

III. METODELOGI PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan pada bulan Mei-Desember 2013, bertempat di Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Lampung. Penghalusan kulit batang tumbuhan *A. rigida* di Politeknik Negeri Lampung. Analisis spektroskopi dilakukan di Laboratorium Biomassa Universitas Lampung dan Laboratorium NMR LIPI.

B. Alat dan Bahan

1. Alat-alat yang digunakan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi alat-alat gelas, satu set alat kromatografi cair vakum (KCV), kromatotron, satu set alat kromatografi kolom (KK), pengukur titik leleh, lampu UV, pipet kapiler, *Rotary Evaporator*, spektrofotometer FT-IR Scimitar 2000, spektrofotometr NMR, dan spektroskopi massa (MS) LC MS-ESI.

2. Bahan-bahan yang digunakan

Bahan yang digunakan adalah kulit batang tumbuhan kenangan (*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 ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$), akuades (H_2O), serium sulfat (CeSO_4) 1,5% dalam asam sulfat (H_2SO_4) 2N, benzena (C_6H_6), kloroform (CH_3Cl), diklorometana (CH_2Cl_2), silika gel Merck G 60 untuk impregnasi, silika gel Merck 60 (35-70 Mesh) untuk KCV dan KK, untuk KLT digunakan plat KLT silika gel Merck kiesegal 60 F₂₅₄ 0,25 mm, silika gel 60 PF₂₅₄ untuk plat kromatotron.

C. Prosedur Penelitian

1. Pengumpulan dan Persiapan Sampel

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

2. Ekstraksi dengan Metanol

Sebanyak 3,3 kg kulit kayu *A. rigida* yang telah digiling kemudian dimaserasi dengan metanol (MeOH) selama 24 jam dengan sekali maserasi sebanyak 500 gr, maserasi dilakukan sebanyak tiga kali. Ekstrak metanol yang diperoleh lalu disaring kemudian dipisahkan dengan menggunakan *Rotary Evaporator* pada suhu 35°C -40°C dengan laju putaran 120-150 rpm.

3. Kromatografi Cair Vakum (KCV)

Ekstrak kasar kemudian difraksinasi dengan KCV. Silika sebanyak 10 kali lipat dari berat sampel dimasukkan ke dalam kolom vakum. Kemudian kolom dibuat kering dalam keadaan vakum menggunakan alat vakum. Eluen yang kepolarannya lebih 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 dengan silika gel, kemudian dimasukkan pada bagian atas kolom yang telah berisi fasa diam dan kemudian dihisap secara perlahan-lahan dengan cara memvakumkannya. Setelah itu kolom dielusi dengan etil asetat : *n*-heksana (0% : 100%) sampai dengan etil asetat : *n*-heksana (100% : 0%) Kolom dihisap sampai kering pada setiap penambahan eluen (tiap kali elusi dilakukan). Kemudian fraksi-fraksi yang terbentuk dikumpulkan berdasarkan pola fraksinasinya.

4. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Sebelum difraksinasi, terlebih dahulu dilakukan uji KLT untuk melihat pola pemisahan komponen-komponen senyawa yang terdapat dalam ekstrak kasar hasil KCV. Uji KLT 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, diklorometana, benzena, kloroform, dan metanol. Sampel yang akan difraksinasi terlebih dahulu diencerkan menggunakan diklorometana, kemudian sampel ditotolkan menggunakan pipet kapiler ke dalam plat silika. Langkah selanjutnya

adalah mengelusi plat tersebut kedalam eluen diklorometana/*n*-heksana 10 % dan kemudian dilihat di bawah lampu UV. Hasil kromatogram tersebut kemudian disemprot menggunakan larutan serium sulfat untuk menampakkan bercak/noda dari komponen senyawa tersebut. Ketika diperoleh fraksi yang lebih sedikit bercak/noda 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.

5. Kromatotron

Setelah sampel diidentifikasi dengan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT), kemudian difraksinasi menggunakan kromatotron dengan menggunakan plat silika 2 mm dan menggunakan eluen diklorometana/*n*-heksana. Sebelum digunakan plat silika diaktifkan terlebih dahulu dengan pemanasan lampu pijar selama 20 jam. Plat silika yang sudah aktif kemudian dipasang pada kromatotron dan dialirkan pelarut *n*-heksana sampai menetes, kemudian sampel ditetaskan ke dalam plat silika selagi basah. Setelah sampel ditetaskan pada plat silika, kemudian sampel dibiarkan mengering ± 10 menit. Setelah sampel kering, kemudian dialirkan 100 mL *n*-heksana dilanjutkan dengan mengalirkan eluen diklorometana/*n*-heksana 5%, 10%, 20%, dan 50% masing-masing sebanyak 100 mL. Hasil fraksinasi kemudian ditampung dalam botol – botol kecil berukuran ± 10 mL. Setelah selesai fraksinasi, plat silika kemudian dicuci dengan mengalirkan aseton sebanyak 100 mL dilanjutkan dengan mengalirkan air-metanol 5% sebanyak 100 mL (Bruno, 2012).

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 pengelusian. *Slurry* dari silika gel dimasukkan ke dalam kolom terlebih dahulu, atur fasa diam hingga rapat (tidak berongga) dan rata. Selanjutnya masukkan sampel yang telah diimpregnasi 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 (Gritter, 1992).

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 serium 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. karena pengotor akan menaikkan atau menurunkan temperatur titik leleh kristal yang diperoleh. 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. 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. Gerasan 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). Informasi Spektroskopi Inframerah menunjukkan tipe-tipe dari adanya gugus fungsi dalam suatu molekul (Pavia, 1979).

9. Spektrofotometri Resonansi Magnetik Inti (RMI)

Untuk analisis RMI sampel tidak boleh terlalu kental. Biasanya digunakan konsentrasi larutan 2-15%. Pelarut yang baik untuk RMI sebaiknya tidak mengandung proton seperti CS_2 , CCl_4 . Pelarut – pelarut berdeuterium juga sering digunakan seperti CDCl_3 atau C_6D_6 (Supratman, 2010).

Spektroskopi resonansi magnet inti dapat dilakukan pada inti yang memiliki momen magnet, seperti ^1H dan ^{13}C . Sampel yang mengandung ^1H atau ^{13}C (bahkan semua senyawa organik) ditempatkan dalam medan magnet, akan timbul interaksi antara medan magnet luar tadi dengan magnet kecil (inti). Karena

adanya interaksi ini, magnet kecil akan terbagi atas dua tingkat energi yang berbeda. Karena inti merupakan materi mikroskopik, maka energi yang berkaitan dengan inti ini terkuantisasi, artinya tidak kontinyu (Supratman, 2010).

Pengukuran menggunakan resonansi magnet inti menghasilkan spektrum ^1H – RMI yang memberikan informasi mengenai jumlah setiap jenis hidrogen yang terdapat dalam suatu molekul dan sifat lingkungan dari setiap jenis atom hidrogen tersebut. Spektrum ^{13}C - RMI memberikan informasi tentang jumlah karbon yang terdapat dalam molekul dengan semua pergeseran kimianya sehingga dapat diketahui sifat lingkungannya (Hart, 2003).

10. Spektroskopi Massa (MS)

Sampel diuapkan di bawah vakum dan diionkan menggunakan berkas elektron. Ion sampel dipercepat menggunakan medan listrik memasuki tabung penganalisis dan dilalukan dalam medan magnet. Kekuatan medan magnet yang diberikan, hanya ion-ion positif dan radikal positif yang akan difokuskan ke detektor, sedang ion-ion yang lain (radikal netral) akan dibelokkan ke dinding tabung. Ion dengan m/z lebih besar akan mencapai detektor lebih dulu diikuti m/z yang lebih kecil. Arus listrik yang diterima detektor akan diperkuat dan spektrum massa dari sampel akan direkam (Khopkar, 2002).

Spektrometri massa dapat dipasang (coupling) dengan semua tehnik kromatografi yaitu kromatografi cair, kromatografi gas dan kromatografi lapis tipis (Onggo., dkk, 1998). Metode ionisasi pada spektrometri massa dapat melalui beberapa cara

seperti *Electron Impact* (EI), *Electrospray Ionization* (ESI), *Fast Atomic bombardment* (FAB), *Atmospheric Pressure Chemical Ionization* (APCI), *Atmospheric Pressure Photo Ionization* (APPI), *Termospray Ionization* (TSP) (Cappiello, 2007).

Pada penelitian ini alat KCKT-MS yang ada menggunakan spektrometri massa metode elektrospray ionisasi (ESI). *Electrospray Ionization* (ESI) adalah salah satu metode dari spektrometri massa untuk mendapatkan ion molekul. Metode ESI menggunakan penyemprotan sehingga tidak terjadi fragmentasi molekul sampel melainkan yang diperoleh adalah ion molekul dari senyawa sehingga bisa dipakai untuk identifikasi (kualitatif) senyawa analit (Cappiello, 2007).

Spektrometer mampu menganalisis cuplikan yang jumlahnya sangat kecil dan menghasilkan data yang berguna mengenai struktur dan identitas senyawa organik. Jika eluen dari kromatografi cair diarahkan ke spektroskopi massa maka informasi mengenai struktur untuk masing-masing puncak pada kromatogram dapat diperoleh. Langkah-langkah analisis dengan metode tersebut yaitu, cuplikan disuntikkan ke dalam kromatografi cair dan terkromatografi sehingga semua komponennya terpisah. Spektrum massa diukur secara otomatis pada selang waktu tertentu. Kromatogram selanjutnya dihasilkan disertai integrasi semua puncak dan spektrum masing-masing komponen. Spektrum ini dapat memberikan informasi mengenai berat molekul, fragmentasi molekul, rumus molekul, dan kemungkinan struktur molekulnya (Mc Lafferty, 1988).