BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Alat dan Bahan yang digunakan

3.1.1. *Alat-alat yang digunakan*

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut: seperangkat alat destilasi, kolom kromatografi, seperangkat alat kromatografi vakum cair, lampu Ultraviolet, alat ukur titik leleh Fisher Jhon melting point, *chamber*, pipa kapiler, spektrofotometer IR merk Shimadzu tipe IR Prestige-21, spektrofotometer UV-Visible merk Hitachi U-2001, spektrofotometer NMR merk JOEL tipe ECA 500 dengan frekwensi 500 MHz untuk proton dan 125 MHz untuk karbon dan peralatan gelas yang umum digunakan di laboratorium kimia organik.

3.1.2. Bahan-bahan yang digunakan

Bahan yang digunakan ekstrak kental n-heksan buah *Tabernaemontana sphaerocarpa* Bl, pelarut n-heksan, diklorometan, metanol, serium sulfat, silika gel 70-230 mesh (Merck), silika gel 60 (Merck), Plat KLT GF_{254}, aluminium foil, DMSO, aquades, benur udang, pelarut untuk analisis NMR adalah CD_3OD, dan air laut.

3.2. Prosedur penelitian

3.2.1. Penanganan sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian adalah dari buah tumbuhan *Tabernaemontana sphaerocarpa* Bl yang diperoleh dari Kuantan Singingi Provinsi Riau. Ekstrak n- heksan yang diperoleh dari penelitian terdahulu yang dilakukan oleh peneliti sebelummya dari buah tumbuhan *Tabernaemontana sphaerocarpa* Bl dipisahkan dan dimurnikan dengan teknik kromatografi. Setiap fraksi yang diperoleh dilakukan uji toksisitas terhadap benur udang.

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

3.3. Pemisahan dan pemurnian

3.3.1. Pemisahan dengan VLC

Sebanyak 5 gram ekstrak total heksan dipisahkan dengan menggunakan kromatografi vakum cair. Pemisahan ini bertujuan untuk mempartisi ekstrak total heksan sehingga diperoleh 11 fraksi. Ekstrak total heksan yang akan difraksinasi, terlebih dahulu dipreadsorbsi dengan silika gel dan dimasukkan ke dalam kolom. Selanjutnya dielusi secara bergradien menggunakan pelarut n-heksan, diklorometan, dan metanol. Hasil pemisahan ditampung dalam erlemeyer yang telah diberi nomor dan selanjutnya dilakukan uji KLT untuk mengetahui jumlah komponen dari kesebelas fraksi, fraksi 7 dan fraksi 8 digabung karena mempunyai pola noda sama sehingga didapatkan 10 fraksi, hasil gabungan dilakukan uji KLT dan tidak dilakukan pemisahan lebih lanjut . Kemudian fraksi 2 dan fraksi 3 ini dipisahkan dengan kromatografi kolom.

3.3.2. Pemisahan dengan kromatografi kolom

Fraksi 2 dan fraksi 3 hasil kromatografi vakum cair selanjutnya dipisahkan dengan menggunakan kromatografi kolom. Sebanyak 0.963 gram (F_2) dan 0.9 gram (F_3) yang dibutuhkan untuk pemisahan ini. Silika gel yang dibutuhkan untuk pembuatan kolom adalah sebanyak 19.26 gram (F_2) dan 18 gram (F_3). Kolom dapat dibuat dengan membuat bubur silika gel yang berfungsi sebagai zat penyerap, dengan cara merendamnya menggunakan heksan dan diaduk rata. Kemudian dituangkan ke dalam kolom secara perlahan-lahan. Silika gel dalam kolom dibuat padat dan permukaannya jangan sampai kering. Pengelusian kolom dilakukan dengan berbagai eluen yang memiliki kepolaran meningkat, mulai dari n-heksan 100%, perbandingan n-heksan dengan diklorometan sampai metanol 100%. Sampel dipreabsorpsi terlebih dahulu sebelum dimasukkan ke dalam kolom, kemudian dielusi dengan pelarut hingga terbentuk pita-pita. Hasil fraksinasi yang keluar ditampung dalam vial yang telah diberi nomor.

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

33.3. Pemisahan dengan KLT preparatif

Fraksi yang mempunyai pola dua noda yaitu fraksi 10, fraksi 11dan 13 dari hasil kromatografi kolom F_2 dilakukan KLT preparatif dengan ketebalan plat 0.5 mm, sebelumnya plat KLT preparatif dibuat dengan cara: kaca dibersihkan dengan air dan sabun lalu keringkan didalam oven, setelah kering kaca dicuci dengan aseton kemudian keringkan kembali, lalu dibuat bubur silika gel dengan perbandingan silika gel : air yaitu 1:2 (55 g silika: 110 ml). Segera ratakan bubur silika gel diatas kaca yang telah tersedia dengan menggunakan alat pembuat KLT setelah itu keringkan plat menggunakan oven pada suhu 100 °C selama kurang lebih satu jam. Plat digaris pada batas bawah dan batas atas dengan ukuran dua cm kemudian sampel dilarut dengan diklorometan lalu dipipet dan totolkan sampai habis, dielusi sampai batas atas dengan menggunakan chamber yang telah dijenuhkan dengan n-heksan: diklorometan (7 : 3), didalam *chamber* tadi diletakkan kertas saring dan tutup agar tekanannya homogen. Setelah sampai batas atas plat dikeluarkan dan dikeringkan kemudian dilihat dilampu UV dan jika tidak nampak dikasih penampak noda sedikit dan dipanaskan hingga nampak nodanya lalu digaris secara vertikal kemudian dikeruk serta dilarutkan dengan pelarutnya secara berulang-ulang, setelah itu disaring dan diuapkan pada suhu kamar lalu dilakukan pengecekan pemisahan dengan plat KLT.

3.3.4. Rekristalisasi

Hasil yang didapat berupa kristal dilakukan uji KLT memberikan satu noda yang hampir bulat maka dilakukan rekristalisasi (kristal larut dalam keadaan panas dan tidak larut dalam keadaan dingin).

Kristal yang telah larut dalam keadaan panas langsung disaring (panas-panas) kemudian didinginkan sampai terbentuk kristal yang sempurna. Kristal yang terbentuk disaring dengan corong buchener dengan bantuan vakum. Hasil rekristalisasi ini diuji kemurniannya dengan KLT dengan berbagai eluen dan uji titik leleh, senyawa murni yang diperoleh diberi nama TsH. Senyawa TsH ini dapat dilihat pada vial 37 (Lampiran 7) dan B (Lampiran 8). Hasil pemisahan dari KLT preparatif tidak terpisah sehingga tidak dilakukan rekristalisasi meskipun ada yang satu noda tetapi kristalnya sedikit.

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

3.3.5. Penentuan titik leleh

Penentuan titik leleh senyawa TsH dilakukan dengan alat pengukuran titik leleh Fisher John. Mula-mula alat dinyalakan dengan menurun kan tombol sebelah kiri kearah bawah kemudian senyawa yang akan diukur titik leburnya diletakkan diantara dua plat kaca dan ditaruh diatas plat logam alat. Temperatur dicatat dengan cara pembacaan skala termometer yang terpasang pada alat, ketika kristal TsH mulai melebur pa da suhu 180 °C sampai habis melebur semua pada 182 °C. Harga range titik lebur $\leq$ 2 °C menunjukkan bahwa kristal TsH sudah murni.

3.4. Uji Toksisitas

3.4.1. Pembiakan benur udang

Pembiakan benur udang dapat dilakukan dengan mengisikan air laut kedalam wadah persegi yang telah dibagi menjadi dua sisi. Masukkan benur udang kedalam wadah pada sisi yang ditutup, sedangkan sisi yang lain dibiarkan terbuka dan diberi cahaya. Biarkan selama ± 48 jam agar udang menetas dan dewasa. Benur udang yang telah menetas akan menuju kesisi yang terkena cahaya. Benur udang yang telah menetas ini digunakan untuk uji toksisitas.

3.4.2. Persiapan sampel

Timbang ekstrak total n-heksan dan hasil VLC untuk F_1, F_2, F_3, F_4., F_5, F_6, F_7, F_8, F_9, F_{10}, F_{11} ± 20 mg dan dilarutkan dengan metanol sebanyak 2 ml maka didapatkan larutan induk ekstrak uji dengan konsentrasi 10.000 µg/ml, kemudian larutan induk dengan konsentrasi 10.000 µg/ml tersebut dipipet sebanyak 0,5 ml kedalam vial uji hingga nantinya didapatkan konsentrasi 1.000 µg/ml setelah penambahan air laut sebanyak 5 ml, pembuatan konsentrasi 100 µg/ml dengan cara pengenceran larutan induk 10.000 µg/ml sebanyak 0.5 ml ditambahkan metanol hingga 2 ml maka diperoleh konsentrasi ekstrak uji 1000 µg/ml kemudian dipipet 0.5 ml larutan ekstrak uji tersebut kedalam vial uji hingga nantinya didapat konsentrasi 100 µg/ml ssetelah penambahan air laut hingga 5 ml. Dan untuk konsentrasi 10 µg/ml dibuat dari larutan uji 100 µg/ml dengan cara yang sama.

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

Masing-masing vial uji dibiarkan metanol menguap. Larutkan kembali senyawa uji dengan 50 µl DMSO, selanjutnya tambahkan air laut hampir mencapai batas kalibrasi.

3.4.3. Pengerjaan terhadap sampel

Masukkan larva udang sebanyak 10 ekor kedalam masing-masing vial yang telah berisi air laut. Tambahkan lagi air laut beberapa tetes sampai batas kalibrasi, kemudian udang diamati kematian larva udang setelah 24 jam. Data yang diperoleh dihitung LC_{50} dengan metoda kurva.

3.5. Karakterrisasi

Sebanyak 13 miligram kristal TsH dikarakterisasi dengan menggunakan spektroskopi ultraviolet (UV), spektroskopi inframerah (IR), dan spektroskopi resonansi magnetik inti (NMR 1D) di Laboratorium Pusat Penelitian Kimia LIPI-Serpong.

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