



**Borang Pengesahan  
Laporan Projek Tahun Akhir (STF3014)**

Fakulti Sains dan Teknologi Sumber  
Universiti Malaysia Sarawak

Saya Che Haslinaidu Che Hassan (nama) no. pelajar  
8038 mengaku telah membuat perubahan yang perlu\* / tidak ada

perubahan terhadap Laporan Projek Tahun Akhir yang bertajuk:

Kajian Fitokimia Dan Aktiviti Biologi ke Atas Piper umbellatum

Bersama ini saya kemukakan 3 salinan Laporan Projek Tahun Akhir dan 1 salinan 'softcopy' Laporan berkenaan.

Tandatangan Pelajar

(Che Haslinaidu Che Hassan)

Tandatangan Penyelia

Assoc. Prof. Dr. Fasihuddin ~~Badrudin~~ Ahmad  
Deputy Dean  
(Research and Postgraduate)

Faculty of Resource Science and Technology  
UNIVERSITI MALAYSIA SARAWAK

**Pengesahan**  
Tandatangan Ketua Program

(Nama & Cop Rasmi)

\* - potong yang tidak berkaitan

KAJIAN FITOKIMIA DAN AKTIVITI BIOLOGI KE ATAS *PIPER UMBELLATUM*

P.KHIDMAT MAKLUMAT AKADEMIK  
UNIMAS



1000128227

CHE HASLINAIDA CHE HASSAN

Projek ini dihantar sebagai syarat memenuhi keperluan untuk  
Ijazah Sarjana Muda Sains dengan Kepujian  
(Kimia Sumber)

Fakulti Sains dan Teknologi Sumber  
UNIVERSITI MALAYSIA SARAWAK  
b0 b W

## PENGAKUAN

Saya mengaku bahawa tiada bahagian daripada penyelidikan yang dilaporkan dalam laporan ini telah digunakan sebagai bahan sokongan untuk sesuatu ijazah atau kelulusan sama ada daripada universiti ini atau institusi pengajian tinggi yang lain.



Che Haslinaida Che Hassan  
Program Kimia Sumber  
Fakulti Sains dan Teknologi Sumber  
Universiti Malaysia Sarawak

## PENGHARGAAN

Pertamanya, saya ingin mengucapkan setinggi-tinggi penghargaan kepada Prof. Madya Dr. Fasihuddin selaku penyelia saya dalam membantu saya menyiapkan projek tahun akhir saya.

Saya juga ingin mengucapkan berbanyak terima kasih kepada pembantu makmal kimia iaitu En. Rajuna, En. Jahina, dan Haji Karni terutamanya dalam membantu saya ketika mengendalikan mesin-mesin dan memberi tunjuk ajar menggunakan alat-alat dalam makmal.

Tidak lupa juga kepada rakan-rakan saya dan kepada sesiapa yang terlibat dalam menjayakan projek ini dan memberi pandangan yang amat berguna kepada saya.

Akhir sekali, saya juga ingin mengucapkan berbanyak terima kasih kepada kedua ibu bapa saya dan juga ahli keluarga yang lain di atas sokongan dan semangat yang diberikan untuk menyiapkan projek tahun akhir ini.

## SENARAI KANDUNGAN

<b>PENGAKUAN</b>	ii
<b>PENGHARGAAN</b>	iii
<b>SENARAI KANDUNGAN</b>	iv
<b>ABSTRAK</b>	vii
<b><i>ABSTRACT</i></b>	viii
<b>BAB 1: PENGENALAN</b>	1
<b>BAB 2: KAJIAN PERPUSTAKAAN</b>	
2.1 Pendahuluan	4
2.2 Kepentingan <i>Piper</i> spp. dalam perubatan	4
2.3 Kajian Fitokimia ke atas <i>Piper</i> spp.	7
<b>BAB 3: BAHAN DAN KAEDAH</b>	
3.1 Bahan Tumbuhan	12
3.2 Umum	12
3.3 Pengekstrakan, pemisahan dan penulenan	13
3.4 Pengecaman sebatian	15
3.5 Penentuan kumpulan berfungsi	15
3.6 Ujian ketoksikan	16
<b>BAB 4: KEPUTUSAN DAN PERBINCANGAN</b>	
4.1 Pengekstrakan, pemfraksian dan penulenan	17
4.2 Pengecaman sebatian yang telah dipisahkan	23
4.3 Ujian ketoksikan	24

<b>BAB 5: KESIMPULAN DAN CADANGAN</b>	26
<b>RUJUKAN</b>	27

## LAMPIRAN

**Lampiran 1.** Plat KLN bagi ekstrak kasar heksana *Piper umbellatum* dalam heksana-etil asetat (4:1)

**Lampiran 2.** Plat KLN bagi ekstrak kasar etil asetat *Piper umbellatum* dalam heksana-etil asetat (5:3)

**Lampiran 3.** Plat KLN bagi ekstrak kasar etanol *Piper umbellatum* dalam heksana:aseton (7:3)

**Lampiran 4.** Plat KLN bagi EA07 (i) dalam heksana-etil asetat (5:3)

**Lampiran 5.** Plat KLN bagi EA08 (ii) dalam heksana-etil aseta(5:3)

**Lampiran 6.** Plat KLN bagi EA10 (iii) dalam heksana-etil asetat (5:3)

**Lampiran 7.** Kromatogram GC/FID bagi EA07 (i)

**Lampiran 8.** Kromatogram GC/FID bagi EA08 (ii)

**Lampiran 9.** Kromatogram GC/FID bagi EA10 (iii)

## ABSTRAK

Kajian fitokimia dan aktiviti biologi telah dijalankan ke atas batang *Piper umbellatum* (Piperaceae). Kaedah kromatografi lapisan nipis, kromatografi turus dan kromatografi lapisan nipis persediaan telah digunakan dalam proses pemisahan dan penulenan. Tiga sebatian separa tulen telah berjaya dipisahkan iaitu EA07 (i), EA08 (ii) dan EA10 (iii). Sebatian-sebatian ini memberikan nilai  $R_f$  0.72, 0.88 dan 0.54 dalam sistem pelarut heksana-etil asetat (5:3) masing-masingnya. Ujian ketoksikan ke atas anak udang (*Artemia salina*) menunjukkan kebanyakan ekstrak kasar mempunyai tahap ketoksikan yang rendah. Hanya fraksi EA07 memberikan nilai  $LD_{50}$  pada 40  $\mu\text{g/mL}$ . Fraksi EA08 dan EA10 masing-masingnya memberikan nilai  $LD_{50}$  pada 55  $\mu\text{g/mL}$  dan 100  $\mu\text{g/mL}$ .

Kata kunci: *Piper umbellatum*, pengekstrakan, pemfraksian, penulenan, ujian ketoksikan



## **ABSTRACT**

*Phytochemical and biological studies have been carried out on the stem of Piper umbellatum. The extracts were subjected to thin layer chromatography, column chromatography and preparative thin layer chromatography in order to isolate and purify pure compounds. Three semi pure compounds were isolated, EA07 (i), EA08 (ii) and EA10 (iii) with  $R_f$  values of 0.72, 0.88 and 0.54 in hexane-ethyl acetate (5:3) respectively. In the toxicity test, most of the fractions and crude extracts indicated a low toxicity on the larvae Artemia salina. Only fraction EA07 showed  $LD_{50}$  at 40  $\mu\text{g/mL}$ . Fractions EA08 and EA10 gave  $LD_{50}$  of 55  $\mu\text{g/mL}$  and 100  $\mu\text{g/mL}$  respectively.*

*Key words: Piper umbellatum, extraction, fractionation, purification, toxicity test*

# BAB 1

## PENGENALAN

Berbagai sebatian aktif biologi telah dipisahkan dan dicirikan dari *Piper* spp. (Parmar *et al.*, 1997). Kajian fitokimia yang telah dijalankan ke atas *Piper* spp. mendapati terdapat berbagai sebatian aktif biologi seperti flavonoid, terpenoid, alkaloid, amida, lignan dan neolignan yang dihasilkan oleh *Piper* spp. (Jensen *et al.*, 1993; Parmar *et al.*, 1997; Gupta *et al.*, 1999). Selain mempunyai nilai komersil dan kepentingan ekonomi yang tinggi, *Piper* spp. juga digunakan dalam perubatan bagi merawat berbagai penyakit.

Genus *Piper* dikelaskan di bawah famili Piperaceae. Terdapat lebih kurang 700 spesies *Piper* tertabur di seluruh dunia terutama di kawasan tropika dan subtropika (Parmar *et al.*, 1997). Beberapa sebatian yang telah dipisahkan dari *Piper* spp. dan aktiviti biologinya diberikan dalam Jadual 1. Bahagian yang biasa digunakan dalam perubatan ialah akar, batang dan daun. Di antara beberapa spesies *Piper* yang telah dikaji secara meluas termasuklah *Piper nigrum*, *Piper tuberculatum*, *Piper methysticum*, *Piper aduncum*, *Piper hispidum*, *Piper stylosum*, *Piper guineense* dan lain-lain (Parmar *et al.*, 1997).

**Jadual 1:** Berbagai sebatian yang dipisahkan dari *Piper* spp. dan aktiviti biologinya

Jenis	Sebatian	Aktiviti Biologi	Rujukan
<i>Piper betle</i>	Kavibetol asetat	Racun kulat	Grag dan Jain, 1996
	Kavikol	Racun kulat	Grag dan Jain, 1996
<i>Piper nigrum</i>	Piperisida	Racun serangga	Miyakado <i>et al.</i> , 1989
<i>Piper aduncum</i>	Pseudodilapiola	Antimikrob yang kuat	Burke dan Nair, 1986
	Adunkamida	Anti bakteria	Orjala <i>et al.</i> , 1993
<i>Piper tuberculatum</i>	Piplartina	Racun kulat	Homan dan Fuchs, 1970
<i>Piper methysticum</i>	Yangonon	Menghalang pertumbuhan ameba	Young <i>et al.</i> , 1966
<i>Piper hispidum</i>	N-[7-(3',4'-metilenadioksifenil)-2(Z),4(Z)-heptadienol]pirolidina	Racun kulat	Alecio <i>et al.</i> , 1998
<i>Piper sarmentosum</i>	Asarisin $\alpha$ -Asarona $\gamma$ -Asarona	Aktiviti antibakteria ke atas <i>E. coli</i> dan <i>Bacillus subtilis</i>	Masuda <i>et al.</i> , 1991
<i>Piper retrofractum</i>	(2E,8E)-N-9-(3,4-Metildioksifenil)-nonadienolpiperidina	Menyebabkan pengembangan jantung tikus	Ahn <i>et al.</i> , 1992

Objektif utama kajian ini dijalankan adalah untuk mengasingkan sebatian aktif biologi daripada *Piper umbellatum*. Kajian ini melibatkan kaedah pemisahan, penulenan dan pengecaman struktur. Selain dari itu aktiviti biologi khususnya ujian ketoksikan ke atas anak udang, *Artemia salina* akan juga dijalankan.

## **BAB 2**

### **KAJIAN PERPUSTAKAAN**

#### **2.1 Pendahuluan**

Piperaceae ataupun lebih dikenali sebagai famili lada, merupakan famili terbesar di kawasan tropika (Chauret *et al.*, 1996). Famili Piperaceae merupakan tumbuhan aromatik dan bersifat aromatik (Kirtikar *et al.*, 1993). Terdapat lebih kurang 700 spesies *Piper* tertabur di seluruh dunia terutama di kawasan tropika dan subtropika (Parmar *et al.*, 1997). Selepas sebatian piperina dapat dipisahkan daripada *Piper nigrum*, ramai penyelidik telah menjalankan kajian ke atas famili Piperaceae bagi mendapatkan sebatian aktif biologi yang baru. Sebatian-sebatian yang telah dipisahkan daripada spesies *Piper* India dan spesies *Piper* yang lain telah dikaji sebelum ini tetapi menurut kajian yang terbaru lebih kurang hanya 28 spesies baru yang telah dipisahkan (Jensen *et al.*, 1993).

#### **2.2 Kepentingan *Piper* spp. dalam Perubatan**

Banyak spesies *Piper* digunakan dalam perubatan tradisional khususnya di Asia. *Piper* spp. kerap digunakan untuk mengatasi masalah penghadaman, jangkitan alat kelamin, sakit biasa seperti sakit gigi, untuk meredakan batuk dan untuk lain-lain (Parmar *et al.*, 1998).

*Piper betle* ataupun lebih dikenali sebagai 'sirih' digunakan sebagai antiseptik bagi menyembuhkan sakit perut dan batuk (Ahmad & Raji, 1993). *Piper betle* ditanam secara meluas di India, Sri Lanka dan Burma (Sarkar *et al.*, 2000). Daun sirih mempunyai bau yang tajam dan rasa yang beraroma serta digunakan secara meluas di Asia. Daunnya dipercayai mempunyai berbagai sebatian aktif biologi yang membolehkannya digunakan untuk mengubati pelbagai penyakit. Secara perubatan, daunnya amat berguna untuk mengubati penyakit hidung dan paru-paru. Daun sirih juga digunakan untuk mengelakkan penyakit cirit-birit dan demam kerana mempunyai potensi anti-bakteria (Dasgupta dan Bratati De, 2004).

*Piper methysticum* pula dikenali dengan nama kava-kava (Duke, 1985). Kava adalah merujuk kepada stok akar pokok *Piper methysticum*. Masyarakat asli dipercayai ia boleh menenangkan minda dan badan, melegakan sakit dan merangsang tidur yang sempurna. Kava yang dimakan secara mengunyah dan yang disediakan dengan cara penapaian dipercayai dapat melalukan seseorang bila diminum. Berbeza dengan alkohol, ia tidak melemahkan mental (Duke, 1985). Bahan aktif dalam *Piper methysticum* seperti kavalakton mempunyai ciri-ciri diuretik, kesan mengantuk, anti penyakit gila babi, analgesik, ubat pelali, anti-bakteria dan anti-mikotik (Lebot dan Levesque, 1996).

*Piper nigrum* atau lebih dikenali sebagai lada hitam mempunyai kegunaan yang meluas sama ada sebagai perisa makanan ataupun dalam bidang perubatan tradisional (Duke, 1985). *Piper nigrum* digunakan dalam perubatan bagi merawat kolera, dispepsia, senak perut, cirit-birit dan pelbagai sakit gastrik yang ringan dan juga untuk lumpuh dan penyakit sendi (Siddiqui *et al.*, 1997; Martins *et al.*, 1998). Di China, lada hitam digunakan sebagai perangsang manakala

wanita Melayu biasanya menggunakan lada hitam dalam menangani masalah keguguran (Kirtikar *et al.*, 1993). Akar dalam bentuk serbuk, minyak sapi, minyak sapu dan enema boleh digunakan bagi mengatasi masalah abdomen (Duke, 1985).

*Piper stylosum* dengan nama tempatan sebagai ‘Kadok Hutan’ adalah pokok herba yang hidup menjalar dengan batang tua berwarna kehijauan dan ditemui di Semenanjung Malaysia, Sumatra dan Borneo. Pokok ini mempunyai daun yang berbentuk hati dengan bunga serta buah yang kecil saiznya. Perempuan menggunakan akar pokok *Piper stylosum* untuk merawat sakit selepas bersalin dan semasa dalam pantang (Burkill, 1966). Selain dari itu ia juga digunakan untuk merawat malaria, batuk, selsema, sakit gigi, sakit sendi, untuk merawat tekanan darah tinggi dan masalah kencing (Mat-Salleh dan Latiff, 2002).

*Piper cubeba* dengan nama tempatannya ‘kemukus’ di kalangan masyarakat Melayu selalu digunakan sebagai tonik untuk wanita selepas bersalin. Tumbuhan ini kaya dengan alkaloid dan telah digunakan dalam perubatan tradisional sejak dahulu lagi (Ahmad dan Raji, 1993). Buah *Piper cubeba* menunjukkan aktiviti anti-radang (Choi dan Hwang, 2003).

*Piper sarmentosum* merupakan pokok herba yang menjalar di atas tanah dan mempunyai daun yang nipis dan berwarna hijau tua (Kirtikar *et al.*, 1993). *Piper sarmentosum* digunakan merawat masalah penghadaman, sakit gigi, asma dan batuk (Burkill, 1966).

### 2.3 Kajian Fitokimia ke atas *Piper* spp.

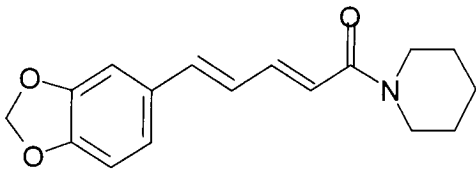
Kajian fitokimia terhadap *Piper* spp. dari seluruh dunia telah membawa kepada pemisahan berbagai sebatian aktif seperti alkaloid, profenilfenol, lignan, neolignan, terpena, steroid, kawapiron, piperolina, kalkon, dihidrokalkon, flavon dan flavonon (Terreaux *et al.*, 1998).

Piperina (1) merupakan amida pertama yang telah dipisahkan dari *Piper* spesies (Tunmann, 1918). Sebatian amida, *N*-isobutil amida iaitu asid oktadeka-trans-2-cis-4-dienoik dan piperina telah dipisahkan dari buah *Piper nigrum*. Sebatian seperti amida terutamanya piperisina (2) dan piperina (1) telah dipisahkan dari *Piper nigrum* (Siddiqui *et al.*, 1997). Kajian ke atas *Piper hispidum* dan *Piper tuberculatum* telah membawa kepada pemisahan pirolidina, dihidropiridon dan piperidina dengan ciri-ciri racun serangga (Miyakado *et al.*, 1989; Parmar *et al.*, 1997).

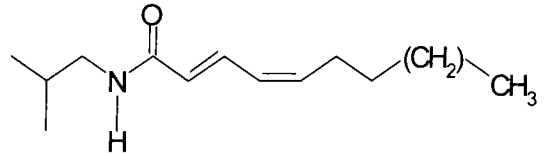
Sebatian amida seperti (3*Z*,5*Z*)-*N*-isobutil-8-(3',4'-metilenadioksifenil)-heptadiamida (3), *N*-[3-(6'-metoksi-3',4'-metilenadioksifenil)-2(*Z*) propenol]pirolidina (4) dan piperamina (5) telah dipisahkan dari batang *Piper hispidum* manakala 8(*Z*)-*N*-(12,13,14-trimetoksisinamoil)- $\Delta^3$ -piridin-2-ona (6), *N*-(12,13,14-trimetoksisinamoil)- $\Delta^3$ -piridin-2-ona (7), piplartina (8), 2,  $\Delta^{\alpha,\beta}$ -dihidropiperina (9), 5,6-dihidropiperlonguminina (10) dan pellitorina (11) telah dipisahkan dari biji *Piper tuberculatum* (Navickiene *et al.*, 2000). Semua sebatian amida ini aktif terhadap kulat *Cladosporium sphaerospermum* (Homan dan Fuchs, 1970). Tiga terbitan asid sinamik telah dipisahkan dari daun *Piper tuberculatum*. Ketiga-tiga sebatian itu ialah piplaroksida (12), piplartina (8) dan demetoksipiplartina (13). Sebatian piplaroksida dan



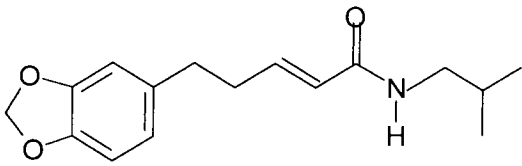
demetoksipilartina mempunyai aktiviti biologi yang amat berguna dalam ujian ketoksikan menggunakan semut *Atta cephalotes* (Capron dan Wiemer, 1996).



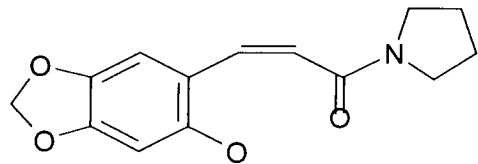
(1)



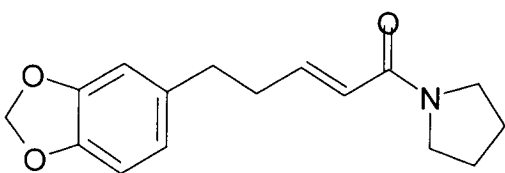
(2)



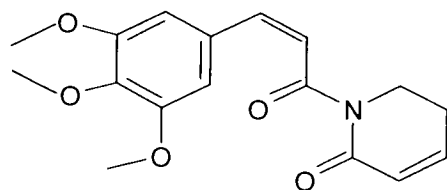
(3)



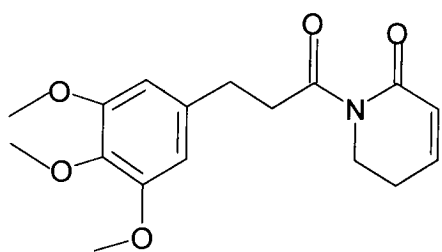
(4)



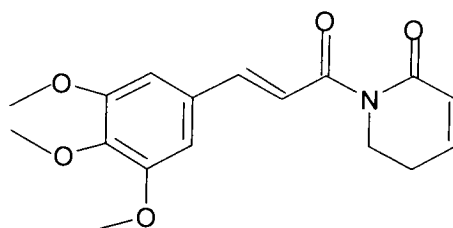
(5)



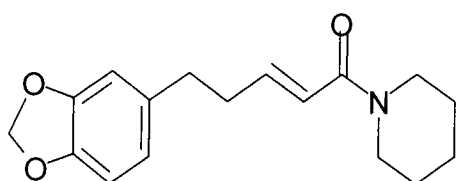
(6)



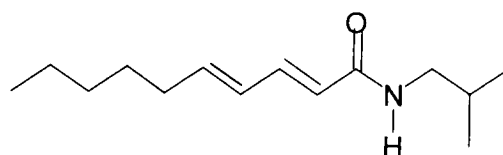
(7)



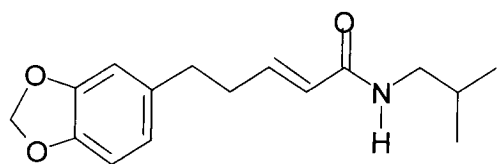
(8)



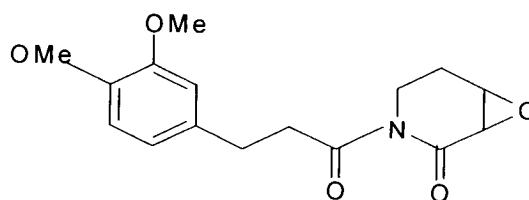
(9)



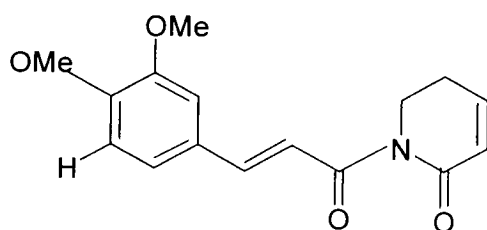
(10)



(11)



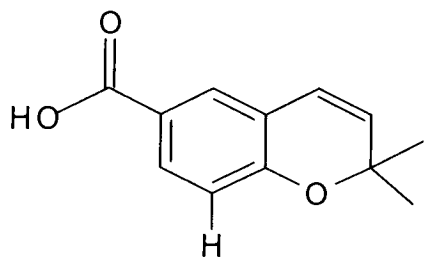
(12)



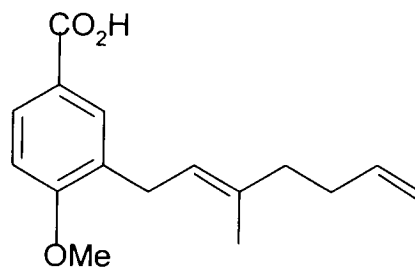
(13)

*Piper aduncum* dikatakan penawar untuk merawat sakit perut dan sakit kelamin (Duke, 1985) kerana kehadiran terbitan asid benzoik, kromen dan flavonoid bersifat sitotoksik dan menunjukkan anti bakteria (Asprey dan Thorton, 1954; Burke dan Nair, 1986; Orjala *et al.*, 1993). Sebatian seperti 2,2-dimetil-2*H*-1-kromena-6-asid karboksilik (**14**) dan asid benzoik iaitu 3-(3'7'-dimetil-2',6'-oktadienil)-4-metoksi-asid benzoik (**15**) telah dipisahkan dari *Piper aduncum* (Baldoqui *et al.*, 1999).

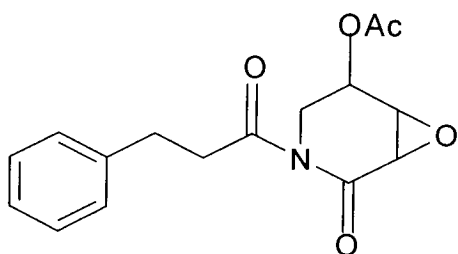
Dua alkaloid piperidina yang baru iaitu 3 $\alpha$ , 4 $\alpha$  -epoksi-5 $\beta$ -pipermethystina (**16**) dan awaina (**17**) telah dipisahkan dan dicirikan dari batang dan daun muda yang terdapat dalam *Piper methsticum* selain daripada sebatian pipermethystina (**18**) dan dihidropiridon (**19**) (Dragull *et al.*, 2003).



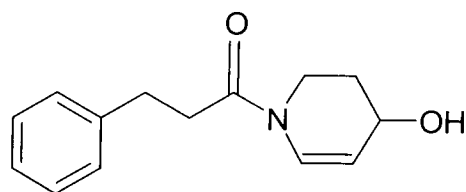
(14)



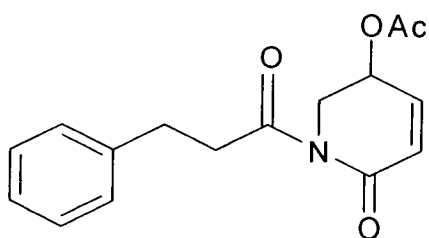
(15)



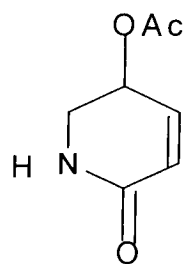
(16)



(17)



(18)



(19)

## **BAB 3**

### **BAHAN DAN KAEDAH**

#### **3.1 Bahan tumbuhan**

Sampel *Piper umbellatum* telah diambil di sekitar Jalan Tabuan. Sampel yang telah dikeringkan di udara telah dikisar ke bentuk serbuk.

#### **3.2 Umum**

Sampel telah dikisar dengan menggunakan mesin pengisar General Electric (Model 5KH39 QN5525). Pemfraksian pada kromatografi turus (CC) telah menggunakan gel silika (Merck, 230-400 mesh). Bagi kromatografi lapisan nipis (KLN), gel silika (Merck, 60 F<sub>254</sub>, 0.25 mm) telah digunakan manakala untuk kromatografi lapisan nipis penyediaan (KLNP), gel silika (Merck, gel silika 60 F<sub>254</sub>, 1.00 mm) telah digunakan. Cahaya ultra lembayung (Alat Ultra Lembayung Model UV-11) digunakan untuk melihat bintik pada plat KLN. Bahan ekstrak telah dipekatkan menggunakan Rotavapor (Buchi, Model R-200). Spektrum infra merah telah direkodkan dengan Shimadzu FTIR-8201Pc spektrometer sebagai palet KBr.

### 3.3 Pengekstrakan, pemisahan dan penulenan

Lebih kurang 1.20 kg batang *Piper umbellatum* yang telah dikeringkan, dihancurkan dan diekstrak dengan menggunakan heksana pada suhu bilik selama tiga hari. Hasil dituras dengan menggunakan penuras graviti. Residu diekstrak dua kali lagi dengan pelarut yang sama. Hasil turasan digabungkan dan dipekatkan menggunakan rotavapor.

Pengekstrakan diulang dengan menggunakan pelarut yang berlainan kepolarannya seperti etil asetat dan etanol. Pengekstrakan menggunakan etil asetat diulang menggunakan kaedah yang sama sebanyak dua kali manakala pengekstrakan menggunakan etanol diulang sebanyak satu kali. Ekstrak dipekatkan sehingga kering, ditimbang dan peratus hasil ditentukan.

Ketiga-tiga ekstrak kasar yang telah diperolehi tadi diuji dengan ujian KLN menggunakan plat KLN (silika gel). Sampel dititiskan pada plat menggunakan rod kapilari. Apabila bintik pada plat telah kering, plat dipindahkan ke dalam tangki kromatografi dan dikembangkan dengan menggunakan pelarut yang sesuai. Faktor perencatan,  $R_f$  setiap titik ditentukan (Houghton dan Raman, 1998).

Ujian KLN menggunakan ekstrak kasar heksana, etil asetat dan ekstrak kasar etanol adalah untuk mencirikan atau memisahkan bilangan sebatian kimia yang hadir dalam setiap ekstrak kasar tersebut. Nisbah pelarut (4:1) bagi heksana-etil asetat memberi pemisahan yang paling baik untuk ekstrak kasar heksana di mana lapan bintik diperolehi manakala bagi ekstrak kasar etil asetat sistem pelarut heksana-etil asetat dengan nisbah (5:3) memberikan pemisahan yang paling baik dengan memberikan lima bintik. Bagi ekstrak kasar etanol pula nisbah pelarut

(7:3) dengan sistem pelarut heksana-aseton memberikan pemisahan yang paling baik di mana sebanyak tujuh bintik diperolehi. Bintik pada kromatogram dicerap di bawah cahaya ultra lembayung atau menggunakan reagen semburan dengan 5% sulfurik asid dalam metanol.

Ekstrak kasar etil asetat kemudian dipisahkan dengan menggunakan turus kromatografi. Nisbah pelarut yang digunakan bagi memisahkan ekstrak adalah mengikut kepolaran iaitu dari yang kurang polar kepada yang lebih polar. Turus bersaiz 60 cm panjang dan 3.0 cm diameter telah digunakan. Pertama sekali turus diperiksa dari dua arah untuk memastikan ia betul-betul tegak dan berada dalam keadaan baik. Turus dicuci dengan menggunakan aseton untuk memastikan ia bersih. Kemudian dengan menggunakan rod kaca, kapas telah dimasukkan ke dalam turus untuk mengelakkan silika gel dari terkeluar dari turus. Lebih kurang 350 mL heksana digunakan untuk mencampurkan silika gel. Kemudian silika gel yang telah dicampurkan, dimasukkan ke dalam turus sehingga  $\frac{3}{4}$  daripada panjang turus.

Lebih kurang 5.0 g sampel ditambah ke dalam turus dan dielusikan dengan pelarut mengikut pertambahan kepolaran iaitu daripada pelarut yang kurang polar kepada pelarut yang lebih polar. Lebih kurang 20 mL eluen dikumpul bagi setiap fraksi. Fraksi-fraksi ini diuji dengan KLN. Fraksi yang mempunyai kromatogram yang sama (nilai  $R_f$  yang sama) pada plat KLN digabungkan dan dipekatkan. Berat kering ditentukan.

KLNP telah menggunakan plat silika gel yang bersaiz 20 cm x 20 cm (0.25 mm) bagi tujuan penulenan gabungan fraksi. Fraksi EA07, EA08 dan EA10 telah dipilih untuk ujian ini kerana memberikan pemisahan yang paling baik berbanding fraksi-fraksi yang lain. Nisbah pelarut

yang digunakan adalah nisbah pelarut yang memberikan pemisahan yang baik semasa ujian KLN terhadap fraksi-fraksi yang diperolehi dari kromatografi turus. Setelah dielusikan, jalur yang terhasil pada plat KLNP dikikis dan dilarutkan dalam pelarut yang digunakan untuk KLNP tadi. Semua sampel dituras dan dikeringkan serta berat kering ditentukan. Kemudian sampel diuji lagi dengan KLN untuk memastikan ketulenannya.

### **3.4 Pengecaman sebatian**

Ketulenan sampel yang dipisahkan telah ditentukan secara GC/FID. Suhu awal untuk GC/FID ialah 50°C. Sebelum sampel disuntik, diklorometana (DCM) disuntik ke dalam turus kapilari untuk membersihkan turus. Sampel dari fraksi EA07, EA08 dan EA10 telah dipilih bagi kaedah ini. Ini kerana ketiga-tiga fraksi ini memberikan pemisahan yang paling baik semasa ujian KLN dan KLNP. Sampel telah dilarutkan dalam 50 µL heksana dan 1 µL sampel disuntik ke dalam GC/FID.

### **3.5 Penentuan kumpulan berfungsi**

Kumpulan berfungsi telah ditentukan menggunakan kaedah FTIR. Lebih kurang 1.0 mg sampel digaul dengan 100.0 mg kalium bromida (KBr). Campuran dimampat ke bentuk tablet dengan ketebalan 1 mm tebal. Spektrum FTIR bagi sampel telah direkod dalam julat 400 cm<sup>-1</sup> – 4000 cm<sup>-1</sup>.