksi pada plat KLT yang diberi garis 1 cm di bawah dan 0,5 cm di atasnya dengan menggunakan pipa kapiler. Masing-masing ditotolkan pada plat yang telah diberi nomor sesuai dengan nomor vial, kemudian dielusi dengan eluen yang sesuai dengan hasil KLT ekstrak kasar. Vial-vial yang mempunyai harga Rf yang sama, digabungkan menjadi satu fraksi untuk dilakukan pemisahan kembali dengan kromatografi kolom.

3.2.2.6. Pemisahan dengan kromatografi kolom

Prinsip kerjanya hampir sama dengan kromatografi vakum cair. Perbedaannya adalah fase diam yang digunakan adalah silika gel 60 (70-230) dan sebelum dimasukan ke dalam kolom, dibuat bubur silika dengan cara mencampurkan silika dengan pelarut heksan dan diaduk rata. Kemudian dituangkan ke dalam kolom secara perlahan-lahan. Silika gel dalam kolom dibuat padat dan permukaannya jangan sampai kering. Setelah kolom siap, sampel yang telah dipreadsorpsi dimasukkan pada bagian atas fase penyerap. Hasil pemisahan

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

dengan kromatografi kolom ditampung dengan vial yang telah diberi nomor. Untuk memperoleh senyawa yang cukup murni selanjutnya dilakukan kromatografi kolom dengan fase diam sephadex LH 20. Kemurnian dilihat dari jumlah noda hasi pengujian KLT.

3.2.2.7. KLT preparatif

Apabila hasil KLT belum menunjukkan satu noda, maka perlu dilakukan pemisahan kembali. KLT preparatif dapat digunakan untuk memisahan senyawa dengan perbedaan Rf yang kecil dan dalam jumlah yang sedikit. Senyawa yang akan diambil dikerok dan dilarutkan dalam pelarut yang sesuai kemudian disaring dan dikeringkan. Setelah dikeringkan sampel tersebut di KLT untuk melihat kemurniannya. Senyawa yang telah murni kemudian dilakukan karakterisasi dengan spektroskopi NMR.

3.2.3. Karakterisasi senyawa kimia

Senyawa yang sudah murni dikarakterisasi dengan alat spektrofotometer NMR. Dalam hal ini karakterisasi ^{1}H NMR dilakukan di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Serpong, Tangerang.

3.2.4. Uji aktivitas antioksidan

Fraksi dari hasil kromatografi vakum cair dilakukan uji aktivitas antioksidannya dengan metoda DPPH hasil modifikasi (Tagashira & Ohtake, 1998), dengan prosedur sebagai berikut : ekstrak dilarutkan dalam metanol dan dibuat dalam berbagai konsentrasi 50µg, 100µg, 150µg, 200µg, 250µg, 300µg, dan 500µg. Larutan DPPH disiapkan dengan melarutkan 0,004 g DPPH ke dalam 100 ml metanol. Kontrol merupakan campuran 1 ml metanol ditambah 5 ml larutan DPPH 0,004% sedangkan larutan sampel terdiri dari 1 ml larutan sampel dalam berbagai konsentrasi ditambah 5 ml DPPH. Kontrol dan sampel diinkubasi selama 30 menit di ruang gelap, kemudian diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-tampak berkas tunggal Shimidzu 1240 pada panjang gelombang 517 nm, menggunakan standar antioksidan sintetik yaitu, butil hidroksil toluen (BHT) dengan 3 kali pengulangan.

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

3.2.5. Analisis data antioksidan

Perhitungan kapasitas antiradikal bebas DPPH diukur dari peredaman warna ungu DPPH, yaitu puncak 517 nm dengan menggunakan rumus aktivitas penghambatan sebagai berikut :

$$\% \text{ Penghambatan} = \frac{[Abs]_0 - [Abs]_s}{[Abs]_0} \times 100\%$$

Keterangan :

$[Abs]_0$ = Absorbansi kontrol

$[Abs]_s$ = Absorbansi sampel

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