

III. METODELOGI PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan April 2012 - Januari 2013, bertempat di Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Lampung. Penghalusan kulit batang tumbuhan *A. rigida* di Politeknik Negri Lampung. Analisis spektroskopi yang digunakan adalah spektroskopi inframerah (IR), dan spektroskopi Ultraungu-tampak (UV-Vis), dilakukan di Laboratorium Biomassa.

B. Alat dan Bahan

1. Alat-alat yang digunakan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi alat-alat gelas, penguap putar vakum, satu set alat kromatografi cair vakum (KCV), satu set alat kromatografi kolom (KK), pengukur titik leleh, lampu UV, pipet kapiler, spektrofotometer FT-IR merk Scimitar 2000, spektrofotometer ultraungu-tampak (UV-VIS) merk Cary 50.

2. Bahan-bahan yang digunakan

Bahan yang digunakan adalah kulit kayu *A. rigida* yang telah dikeringkan dan dihaluskan, diperoleh dari Desa Keputran Kecamatan Sukoharjo Kabupaten Pringsewu Provinsi Lampung. Pelarut yang digunakan untuk ekstraksi dan kromatografi berkualitas teknis yang telah didestilasi sedangkan untuk analisis spektrofotometer berkualitas pro-analisis (p.a). Bahan kimia yang dipakai meliputi etil asetat (EtOAc), metanol (MeOH), *n*-heksana ($n\text{-C}_6\text{H}_{14}$), aseton ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_2$), akuades (H_2O), serium sulfat (CeSO_4) 1,5% dalam asam sulfat (H_2SO_4) 2N, silika gel Merck G 60 untuk impregnasi, silika gel Merck 60 (35-70 Mesh) dan pati untuk KCV dan KK, untuk KLT digunakan plat KLT silika gel Merck kiesegal 60 F₂₅₄ 0,25 mm. Pereaksi geser untuk analisis spektrofotometer ultraungu-tampak adalah aluminium klorida, asam klorida pekat, natrium asetat, dan natrium hidroksida.

C. Prosedur Penelitian

1. Pengumpulan dan Persiapan Sampel

Sampel berupa kulit batang tumbuhan *A. rigida* yang dipisahkan antara kulit batang dan kayunya. Kulit batang lalu dibersihkan dan dipotong kecil-kecil. Sampel kulit batang yang telah dipotong kemudian dikeringkan. Kulit batang yang telah kering kemudian dihaluskan hingga berbentuk serbuk halus.

2. Ekstraksi dengan Metanol

Sebanyak 2,7 kg kulit kayu *A.rigida* yang telah dihaluskan, dimaserasi dengan metanol (MeOH) selama 24 jam dengan sekali maserasi sebanyak 500 gr, maserasi dilakukan sebanyak tiga kali. Ekstrak metanol yang diperoleh disaring kemudian dipekatkan dengan menggunakan penguap putar vakum pada suhu 35-50°C dengan laju putaran 120-150 rpm.

3. Kromatografi Cair Vakum (KCV)

Ekstrak kasar kemudian difraksinasi dengan KCV. Terlebih dahulu fasa diam silika sebanyak 10 kali berat sampel dimasukkan ke dalam kolom. Kemudian kolom dikemas kering dalam keadaan vakum menggunakan alat vakum. Eluen yang kepolarannya rendah, dimasukkan ke permukaan silika gel terlebih dahulu kemudian divakum kembali. Kolom dihisap sampai kering dengan alat vakum dan siap digunakan.

Ekstrak kasar yang telah dilarutkan dalam aseton dan diimpregnasikan kepada silika gel, kemudian dimasukkan pada bagian atas kolom yang telah berisi fasa diam dan kemudian dihisap secara perlahan-lahan ke dalam kemasan dengan cara memvakumkannya. Setelah itu kolom dielusi dengan etil asetat : *n*-heksan (0% : 100%) sampai dengan etil asetat : *n*-heksan (100% : 0%) Kolom dihisap sampai kering pada setiap penambahan eluen (tiap kali elusi dilakukan). Kemudian fraksi-fraksi yang terbentuk dikumpulkan berdasarkan pola fraksinasinya. Fraksinasi sampel dengan teknik KCV dilakukan berulang kali dengan perlakuan yang sama seperti tahapan KCV awal.

4. Kromatografi *Flash*

Pada kromatografi *flash* fasa diam silica gel G 60 F₂₅₄ (Merck) dilarutkan dalam pelarut yang akan digunakan dalam proses pengelusian. Campuran tersebut diaduk hingga diperoleh suatu *slurry*, lalu dimasukkan kedalam kolom dan diusahakan agar kolom tidak kehabisan pelarut. Kemudian atur fasa diam hingga rapat (tidak berongga) dan rata. Selanjutnya masukkan sampel yang telah dijerapkan pada silica gel kedalam kolom yang telah berisi fasa diam. Pada saat sampel dimasukkan, usahakan agar kolom tidak kehabisan pelarut karna akan mengganggu fasa diam yang telah dikemas rapat. Setelah fasa diam dan sampel masuk kedalam kolom, berikan tekanan dari atas kolom dengan alat pompa udara.

5. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Sebelum difraksinasi, terlebih dahulu dilakukan uji KLT untuk melihat pola pemisahan komponen-komponen senyawa yang terdapat dalam ekstrak kasar. Uji KLT juga dilakukan terhadap fraksi-fraksi yang akan difraksinasi dan juga fraksi-fraksi yang didapat setelah perlakuan fraksinasi. Uji KLT dilakukan menggunakan sistem campuran eluen menggunakan pelarut *n*-heksana, etilasetat, diklorometana, dan metanol. Hasil kromatogram tersebut kemudian disemprot menggunakan larutan serum sulfat untuk menampakkan bercak/noda dari komponen senyawa tersebut. Ketika diperoleh fraksi yang lebih sedikit bercak/noda dilihat dibawah lampu UV setelah dilakukan elusi terhadap plat KLT. Setiap fraksi yang menghasilkan pola pemisahan dengan R_f (*Retention*

factor) yang sama pada kromatogram, digabung dan dipekatkan sehingga diperoleh beberapa fraksi gabungan yang akan difraksinasi lebih lanjut.

6. Kromatografi Kolom (KK)

Setelah dihasilkan fraksi-fraksi dengan jumlah yang lebih sedikit, tahapan fraksinasi selanjutnya dilakukan menggunakan teknik kromatografi kolom. Adsorben pati dan silika gel Merck (35-70 Mesh) masing-masing dilarutkan dalam pelarut yang akan digunakan dalam proses pengelusan. *Slurry* dari pati dimasukkan terlebih dahulu ke dalam kolom, kemudian *Slurry* dari silika gel, atur fasa diam hingga rapat (tidak berongga) dan rata. Selanjutnya masukkan sampel yang telah dijerapkan pada silika gel ke dalam kolom yang telah berisi fasa diam. Pada saat sampel dimasukkan, usahakan agar kolom tidak kering/kehabisan pelarut karena akan mengganggu fasa diam yang telah dikemas rapat, sehingga proses elusi tidak akan terganggu.

7. Analisis Kemurnian

Uji kemurnian dilakukan dengan metode KLT dan uji titik leleh. Uji kemurnian secara KLT menggunakan beberapa campuran eluen. Kemurnian suatu senyawa ditunjukkan dengan timbulnya satu noda dengan berbagai campuran eluen yang digunakan, kemudian disemprot menggunakan larutan serum sulfat untuk menampakkan bercak/noda dari komponen senyawa tersebut.

Untuk uji titik leleh, sebelum dilakukan pengukuran, alat pengukur titik leleh tersebut dibersihkan terlebih dahulu dari pengotor yang ada. karena adanya pengotor akan menaikkan atau menurunkan temperatur titik leleh kristal. Untuk

kristal yang berukuran besar, kristal terlebih dahulu digerus hingga berbentuk serbuk. Kemudian kristal yang akan ditentukan titik lelehnya diletakkan pada lempeng kaca, diambil sedikit dengan menggunakan pipet kapiler, alat dihidupkan dan titik leleh diamati dengan bantuan kaca pembesar. Suhu pada saat kristal pertama kali meleleh, itulah titik leleh dari senyawa tersebut.

8. Modifikasi Gugus Fungsi dengan Pereaksi AlCl_3

Sampel kristal hasil isolasi yang telah murni, diambil sebanyak 15 mg kemudian diencerkan dengan pelarut polar berupa metanol sebanyak 1 mL, kemudian pada perlakuan yang sama diambil sebanyak 20 mg pereaksi AlCl_3 lalu diencerkan menggunakan pelarut polar berupa metanol sebanyak 10 mL. Kemudian campurkan kedua larutan yang telah dibuat, lalu diaduk dibiarkan selama 5 menit sampai terjadi perubahan warna, lalu dilakukan uji KLT untuk membandingkannya dengan kristal murni artonin-E. Dalam hal ini uji positif terbentuknya kompleks AlCl_3 -flavonoid ditunjukkan dengan adanya bercak berwarna kuning pada sinar tampak (Markham, 1988). Kemudian campuran dari kedua larutan tersebut diuapkan dan diambil ekstrak keringnya, yang selanjutnya diekstrak dengan kloroform untuk mengambil senyawa artonin-E yang berlebih pada campuran senyawa tersebut. Setelah itu ditambahkan akuades sebanyak 1 mL, lalu ditambahkan metanol tetes demi tetes, gunanya untuk memisahkan senyawa kompleks artonin-E- AlCl_3 yang berupa endapan dengan AlCl_3 yang berlebih.

9. Spektrofotometri Inframerah (IR)

Sampel kristal hasil isolasi yang telah murni dianalisis menggunakan spektrofotometer inframerah. Kristal yang telah murni dibebaskan dari air kemudian digerus bersama-sama dengan halida anorganik, KBr. Gerusan kristal murni dengan KBr dibentuk menjadi lempeng tipis atau pelet dengan bantuan alat penekan berkekuatan 8-10 ton cm^2 . Kemudian pelet tersebut diukur puncak serapannya (Sudjadi, 1983).

10. Spektrofotometri Ultraungu-tampak (UV-VIS)

Sampel berupa kristal murni sebanyak 0,001 g dilarutkan dalam 10 mL metanol. Larutan ini digunakan sebagai persediaan untuk beberapa kali pengukuran. Pertama, sampel diukur serapan maksimumnya dalam metanol. Selanjutnya larutan persediaan dibagi menjadi beberapa bagian. Kemudian masing-masing larutan persediaan ditambah dengan pereaksi-pereaksi geser seperti natrium hidroksida (NaOH) 2 M yang dibuat dengan cara melarutkan 0,8 gr NaOH dalam 10 mL akuades, aluminium klorida (AlCl_3) 5% yang dibuat dengan cara melarutkan 0,25 gram AlCl_3 dalam 5 mL MeOH, asam klorida HCl (AlCl_3/HCl) yang dibuat dengan cara melarutkan 5 mL HCl pekat dalam 10 mL Akuades, natrium asetat (NaOAc), dan H_3BO_3^- . Kemudian masing-masing larutan diukur serapan maksimumnya.