

BAB IV

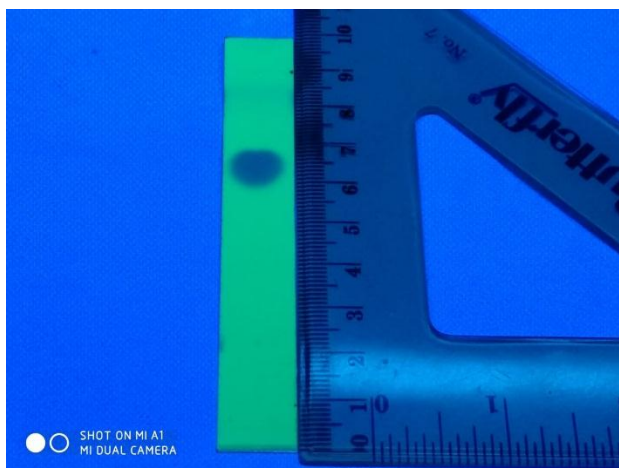
HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Persiapan Sintesis Gamavuton-0

Tahap persiapan sintesis merupakan tahap penyiapan alat dan bahan yang akan digunakan pada saat sintesis GVT-0. Persiapan yang dilakukan diantaranya menjamin kemurnian dari *raw material* (vanillin) yang digunakan, melakukan pemilihan metode sintesis yang akan digunakan, dan indikator yang ditetapkan untuk mengetahui secara kualitatif bahwa GVT-0 sudah terbentuk. *Raw material* yang digunakan adalah vanillin dan aseton pro analisis. Vanillin yang digunakan bersifat teknis dan diperoleh dari Bratachem. Untuk menjamin kemurnian dari *raw material* perlu dilakukan analisis kualitatif. Vanillin yang bersifat teknis dilakukan analisis kualitatif menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) untuk mengetahui nilai R_f . Nilai R_f yang diperoleh dibandingkan dengan nilai R_f yang sudah diperoleh Fahrurozi (2008) dan Hadi (2015). Hasil KLT yang diperoleh dari vanillin dapat dilihat pada gambar 9.

Nilai R_f yang didapatkan dari analisis kualitatif menggunakan KLT adalah 0,75. Hasil nilai R_f tersebut tidak terlalu jauh dengan nilai R_f berdasarkan penelitian Fahrurozi (2008) dan Hadi (2015) yang memiliki nilai R_f 0,72 dan 0,73. Perhitungan nilai R_f yang didapatkan dapat dilihat pada lampiran 1. Nilai R_f yang didapatkan berdasarkan perhitungan dengan menggunakan persamaan berikut:

$$R_f = \frac{\text{Jarak Tempuh Senyawa}}{\text{Jarak Tempuh eluen}}$$



Gambar 9. Analisis KLT vanillin

Analisis secara organoleptis juga dilakukan pada vanillin yang digunakan. Berdasarkan Farmakope Indonesia IV, vanillin yang sesuai berbentuk seperti jarum dengan warna putih kekuningan. Selain itu vanillin memiliki bau yang khas. Vanillin yang digunakan dapat dilihat pada Gambar 10.



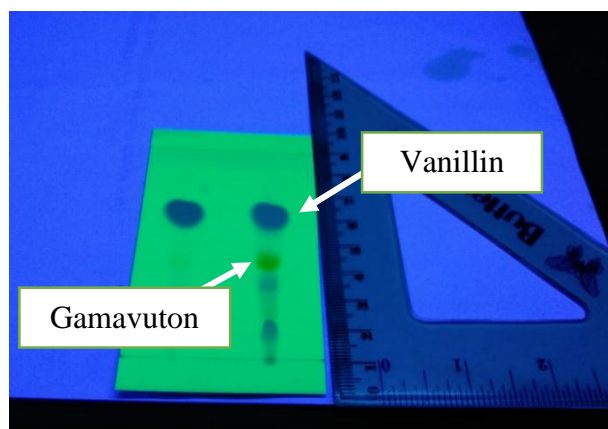
Gambar 10. Organoleptis vanillin

Vanillin yang digunakan sudah sesuai dengan yang disebutkan pada Farmakope Indonesia edisi IV.

Analisis yang dilakukan terhadap metode sintesis yang digunakan berdasarkan organoleptis ruahan hasil sintesis yang terbentuk dan secara kualitatif. Hasil ruahan dari sintesis GVT-0 terdapat pada gambar 11. Analisis kualitatif yang dilakukan adalah membandingkan spot R_f yang diduga GVT-0 dengan spot R_f GVT-0 dari penelitian Fahrurozi (2008) dan Hadi (2015) yaitu 0,5. Untuk analisis organoleptis dilakukan pengamatan pada ruahan yang dihasilkan dari proses sintesis. Kemudian untuk memastikan bahwa terdapat senyawa GVT-0 dilakukan KLT terhadap ruahan yang didapatkan dari hasil sintesis. Hasil KLT terhadap ruahan dapat dilihat pada gambar 12.



Gambar 11. Ruahan hasil sintesis GVT-0



Gambar 12. Analisis KLT ruahan hasil sintesis GVT-0

Terdapat warna kuning pada ruahan yang dihasilkan. Adanya warna kuning pada ruahan yang didapatkan menandakan terdapat senyawa GVT-0 yang terbentuk dari hasil sintesis. Kemudian pada hasil analisis KLT ruahan terdapat empat spot R_f . Spot pertama adalah vanillin. Spot kedua yang diduga GVT-0 memiliki R_f 0,5. Hasil R_f ini sesuai dengan spot GVT-0 yang ditunjukkan oleh Fahrurozi (2008) dan Hadi (2015).

B. Sintesis Gamavuton-0

Penelitian ini dimulai dari tahap sintesis. Tahap ini merupakan tahap awal untuk mendapatkan ruahan yang akan dimurnikan. Untuk mensintesis GVT-0 digunakan metode Samtisar (Samhoedi-Timmerman-Sardjiman) yang telah termodifikasi. Pada tahap sintesis ini digunakan vanillin dan aseton sebagai *raw material* pembentuk senyawa GVT-0. Tahap sintesis ini sesuai dengan yang dilakukan Fahrurozi (2008) yang telah melakukan sintesis GVT-0 menggunakan vanillin dan aseton sebagai *raw material* dengan penambahan asam tetapi tidak menggunakan pelarut etanol untuk melarutkan vanillin. Hadi (2015) juga melakukan tahapan sintesis dengan menggunakan *raw material* vanillin dan aseton serta memodifikasi vanillin yang dilarutkan dengan etanol. Proses melarutkan vanillin ini adalah modifikasi yang dilakukan pada metode Samtisar. Melarutkan vanillin dalam etanol dapat memperbesar permukaan vanillin sehingga dapat meningkatkan kecepatan reaksi. Penggunaan pelarut polar akan menaikkan solvasi senyawa terlarut (Isaacs, 1995). Peningkatan solvasi akan berdampak terhadap penurunan energi aktivitasnya, sehingga kecepatan reaksi akan meningkat. Penggunaan *raw material* ini berdasarkan

struktur dari GVT-0. Jika struktur GVT-0 dibagi menjadi tiga akan terdiri dari dua struktur vanillin dan satu struktur aseton. Pembagian struktur GVT-0 dapat dilihat pada gambar 4. Selain vanillin dan aseton yang menjadi *raw material* digunakan juga HCl 37%. HCl 37% digunakan sebagai katalis untuk mempercepat reaksi yang terjadi antara senyawa vanillin dengan aseton. Kemudian digunakan etanol *pro analitik* sebagai pelarut dari vanillin sebelum direaksikan.

Ada beberapa alat yang dapat digunakan untuk sintesis GVT-0. Hadi (2015) dan Rifai (2017) menggunakan *heating mantle* untuk sintesis GVT-0. Proses yang dilakukan untuk sintesis GVT-0 menggunakan *heating mantle* memerlukan waktu yang lama. Penelitian yang dilakukan Hadi (2015) memerlukan waktu pemanasan selama 1,5 jam untuk membentuk senyawa GVT-0. Penelitian lain yang dilakukan Rifai (2017) memerlukan waktu 1-4 jam pemanasan untuk membentuk senyawa GVT-0. Microwave merupakan salah satu alat yang dapat digunakan untuk melakukan proses sintesis. Berdasarkan Harimurti (2019) menggunakan *microwave* dapat lebih mengefisienkan penggunaan energi dan juga ramah lingkungan jika dibandingkan dengan metode sintesis dengan pemanasan konvensional. Sehingga pada penelitian ini proses sintesis GVT-0 mengadopsi penggunaan *microwave*. Optimasi sudah dilakukan pada *raw material* vanillin, aseton, dan katalis asam untuk dapat memaksimalkan hasil rendemen sampel GVT-0 yang didapatkan. Untuk hasil optimasi yang sudah dilakukan dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4. Hasil optimasi sintesis GVT-0 menggunakan *microwave* (hasil penelitian belum terpublikasi)

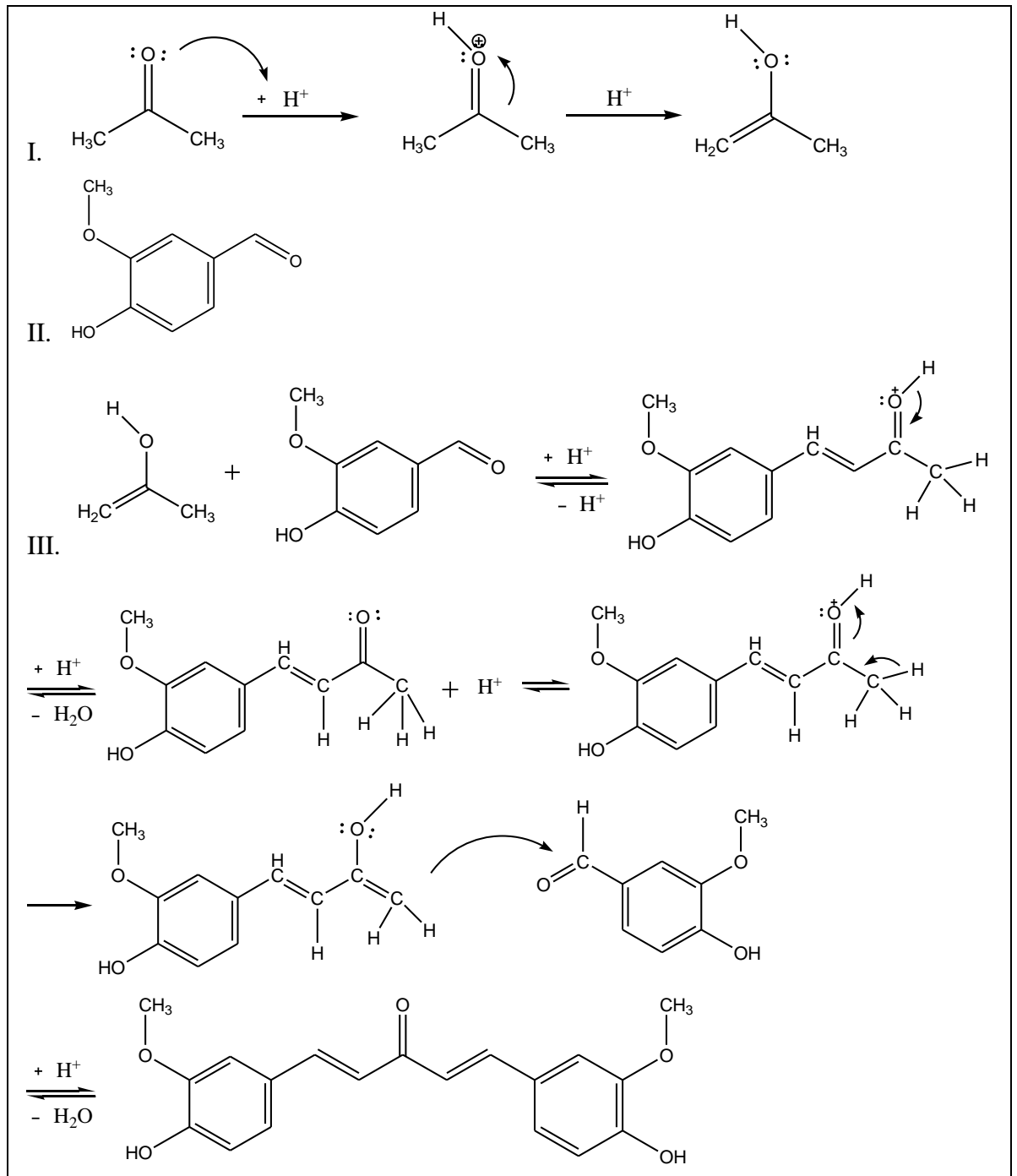
| Rasio (vanillin : aseton) | Katalis asam | Waktu | Daya |
|--------------------------------------|---------------------|--------------|-------------|
| 4,4 : 1 | 55 μ L | 2 menit | 643,89 watt |

Berdasarkan tabel 4 telah dilakukan optimasi terhadap perbandingan rasio *raw material* (vanillin dan aseton), katalisator (HCl), dan daya. Aseton diambil 10 ml kemudian dicampurkan dengan HCl 37% 50 μ L. Dari larutan aseton yang sudah diasamkan ini diambil 1 ml untuk dicampurkan kedalam vanillin yang sudah dilarutkan dengan etanol. Vanillin yang digunakan sejumlah 9,1114 g dan aseton yang digunakan 1 ml yang sudah diasamkan. Untuk perhitungan berat vanillin dapat dilihat pada lampiran 4. Reaksi yang terjadi pada pembentukan GVT-0 adalah kondensasi Claisen-Schmidt.

Reaksi utama pembentukan GVT-0 adalah reaksi kondensasi Claisen-Schmidt. Reaksi kondensasi ini terjadi pada gugus karbonil senyawa golongan keton. Tahapan-tahapan kondensasi Claisen-Schmidt menurut Sardjiman (2000) adalah :

1. Protonasi atom O pada karbonil keton (aseton). Protonasi akan membentuk intermediet enol yang berperan sebagai nukleofil.
2. Nukleofil yang terbentuk akan menyerang atom C karbonil aldehyd vanilin. Penyerangan tersebut dikarenakan atom C karbonil memiliki muatan yang lebih positif dan akan menghasilkan suatu ikatan α,β -unsaturated karbonil.
3. Atom O keton α,β -unsaturated karbonil akan membentuk senyawa antara intermediet enol. Senyawa ini akan menyerang molekul vanilin kedua untuk

membentuk ikatan GVT-0. Tahapan-tahapan tersebut dapat dilihat pada gambar 13.



Gambar 13. Reaksi Claisen-Schmidt dalam Pembentukan GVT-0
(Sardjiman, 2000)

Berdasarkan Fessenden dan Fessenden (1999) bahwa pada reaksi kondensasi Claisen-Schmidt katalis asam lebih banyak digunakan daripada katalis basa karena hasilnya yang lebih baik. Setelah itu vanillin dan aseton yang sudah bercampur dilakukan pemanasan dengan menggunakan *microwave*. Pemanasan dilakukan dengan daya 650 watt pada level *medium-high* di *microwave*. Daya yang digunakan tidak terlalu sesuai dengan hasil optimasi dikarenakan keterbatasan *microwave* yang hanya dapat diatur pada *medium-high* atau setara dengan 650 watt. Waktu yang digunakan untuk melakukan pemanasan dibutuhkan 2 menit. Berdasarkan hasil optimasi sebelumnya jika dilakukan sesuai dengan hasil optimasi akan didapat rendemen sebanyak 8,7 gram. Hasil dari pemanasan menggunakan *microwave* berwarna kuning kecokelatan dan menimbulkan bau yang khas.

C. Isolasi Gamavuton-0

Isolasi ruahan hasil sintesis dilakukan sebanyak 2 kali pada sampel hasil sintesis yang sama. Isolasi menggunakan aquades panas sebagai pelarut yang akan mengikat vanillin sehingga larut pada aquades panas. Ketika larutan hasil sintesis keluar dari *microwave* dalam keadaan cair didiamkan terlebih dahulu. Kemudian ditambahkan dengan aquades panas kedalam cawan porselen yang berisi cairan hasil sintesis. Cairan ini berwarna kuning kecokelatan dan berbau khas. Selanjutnya diaduk dan terdapat perbedaan lapisan. Vanillin akan larut dalam air panas sedangkan GVT-0 tidak akan larut dalam aquades panas. Dalam keadaan panas cairan tersebut disaring menggunakan kertas saring. Vanillin yang larut dalam aquades panas akan menetes melewati kertas saring.

Sedangkan GVT-0 yang tidak larut dalam aquades panas akan tersaring dan mengendap di kertas saring. Setelah itu sisa hasil penyaringan yang ada di kertas saring dipindahkan ke dalam cawan porselen. Hasilnya akan mengeras dengan sendirinya pada suhu ruang dan menjadi ruahan. Namun dapat dipercepat dengan memasukkan ke dalam oven untuk menguapkan senyawa yang mudah menguap. Setelah rendemen menjadi kering kembali dilakukan isolasi tahap ke dua. Isolasi dilakukan dengan aquades panas sama seperti isolasi tahap pertama. Namun yang berbeda adalah alat yang digunakan yaitu corong pisah. Corong pisah digunakan karena dapat memisahkan kedua cairan yang tidak menyatu atau dua fase dengan jelas. Ketika ruahan dilarutkan kembali menggunakan aquades panas, beberapa vanillin yang masih tersisa larut ke dalam aquades panas. GVT-0 yang tidak larut dalam aquades panas akan memisah. Cairan tersebut dimasukkan kedalam corong pisah. Cairan akan memisah sesuai dengan berat jenisnya masing-masing. GVT-0 akan berada di lapisan bawah karena memiliki berat jenis lebih besar dari pada vanillin. Sedangkan vanillin akan berada pada lapisan atas. Kran dibuka untuk mengambil cairan yang berisi GVT-0 berwarna kuning kecokelatan. Cairan ditempatkan pada cawan porselen. Selanjutnya akan dilakukan pemanasan untuk mengeringkan dan mendapatkan ruahan yang lebih murni. Dari isolasi yang dilakukan, berat rata-rata ruahan yang didapatkan adalah 5,7495 gram. Persentase dari ruahan ini adalah 58% dari berat vanillin dan aseton yang digunakan. Untuk perhitungan rendemen ruahan dapat dilihat pada lampiran 4. Ruahan yang sudah diisolasi dua kali akan dibagi menjadi dua. Bagian pertama akan dilakukan KLT. Bagian

kedua akan dilakukan pemurnian menggunakan kromatotron untuk mendapatkan GVT-0 yang lebih baik kemurniannya. Untuk hasil analisis kualitatif KLT pada ruahan bagian pertama dapat dilihat pada gambar 12.

D. Pemurnian Gamavuton-0 menggunakan kromatotron

Pemurnian menggunakan kromatotron dilakukan karena masih terdapat *raw material* dan senyawa lain yang ada pada ruahan hasil sintesis setelah diisolasi menggunakan air panas. Salah satu syarat pembuatan suatu obat adalah kemurnian dari senyawa obat yang baik. Pada hasil analisis kualitatif yang ditunjukkan dari gambar 12, masih terdapat *raw material* dan senyawa lain selain GVT-0 yang belum diketahui efek farmakologinya jika masuk ke dalam tubuh. Oleh karena itu dibutuhkan metode pemisahan untuk mendapatkan GVT-0 murni.

Metode pemisahan yang banyak dikenal adalah kromatografi. Banyak jenis kromatografi untuk pemisahan banyak senyawa, misalnya kromatografi kolom, kromatografi lapis tipis dan kromatografi sentrifugal. Kromatografi sentrifugal merupakan salah satu metode pemisahan yang memanfaatkan putaran untuk memisahkan senyawa satu dari senyawa lainnya. Metode ini adalah pengembangan dari metode kromatografi lapis tipis (KLT) dimana sama-sama memiliki fase diam berbentuk planar. Perbedaannya pada bentuk fase diamnya. KLT memiliki fase diam berbentuk persegi panjang sedangkan kromatografi sentrifugal berbentuk lingkaran. Selain itu cara kerja dari KLT berbeda dengan kromatografi sentrifugal. KLT memanfaatkan gaya kapilaritas untuk memisahkan campuran senyawa sedangkan kromatografi sentrifugal

menggunakan listrik untuk diubah menjadi gaya sentrifugal (berputar) dan gaya gravitasi yang dapat memisahkan campuran senyawa.

Alat yang digunakan pada kromatografi sentrifugal adalah kromatotron. Kromatotron dapat dilihat pada gambar 14. Pengambilan hasil pemisahan pada alat kromatotron mudah karena terdapat tempat keluarnya hasil pemisahan. Sehingga mudah untuk ditampung dengan tabung reaksi atau alat-alat lainnya. Berbeda dengan KLT, jika akan mendapatkan senyawa hasil pemisahan harus memisahkan spot senyawa murni yang masih bergabung dengan silika. Dilanjutkan dengan memisahkan antara silika dan senyawa GVT-0. Selain itu keterbatasan sampel yang dapat dilakukan pemisahan pada KLT juga mempersulit dan memakan waktu yang cukup lama.



Gambar 14. Alat kromatotron

Tahap ini dimulai dengan preparasi fase diam. Fase diam yang digunakan adalah silika gel GF₂₅₄ berbentuk serbuk halus putih. Silika ditimbang sebanyak

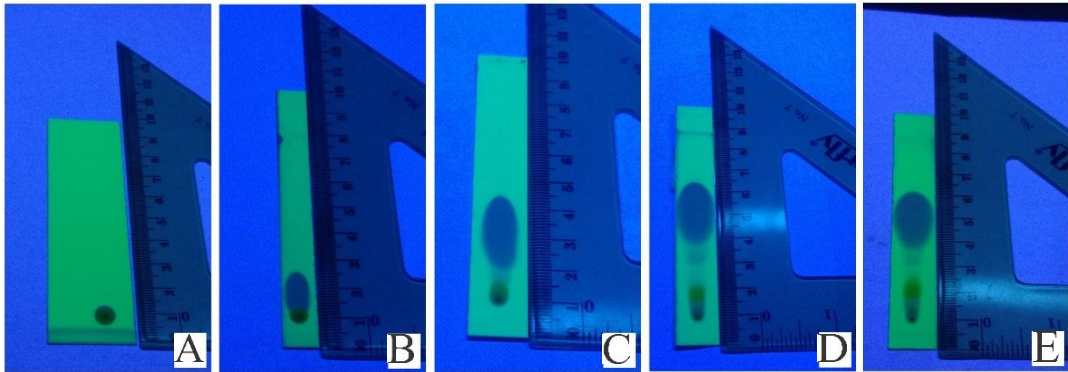
33 gram. Jumlah ini berdasarkan tebal plat yang dibutuhkan yaitu 1 mm. Semakin tebal plat akan membutuhkan waktu pemisahan lebih lama serta fase gerak yang lebih banyak. Silika yang sudah ditimbang dilarutkan menggunakan aquades 10 °C 100 ml. Aquades digunakan untuk mengembangkan silika gel dan membuat silika saling berikatan antar molekulnya. Setelah itu larutan silika gel dituang ke dalam plat kaca yang pinggirnya sudah dibatasi menggunakan *double tip* dan diletakkan pada tempat yang datar dan rata. Kemudian larutan didiamkan selama 24 jam supaya mengembang. Setelah mengembang dicetak dengan ketebalan 1 mm. Ketebalan ini dipilih agar pemisahan lebih cepat dan tidak membutuhkan eluen yang banyak.

Selanjutnya dilakukan preparasi sampel yang akan dipisahkan. Sampel ditimbang sebanyak 2,5 g menggunakan timbangan digital. Kemudian sampel dilarutkan dengan 5 ml kloroform. Sampel yang telah larut ini kemudian dimasukkan ke dalam kromatotron dalam posisi menyala atau berputar. Elusi dilakukan secara gradien. Elusi ini menggunakan beberapa fase gerak berbeda untuk memisahkan senyawa (Gandjar dan Abdul Rohman, 2007). Berdasarkan Gandjar dan Abdul Rohman (2007) tujuan utama dari sistem gradien ini adalah untuk mengubah polaritas dari fase gerak sehingga dapat disesuaikan dengan senyawa yang diinginkan. Elusi jenis ini tepat dilakukan pada pemisahan sampel ekstrak bahan alam atau pada sampel yang masih memiliki banyak campuran.

Tahap selanjutnya adalah pemilihan fase gerak yang tepat. Pemilihan fase gerak didasarkan pada kemampuan fase gerak mengikat vanillin. Sehingga

dapat membuat vanillin hilang terlebih dahulu. Kemudian baru menggunakan fase gerak yang dapat mengikat GVT-0 untuk mendapatkan senyawa tersebut. Sebelum dilakukan pemilihan terlebih dahulu dilakukan percobaan elusi fase gerak berbeda pada sampel ruahan menggunakan KLT. Hal ini untuk melihat fase gerak mana yang cocok untuk menaikkan vanillin saja. Ada 5 fase gerak yang dipilih untuk dilakukan percobaan yaitu heksana, heksana : kloroform (7:3), heksana : kloroform (6:4), heksana : kloroform (4:6), heksana : kloroform (3:7). Hasil dari elusi masing-masing fase gerak tersebut dapat dilihat pada gambar 15.

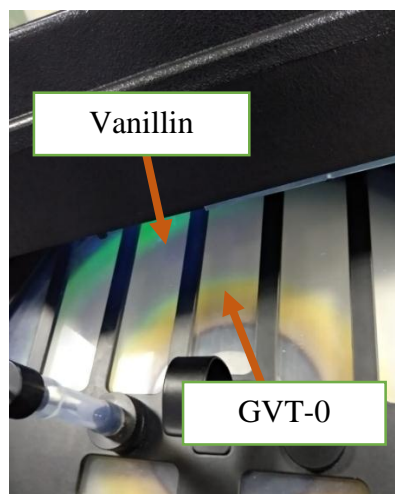
Dari hasil percobaan elusi dapat diketahui bahwa heksana masih sangat non polar sehingga tidak mengikat apapun dan tidak ada senyawa dari sampel ruahan yang ikut terelusi. Kemudian heksana : kloroform (7:3) dapat menaikkan vanillin namun masih terlalu non polar sehingga jarak yang ditempuh untuk membawa vanillin masih pendek. Heksana : kloroform (6:4) dapat menaikkan vanillin dan tidak ikut membawa GVT-0. Heksana : kloroform (4:6) dapat mengelusi vanillin namun GVT-0 ikut terelusi bersama fase gerak. Heksana : kloroform (3:7) dapat mengelusi vanillin namun GVT-0 juga ikut terelusi lebih jauh.



Gambar 15. Hasil percobaan elusi masing-masing fase gerak untuk mengelusi vanillin (A. Heksana ; B. Heksana : kloroform (7:3) ; C. Heksana : kloroform (6:4) ; D. Heksana : kloroform (4:6) ; E. Heksana : kloroform (3:7)

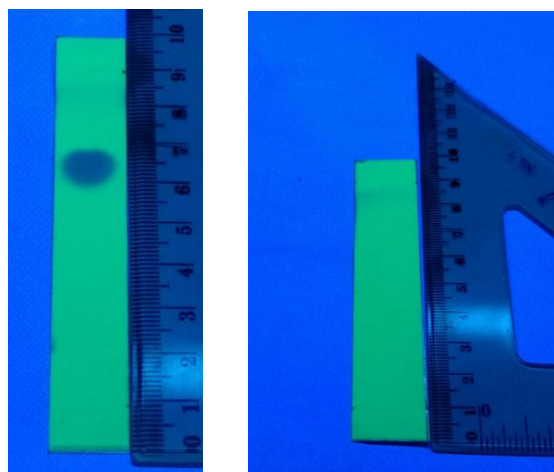
Berdasarkan hasil percobaan digunakan dua fase gerak yaitu heksana : kloroform (6:4) dan kloroform murni. Pemilihan fase gerak heksana dan kloroform dengan perbandingan (6:4) didasarkan pada hasil percobaan yang mana fase gerak tersebut dapat mengikat dan mengelusi vanillin serta tidak ikut mengelusi GVT-0. Hal ini akan membuat vanillin bergerak ke tepi plat kromatotron pada saat elusi menggunakan kromatotron dan menahan GVT-0 untuk tidak ikut menuju ke tepi plat kromatotron. Proses ini dapat dilihat pada gambar 16. Ketika vanillin terlebih dahulu menuju kearah tepi dari plat kromatotron maka vanillin pula yang akan keluar terlebih dahulu dibandingkan senyawa lain. Vanillin yang keluar ditampung menggunakan erlenmeyer. Vanillin ketika proses elusi pada kromatotron tidak memperlihatkan warna pada cahaya tampak. Berdasarkan analisis penelitian yang dilakukan oleh Hadi (2015) bahwa vanillin memiliki serapan panjang gelombang 234 nm dan 206 nm pada hasil HPTLC. Panjang gelombang tersebut termasuk dalam panjang gelombang UV. Oleh karena itu digunakan *detector UV portable* untuk melihat

sejauh mana vanillin terelusi. Selain itu *detector UV portable* digunakan untuk mendeteksi vanillin yang masih terdapat pada plat agar tidak mengotori hasil nantinya.



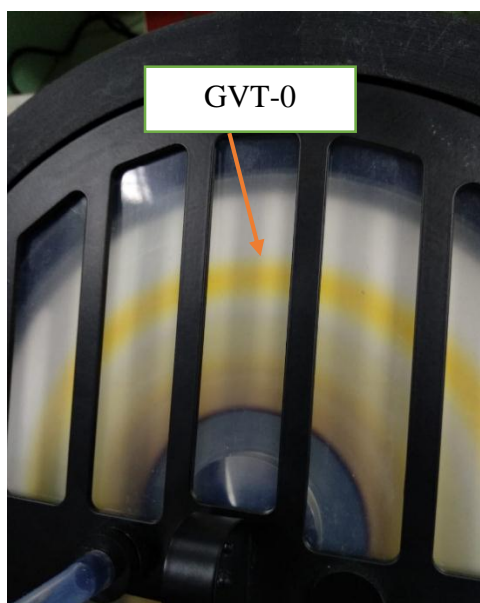
Gambar 16. Proses elusi menggunakan heksana : kloroform (6:4)

Setelah vanillin selesai ditampung perlu adanya analisis kualitatif menggunakan KLT terhadap fase gerak yang keluar. Hal ini untuk mengetahui vanillin benar sudah tidak ada yang tertinggal. Hasil analisis kualitatif ini dapat dilihat pada gambar 17.



Gambar 17. Hasil analisis KLT untuk mengetahui vanillin sudah tidak ada (kiri : baku vanillin ; kanan : hasil vanillin tidak ada)

Selanjutnya mengelusi GVT-0 menggunakan kloroform. Digunakan kloroform karena dapat mengikat senyawa GVT-0 sehingga dapat ikut terelusi. Proses ini dapat dilihat pada gambar 18.



Gambar 18. Proses elusi mendapatkan GVT-0

Pada gambar yang ditunjukkan oleh tanda panah merupakan GVT-0 yang sedang dielusi. GVT-0 merupakan senyawa yang tampak berwarna kuning. Sehingga tidak perlu menggunakan *detector UV* untuk melihat GVT-0 sudah terelusi. Hal ini sesuai dengan analisis penelitian yang dilakukan oleh Hadi (2015) bahwa GVT-0 memiliki panjang gelombang 410 nm, 434 nm, dan 506 nm. Setelah GVT-0 menuju tepi dan keluar, langsung ditampung menggunakan tabung reaksi. GVT-0 ditampung sampai cairan yang menetes tidak berwarna kuning yang menandakan senyawa GVT-0 sudah selesai terelusi.

Hasil dari elusi GVT-0 dipindahkan ke cawan porselen untuk diuapkan. Penguapan dilakukan diatas *waterbath* dengan suhu 50°C. Ketika fase gerak

sudah menguap sempurna dilanjutkan menggosok permukaan atas dari cawan porselen untuk mendapatkan rendemen senyawa GVT-0. Rendemen yang didapatkan 0,58 % yang dapat dihitung menggunakan rumus berikut

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{\text{Berat hasil pemisahan kromatotron}}{\text{Berat sebelum pemisahan}} \times 100$$

Perhitungan rendemen dapat dilihat pada lampiran 3. Setelah rendemen GVT-0 didapatkan kemudian dipindahkan pada vial. Selanjutnya dilakukan proses analisis kemurnian senyawa GVT-0.

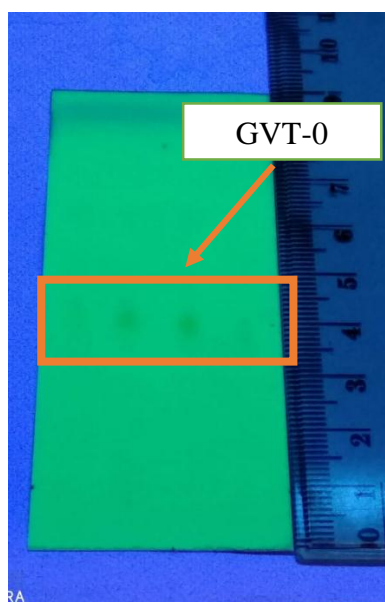
E. Analisis Kualitatif Gamavuton-0

Analisis kualitatif GVT-0 dilakukan untuk mengetahui nilai R_f yang ditunjukkan oleh GVT-0. Analisis kualitatif merupakan langkah awal yang digunakan untuk mengetahui murni atau tidaknya senyawa yang sudah dipisahkan. Hasil analisis akan dibandingkan antara sebelum dan sesudah dilakukan pemisahan menggunakan kromatotron. Hal tersebut sesuai dengan tujuan analisis kualitatif yaitu untuk mengetahui senyawa GVT-0 sudah dapat berpisah dengan *raw material* yang digunakan yaitu vanillin atau belum. Fase diam yang digunakan adalah plat silika gel GF₂₅₄. Plat silika gel ini adalah gypsum yang dapat berfluorosensi ketika diamati pada sinar UV 254 nm. Hal ini berguna ketika akan mengamati vanillin yang tidak berwarna pada cahaya tampak. Fase gerak yang digunakan adalah kloroform dan etil asetat (5:1). Penggunaan fase gerak ini mengadopsi dari penelitian yang dilakukan oleh Hadi (2015) dan Rifai (2017).

Plat silika dipotong dengan luas 10 cm x 4 cm. Pada batas atas dan batas bawah diberikan tanda untuk menandai batas yang harus ditempuh fase gerak.

Fase gerak yang digunakan 12 ml dengan perbandingan kloroform : etil asetat (5:1). Fase gerak dimasukkan kedalam *chamber* untuk dilakukan penjenuhan. Kertas saring dimasukkan ke dalam *chamber* yang berguna sebagai *detector* kejenuhan. *Chamber* yang sudah jenuh ditandai dengan fase gerak yang sudah naik mengikuti kertas saring. Penjenuhan dilakukan untuk memastikan bahwa fase gerak sudah dapat mencapai titik yang diinginkan dengan cara elusi menaik (*ascending*). Teknik *ascending* memanfaatkan gaya kapilaritas dari fase gerak.

Sampel yang akan dianalisis ditimbang sebanyak 5 mg kemudian dilarutkan menggunakan kloroform 5 ml. Sampel kemudian ditotolkan pada plat yang sudah dipotong. Kemudian dilakukan elusi pada plat sampai batas tanda yang ditentukan. Hasil analisis KLT sampel setelah pemisahan menggunakan kromatotron dapat dilihat pada gambar 19.



Gambar 19. Analisis KLT sesudah pemisahan menggunakan kromatotron Berdasarkan gambar 19 terdapat satu spot berwarna kuning yang memiliki R_f 0,5. Hal ini menandakan bahwa senyawa tersebut merupakan senyawa GVT-0

yang memiliki Rf yang sama pada gambar 12. Selain itu satu spot menandakan GVT-0 sudah dapat berpisah dengan *raw material* berupa vanillin.

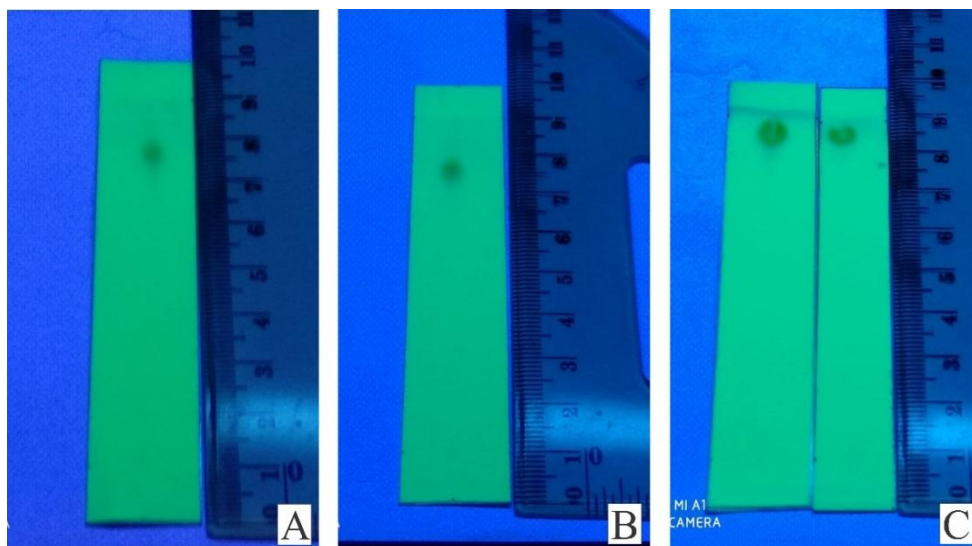
F. Uji Kemurnian Senyawa Gamavuton-0

1. Kromatografi Lapis Tipis menggunakan 4 eluen berbeda

Uji kemurnian senyawa GVT-0 dilakukan untuk membuktikan kemurnian senyawa GVT-0 yang didapatkan setelah dilakukan pemisahan. Salah satu uji kemurnian yang dilakukan adalah KLT menggunakan empat eluen yang berbeda. KLT yang dilakukan memiliki konsep yang sama dengan KLT pada analisis kualitatif GVT-0 yang dilakukan sebelumnya. Hanya saja terdapat banyak fase gerak yang digunakan untuk melakukan elusi terhadap rendemen hasil pemisahan. Uji kemurnian ini bertujuan untuk melihat kemurnian dari rendemen hasil pemisahan jika dilakukan elusi menggunakan berbagai macam fase gerak dengan kepolaran yang berbeda. Ketika hasil spot yang diperoleh adalah tunggal atau satu, maka itu menandakan hasil pemisahan tersebut murni (Mathias *et al*, 1987).

Rendemen hasil pemisahan yang didapatkan dilarutkan menggunakan kloroform. Kemudian dielusi menggunakan empat fase gerak yang berbeda yaitu, butanol : asam asetat : aquades (7:0,5:0,5), butanol : asam asetat : etanol (6:1:5), dan etil asetat : butanol : asam asetat (4:3:1). Fase gerak yang dipilih ini berdasarkan tingkat kepolaran yang berbeda dan akan memberikan hasil yang berbeda kepada lempeng KLT (Nuari *et al*, 2017).

Hasil kemurnian yang didapat dari rendemen setelah pemisahan dapat dilihat pada gambar 20.



Gambar 20. Hasil uji kemurnian KLT fase gerak berbeda (A : Butanol : Asam asetat : Etanol (6:1:5) ; B : Butanol : Asam asetat : Water (7:0,5:0,5) ; C : Etil asetat : Butanol : Asam asetat (4:3:1))

Berdasarkan hasil yang didapat pada gambar 20 dan 19, hanya terdapat satu spot tunggal pada masing-masing fase gerak yang digunakan. Ini menandakan tidak terdapat pengotor lain yang ada pada rendemen hasil pemisahan. Hal ini dapat menandakan bahwa rendemen yang didapatkan setelah pemisahan relatif murni.

2. Uji titik lebur

Uji kemurnian lain yang dilakukan adalah titik lebur. Titik lebur merupakan salah satu ciri penting yang dimiliki masing-masing senyawa. Titik lebur merupakan uji untuk melihat angka temperatur dimana terjadi perubahan dari padatan menjadi cairan pada suatu senyawa (Doyle & Mungall, 1980). Menurut Lestari (2003) titik lebur merupakan tetapan fisika penting pada senyawa hasil sintesis.

Pada penelitian ini dilakukan uji titik lebur pada rendemen hasil pemisahan. GVT-0 dalam bentuk padatan dimasukkan ke dalam pipa kapiler khusus untuk

alat uji titik lebur. GVT-0 dimasukkan sampai pipa kapiler terisi sejauh 0,5 cm dari dasar pipa. Kemudian pipa kapiler diletakkan pada lubang yang tersedia pada alat dan memposisikan GVT-0 berada ditengah kaca pengamatan. Alat diatur dengan suhu mendekati literature dari titik lebur GVT-0. Berdasarkan Safitri (2017) angka *melting point* dari GVT-0 dengan nama IUPAC 1,5-bis(4'-hidroksi-3'-metoksifenil)-1,4-pentadien-3-on adalah 98-99 °C. Hasil angka titik lebur yang diperoleh dari rendemen hasil pemisahan adalah 87,9-89,8 °C. Hasil angka titik lebur dapat dilihat pada gambar 21.



Gambar 21. Angka titik lebur dari GVT-0 hasil pemisahan (A : angka awal melebur; B : angka akhir melebur)

Walaupun mempunyai melting point yang agak berbeda dengan yang dimiliki Safitri (2017), namun jarak lebur dari rendemen hasil pemisahan ini adalah 1,9°C. Hal ini masih sesuai dengan jarak lebur suatu senyawa murni adalah tajam diantara 1-2 °C. Sehingga rendemen hasil pemisahan ini dapat dikatakan murni berdasarkan titik leburnya.