

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain penelitian eksperimental yang dilakukan di laboratorium. Penelitian ini terdapat beberapa tahapan. Tahap pertama dimulai dari sintesis GVT-0, kemudian tahap selanjutnya pemurnian hasil sintesis GVT-0 dan tahap yang terakhir adalah analisis perbandingan sebelum pemurnian dan sesudah pemurnian. Sintesis GVT-0 dilakukan untuk mendapatkan ruahan GVT-0. Sintesis GVT-0 ini menggunakan pemanasan *microwave* karena dapat mempercepat proses pembentukan GVT-0. Selain itu penggunaan *microwave* lebih mengefisienkan energi dan ramah lingkungan jika dibandingkan dengan metode sintesis konvensional (Harimurti, 2019). Kemudian ruahan hasil sintesis GVT-0 memasuki tahap kedua yaitu pemurnian. Ruahan yang terbentuk dilakukan maserasi panas untuk lebih memurnikan hasil sintesis. Setelah melalui tahap maserasi panas, rendemen dibagi menjadi dua. Satu rendemen diuji langsung menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) dan satu lagi dilakukan proses pemurnian menggunakan kromatotron. Kedua hasil pemurnian ini yang akan dibandingkan antara proses pemurnian sederhana menggunakan maserasi panas dengan proses pemurnian dengan kromatotron. Hasil yang didapat dari pemurnian menggunakan kromatotron akan dilakukan beberapa pengujian untuk mengetahui kemurniannya. Pengujian yang dilakukan yaitu titik lebur dan KLT dengan jenis fase gerak yang berbeda.

B. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan dari September 2018 sampai Juli 2019 di Laboratorium Penelitian Farmasi dan Laboratorium Teknologi Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

C. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas : Perbandingan pelarut yang digunakan yaitu heksana dan kloroform.
2. Variabel tergantung : Waktu pemisahan dan kemurnian GVT-0.
3. Variabel terkontrol : Ruahan yang digunakan.

D. Definisi Operasional

1. Perbandingan pelarut adalah perbandingan dari satu, dua, atau lebih pelarut yang digunakan sebagai fase gerak pada saat pemurnian menggunakan kromatotron yaitu heksana dan kloroform.
2. Waktu pemisahan adalah waktu yang dibutuhkan untuk sejumlah ruahan selesai terelusidasi pada proses kromatotron.
3. Kemurnian GVT-0 adalah hasil yang dapat dilihat dari hasil uji kemurnian menggunakan KLT 4 eluen berbeda dan titik lebur.
4. Ruahan yang digunakan adalah penggunaan ruahan hasil dari proses sintesis menggunakan *microwave* yang dilanjutkan dengan proses maserasi panas sebanyak dua kali menggunakan aquades panas.

E. Instrumen Penelitian

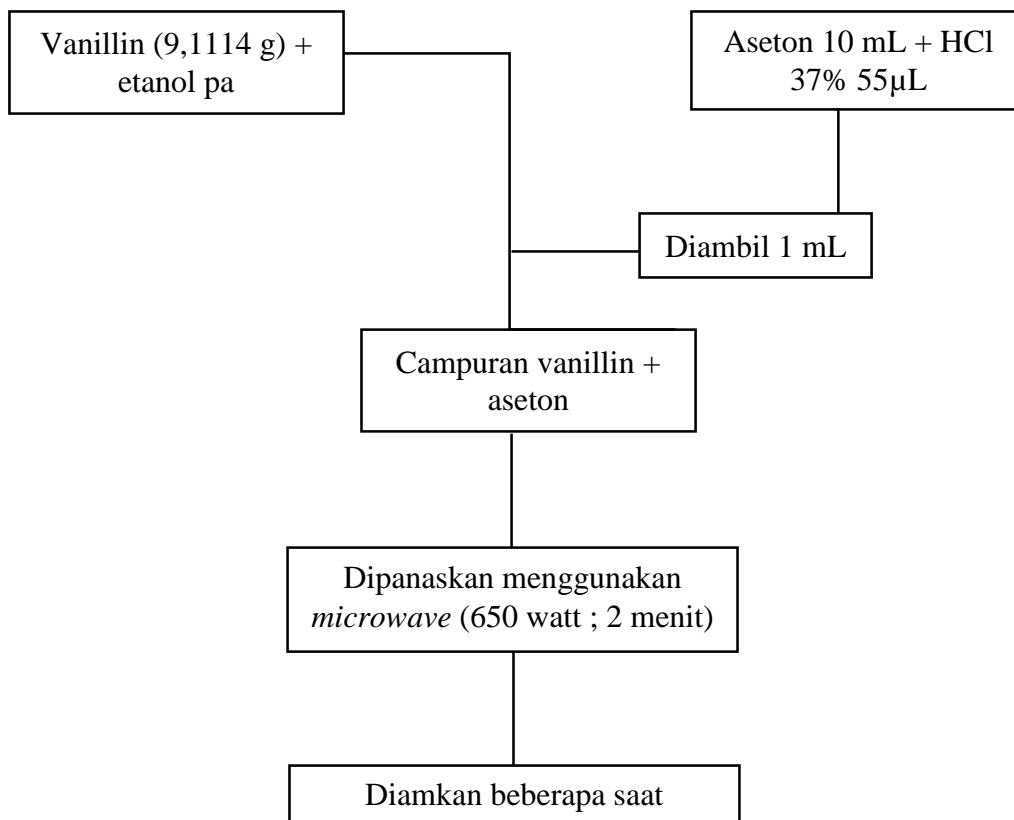
1. Alat-alat yang digunakan berupa alat-alat gelas yang lazim digunakan, yaitu gelas beaker (Pyrex ®), sendok *stainless* pengaduk, tabung reaksi (Pyrex ®), erlenmeyer (Pyrex ®), corong (Iwaki ®), corong pisah (Iwaki ®), cawan porselen, kertas saring (*Whatman* 40), timbangan digital (Mettler toledo AL 204), pipet volume 1 ml dan 5 ml (Iwaki ®), gelas ukur (Iwaki ®), propipet, mikropipet, plat KLT GF₂₅₄, bejana KLT (Camag ®), kapiler untuk menotolkan sampel, Microwave (Elektrolux ®), Chromatotron 7924T.
2. Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu vanilin teknis (Brataco ®), aseton pro analisis (Merck ®), HCl pekat 37% (Bratachem ®), etanol pro analisis (Merck ®), kloroform pro analisis (Merck ®), heksana pro analisis (Merck ®), Silika gel GF 254 for TLC preparative (Merck ®), alkohol 70%, etil asetat pro analisis (Merck ®), dan aquadest (Brataco ®).

F. Cara Kerja

1. Sintesis GVT-0

Sintesis dilakukan dengan metode yang sudah pernah dilakukan oleh peneliti sebelumnya yaitu metode SAMTISAR (Samboedi-Timmerman-Sardjiman) yang telah dimodifikasi. Pada metode ini digunakan vanilin dan aseton sebagai *starting material* utama yang digunakan untuk menyintesis GVT-0. Selain dua *starting material* tersebut digunakan juga asam klorida untuk menambahkan suasana asam pada proses sintesis. GVT-0 disintesis

dengan perbandingan *starting material* vanilin dan aseton 4,4 : 1. Hal ini yang sudah dilakukan oleh penelitian sebelumnya, ketika digunakan *microwave* ruahan maksimal yang dihasilkan menggunakan perbandingan *starting material* vanilin dan aseton 4,4 : 1. Melanjutkan hal tersebut untuk katalis optimal yang dapat digunakan yaitu 55 μ L. Kemudian untuk waktu pemanasan dan daya yang digunakan berturut-turut yaitu 2 menit dan 650 watt. Hal pertama yang dilakukan adalah menyiapkan larutan vanillin dengan mencampurkan 9,1114 gram vanillin dengan etanol hingga larut. Kemudian disiapkan juga larutan aseton yang telah dicampur dengan asam klorida. Caranya dengan mencampurkan 10 ml aseton dengan 55 μ L asam klorida. Setelah itu larutan vanillin dicampur dengan 1 ml larutan aseton yang sudah dipreparasikan tadi. Kemudian larutan vanillin dengan aseton-HCl dimasukkan ke dalam cawan porselen. Campuran tersebut dimasukkan ke dalam *microwave* yang sudah diset pada daya 650 watt dan waktu 2 menit. Hasil yang didapatkan adalah larutan kuning yang menandakan adanya GVT-0. Setelah keluar dari *microwave* matikan *microwave* dan campuran didiamkan beberapa menit hingga tidak terlalu panas.

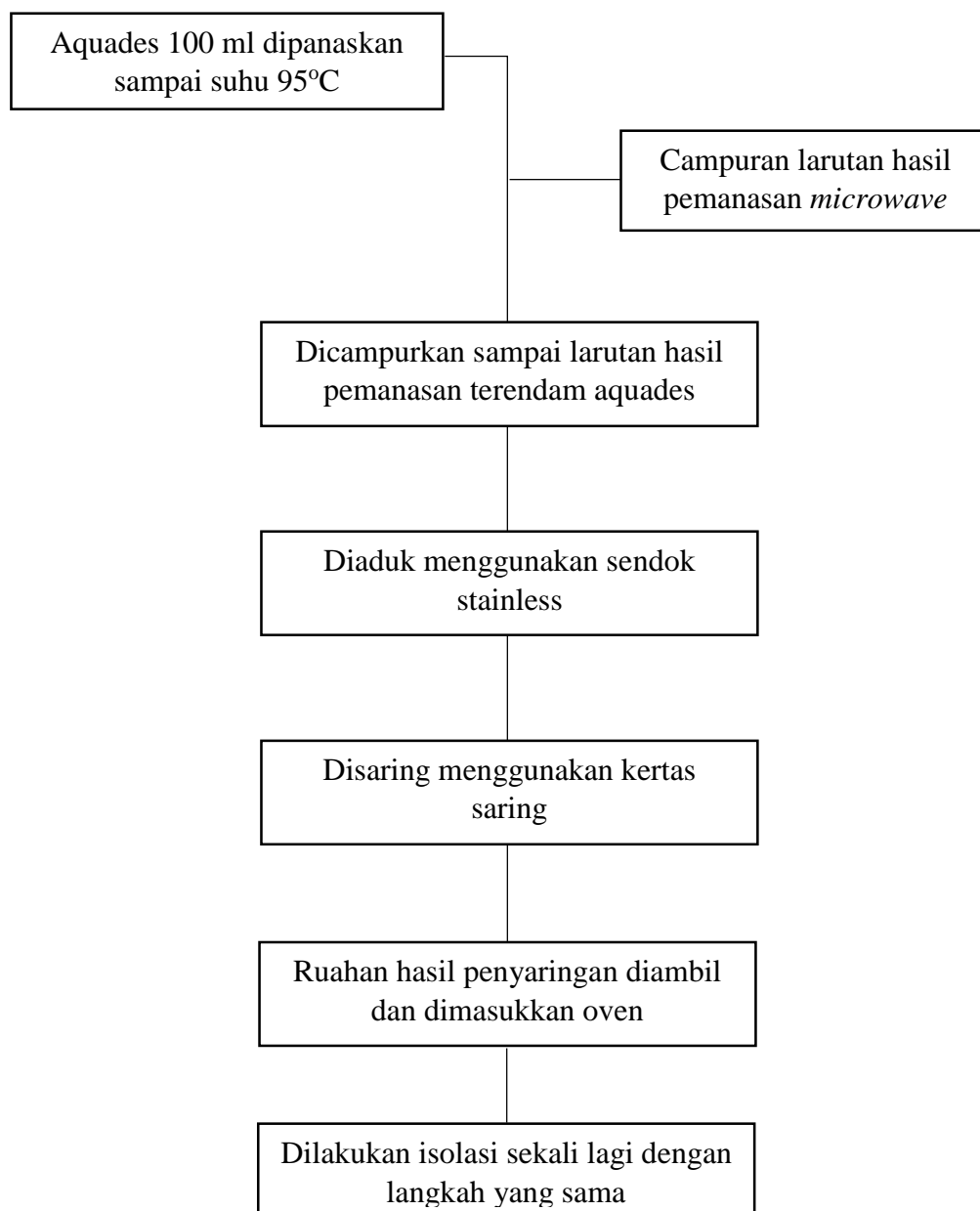


Gambar 5. Bagan cara kerja sintesis GVT-0

2. Isolasi GVT-0

Isolasi GVT-0 dilakukan dengan maserasi panas. Maserasi dilakukan sebanyak dua kali. Kemudian campuran larutan yang sudah dingin hasil sintesis ditambahkan aquades yang sudah dipanaskan pada suhu 95 °C dalam cawan porselen sampai terendam. Penambahan aquades panas untuk mengikat vanillin yang masih ada dalam larutan. Setelah terendam diaduk menggunakan sendok *stainless* dan langsung segera disaring menggunakan kertas saring. Hasil penyaringan tersebut yang disebut ruahan GVT-0 dimasukkan ke oven dengan suhu 60 °C dalam waktu 15-30 menit sampai kering. Proses maserasi panas ini dilakukan dua kali untuk memaksimalkan

pengurangan *starting material* (vanillin) dalam ruahan GVT-0 yang akan dihasilkan.



Gambar 6. Bagan cara kerja isolasi GVT-0

3. Pemurnian menggunakan kromatotron

Ruahan GVT-0 yang sudah diisolasi dilakukan preparasi dengan melarutkan 2,5 gram ruahan GVT-0 yang sudah didapatkan dengan 5 ml kloroform

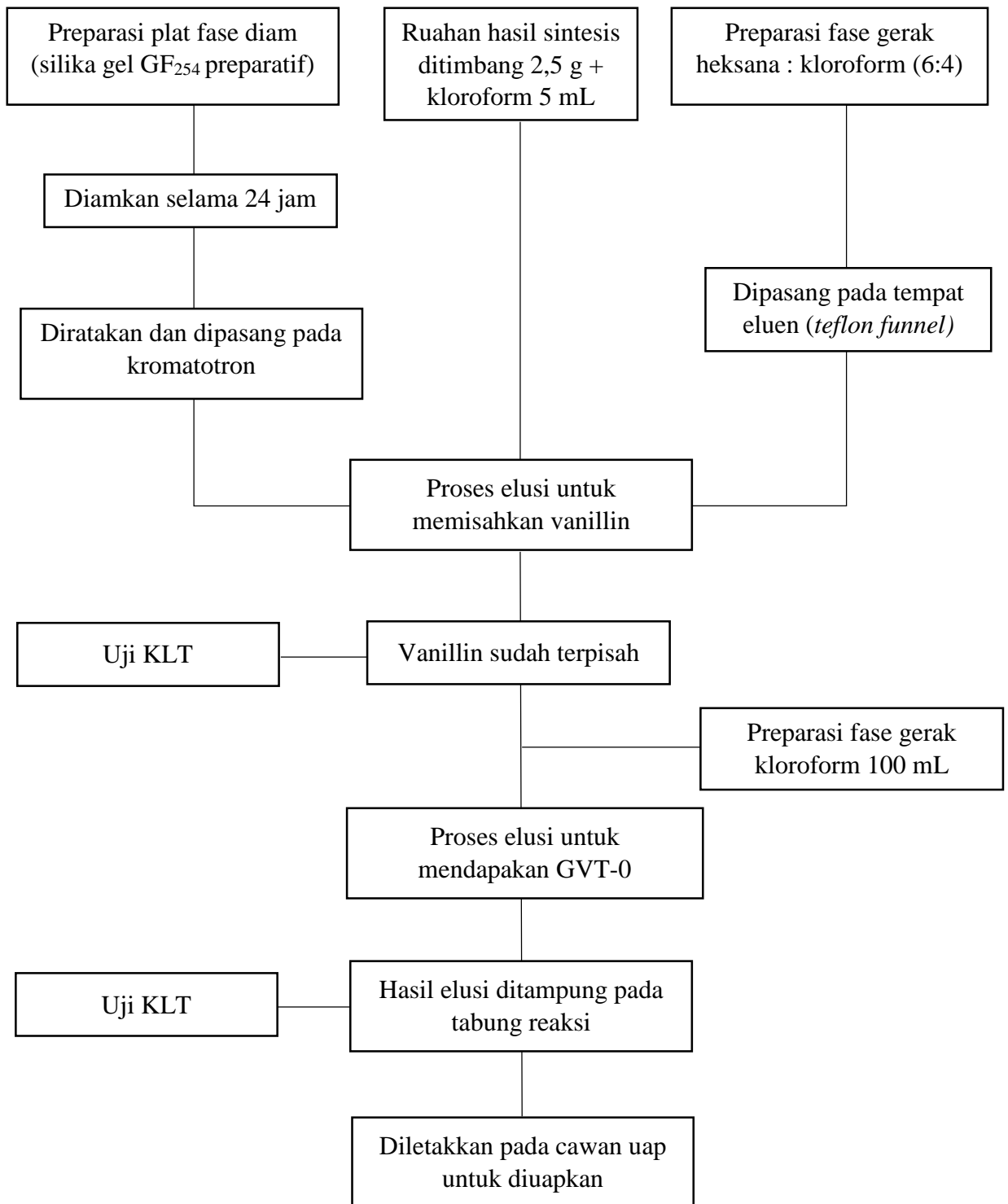
untuk dilakukan pemurnian menggunakan kromatotron. Kromatotron juga memiliki prinsip kerja yang sama dengan kromatografi lainnya yaitu menggunakan fase diam dan fase gerak. Fase diam yang digunakan berupa silika gel GF₂₅₄ preparatif. Fase diam yang digunakan harus dipreparasi terlebih dahulu. Silika serbuk yang ditimbang berdasarkan tebal plat yang akan digunakan. Ukuran tebal plat dan komposisi silika dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Ukuran dan komposisi pembuatan plat kromatotron

Ketebalan lapisan	1 mm	2 mm	4 mm	8 mm
Silika gel	33 g	45 g	75 g	137 g
Air (0-10°C)	82 mL	112 mL	187 mL	343 mL
Ukuran wadah	250-400 mL	300-400 mL	400-600 mL	750-1100 mL

Silika yang sudah ditimbang dilarutkan menggunakan aquades 0-10°C dan digojog hingga larut. Kemudian silika yang sudah larut ditempatkan pada plat kaca yang dimiliki kromatotron. Setelah itu silika diratakan sampai mengikuti bentuk piringan plat kaca. Larutan silika gel yang sudah dituangkan keatas plat didiamkan selama 24 jam agar mengembang. Larutan silika gel yang sudah mengembang dicetak menggunakan pencetak besi sesuai dengan ketebalan yang diinginkan. Plat silika ini yang akan dipasang pada alat kromatotron sebagai fase diam. Kemudian ruahan hasil sintesis yang sudah dipreparasi dengan kloroform dimasukkan ke dalam lubang yang tertera di bagian atas alat kromatotron. Setelah itu dialirkan melalui lubang yang sama yaitu fase gerak. Fase gerak

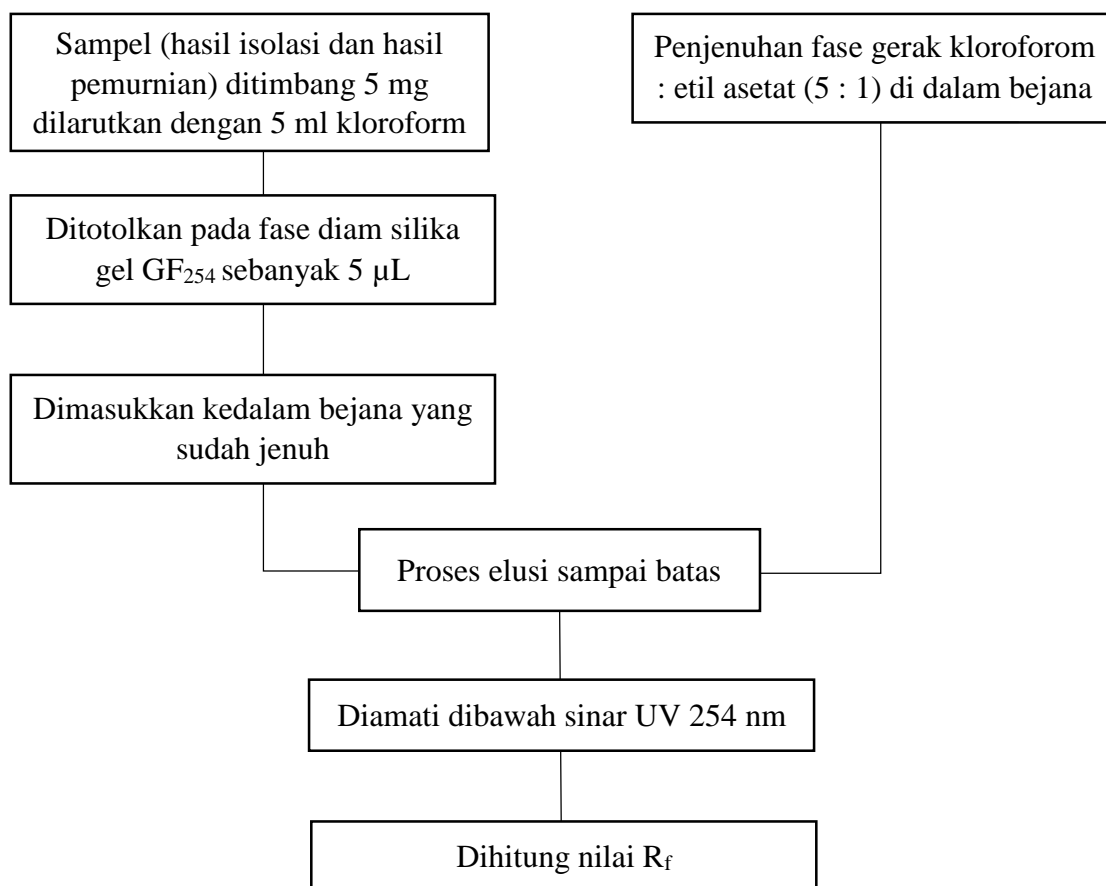
yang digunakan yaitu heksana dan kloroform serta kloroform pro analisis tunggal dengan berbagai perbandingan untuk mengetahui efektivitas waktu dalam proses pemisahan serta hasil kemurnian GVT-0 yang dihasilkan. Sampel yang dipisahkan berputar dengan kecepatan 720 rpm sesuai gaya sentrifugal yang dimiliki alat kromatotron. Senyawa yang lebih kuat berikatan dengan fase gerak akan bergerak ke bagian pinggir plat terlebih dahulu mengikuti gaya sentrifugal. Suatu senyawa akan terikat pada fase diam atau fase gerak sesuai dengan tingkat kepolarannya. Akan ada cairan hasil pemisahan yang keluar dari lubang yang ada di bagian bawah kromatotron yaitu hasil pemurnian. Hasil pemurnian pada penelitian ini dibagi menjadi dua. Pertama larutan vanillin yang dipisahkan dari ruahan hasil sintesis. Dan yang kedua larutan GVT-0 yang sudah terpisah dari vanillin dan senyawa lain. Hasil pemisahan vanillin ditampung menggunakan Erlenmeyer. Sedangkan hasil pemurnian GVT-0 ditampung menggunakan tabung reaksi sampai warna kuning yang dihasilkan tidak ada. Hasil pemurnian ini dilakukan analisis untuk menguji kemurnian dari GVT-0.



Gambar 7. Bagan cara kerja pemurnian GVT-0

4. Analisis GVT-0

Analisis kualitatif dilakukan dengan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT). KLT dilakukan untuk menganalisis secara kualitatif hasil pemurnian menggunakan kromatotron yang akan dibandingkan dengan sebelum menggunakan kromatotron. Digunakan fase diam berupa silika gel 60 GF₂₅₄ merk. Sedangkan fase gerak yang digunakan adalah campuran dua pelarut yaitu kloroform : etil asetat (5:1). Fase gerak tersebut dimasukkan dalam bejana tertutup. Kemudian disiapkan sampel (hasil isolasi dan hasil pemisahan) yang akan ditotolkan dengan cara sampel yang sudah kering tadi digerus kemudian diambil 5 mg. Setelah itu ditambahkan kloroform 5 ml untuk mengencerkan sampel. Lalu ditotolkan pada plat silika yang sudah disiapkan. Sampel yang ditotolkan sebanyak 5 µL menggunakan *syringe*. Proses ini juga dilakukan untuk vanillin yang digunakan sebagai pembanding sampel pada plat KLT. Vanillin yang ditotolkan sebanyak 5 µL menggunakan *syringe*. Setelah semua siap plat yang sudah ditotolkan sampel dan pembanding dimasukkan ke dalam bejana yang sudah ada fase gerak jenuh di dalamnya. Didiamkan plat supaya fase gerak bergerak ke atas mengikuti gaya kapilaritas sampai batas yang ditentukan. Setelah selesai plat diambil, dikeringkan, dan diamati dibawah sinar UV serta sinar Visibel. Dihitung nilai R_f dari sampel dan pembanding.



Gambar 8. Bagan cara kerja analisis kualitatif GVT-0

G. Analisis Hasil Kemurnian GVT-0

Kemurnian GVT-0 hasil pemisahan dengan kromatotron dianalisis dengan analisis menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) yang menunjukkan hanya muncul satu bercak pada tiga sampai empat jenis eluen atau fase gerak yang berbeda. Kemudian dilihat juga dari jarak lebur yang sempit pada uji titik lebur.