

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

3.1.1. Tempat Penelitian

Ekstraksi bahan uji sampai diperoleh kristal dan alkaloid dilakukan di Laboratorium Kimia Organik, Jurusan Kimia, FMIPA UNDIP Semarang. Analisa dengan spektrofotometri UV dan IR dilakukan di Laboratorium Kimia Organik, FMIPA UGM Yogyakarta, sedangkan analisa dengan Spektroskopi Massa dilakukan di Pusat Aplikasi Isotop dan Radiasi BATAN, Pasar Jum'at Jakarta. Uji aktivitas dengan metode *Brine Shrimp Lethality* dilakukan di Laboratorium fitokimia, Jurusan Farmasi ITB dan Pusat Antar Universitas (PAU) ITB Bandung.

3.1.2. Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Juni-November 1998

3.2. Bahan dan Alat

3.2.1. Bahan

Daun paitan diperoleh dari Bukit Gombel Semarang, pada bulan April 1998. Bahan-bahan yang diperlukan untuk penelitian adalah bahan yang bersifat p.a. maupun teknis, seperti metanol, n-heksan, eter, kloroform, asam sitrat, amonium

hidroksida dan magnesium sulfat. Plat KLT adalah silika gel GF₂₅₄ dari E-Merck Darmstat.

3.2.2. Alat

Peralatan gelas yang dipakai adalah gelas beker, pipet tetes, erlenmeyer, spatula, pengaduk, corong pisah, dan perkolator. Digunakan pula *rotary evaporator* Buchi Swiitlerland, *melting point* Fisher John, UV-Vis Milton Roy Spectronic 3000, IR SHIMADZU FTIR-8021 PC, MS Finnigan Mat type/seri GCQ dan lampu UV Spectroline.

3.3. Cara Kerja

3.3.1. Persiapan Sampel

Daun yang dipetik adalah daun yang masih segar dan bagus, daun tersebut diiris kecil-kecil lalu dikeringkan dengan cara diangin-anginkan selama tujuh hari.

3.3.2. Ekstraksi Sampel

Daun paitan yang sudah kering sebanyak 1 kg, diekstraksi dengan pelarut n-heksan teknis menggunakan cara perkolasi sehingga diperoleh filtrat dan residu. Residu tersebut dikeringanginkan dan setelah kering diekstrak dengan metanol menggunakan cara yang sama. Filtrat yang didapat digabung lalu diuapkan dengan *rotary evaporator* sehingga didapat ekstrak kasar, kemudian ekstrak metanol ini dianalisa secara kualitatif dengan uji golongan. Dari ekstrak kasar diperoleh kristal berbentuk jarum yang berwarna putih. Terhadap kristal ini dilakukan pula uji

golongan, penentuan titik leleh dan struktur molekulnya dengan metode UV, IR dan Spektroskopi Massa. Uji aktivitas terhadap kristal dilakukan dengan *Brine Shrimp Lethality Test*.

3.3.3. Pemeriksaan Kualitatif Kandungan Senyawa Metabolit Sekunder

Terhadap ekstrak metanol dan kristal hasil isolasi dilakukan skrining fitokimia sebagai berikut :

a. Pemeriksaan Adanya Saponin

Sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambah aquadest. Fraksi tersebut dididihkan selama 2-3 menit lalu didinginkan. Selanjutnya sampel dikocok kuat-kuat. Apabila timbul busa yang stabil selama tidak kurang dari 10 menit, maka menunjukkan adanya senyawa saponin.¹⁾

b. Pemeriksaan Adanya Fenol

Sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambah aquadest, lalu dipanaskan sampai mendidih. Air rebusan dipipet dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang lain kemudian ditambahkan FeCl_3 1%. Adanya senyawa fenol ditandai dengan terjadinya warna dari hijau sampai hitam.¹⁾

c. Pemeriksaan Adanya Alkaloid

Sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan pereaksi Mayer. Terbentuknya endapan putih menunjukkan adanya alkaloid.¹⁾

Pereaksi Mayer dapat dibuat dengan cara mencampur 1,36 g HgCl_2 dalam erlenmeyer 100 ml dengan larutan KI 5 g dalam 10 ml aquadest yang kemudian diencerkan sampai volumenya menjadi 100 ml. Pereaksi ini harus disimpan dalam botol berwarna gelap.¹⁾

d. Pemeriksaan Adanya Minyak Atsiri

Adanya minyak atsiri dari ekstrak metanol daun paitan dilakukan dengan cara mengambil jaringan daun, kemudian diremas dan dideteksi dari bau yang dihasilkan.¹⁾

e. Pemeriksaan Adanya Triterpenoid dan Steroid

Sampel dilarutkan dalam metanol kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi, setelah itu diambil 10 tetes dan ditempatkan dalam plat tetes. Dibiarkan sampai kering, setelah itu ditambah 5 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes asam sulfat pekat. Adanya triterpenoid ditandai dengan warna merah-ungu, sedangkan warna biru menunjukkan adanya steroid.¹⁾

3.3.4. Proses Isolasi Alkaloid

Untuk mengisolasi alkaloid, terhadap ekstrak kasar ditambahkan asam sitrat 5% sampai pH = 3-4 lalu disaring, larutan asam yang didapat kemudian diekstraksi dengan eter sehingga dapat dipisahkan antara fraksi non alkaloid (larut dalam eter) dan fraksi alkaloid pada lapisan asam. Lapisan asam ditambah amonium hidroksida sampai pH = 8-9 dan diekstrak dengan kloroform. Lapisan kloroform

yang didapat dicuci dengan aquadest kemudian dikeringkan dengan $MgSO_4$ anhidrat, lalu disaring dan diuapkan dengan *rotary evaporator*. Hasil yang didapat berupa residu alkaloid total. Residu ini diuji secara kualitatif dengan kromatografi lapis tipis dan uji aktivitas dengan metode *Brine Shrimp Lethality*.

3.3.5. Identifikasi Senyawa Hasil Isolasi

Terhadap kristal hasil isolasi (hasil 3.3.2) dan alkaloid total (hasil 3.3.4) dilakukan beberapa uji sebagai berikut :

a. Uji Titik Leleh

Uji ini hanya dilakukan terhadap kristal hasil isolasi.

b. Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Sampel dilarutkan dalam pelarut kemudian ditotolkan pada lempeng KLT berfasa diam silika gel GF₂₅₄ dengan eluen n-heksan, metanol, kloroform, eter, etil asetat dan gabungan beberapa eluen tersebut. Noda akan dielus dengan fasa geraknya dan bercak yang dihasilkan dapat dilihat di bawah lampu UV.

c. Analisa Spektrometri

Kristal hasil isolasi dianalisa dengan UV, IR dan Spektroskopi Massa.

Analisa UV : sampel dilarutkan dalam metanol kemudian dianalisa dengan spektrofotometer UV.

Analisa IR : 0,5 mg sampel ditambah 100 mg KBr, kemudian dibuat pellet dengan menggunakan alat "mini press". Pellet tersebut dianalisa dengan FTIR.

Analisa MS : sampel dilarutkan dalam DMSO kemudian dianalisa dengan spektroskopi Massa

d. Uji Bioassay

Adapun tahapan uji *bioassay* adalah sebagai berikut :

1. Pembuatan medium

3,8 g NaCl dilarutkan dalam 100 ml aquadest kemudian disaring.

2. Penetasan telur

Medium yang sudah disiapkan ditempatkan dalam tangki kecil (tangki penetas). Kemudian telur *Artemia salina* dimasukkan selama 24 jam sampai telur-telur tersebut menetas.

3. Pembuatan variasi konsentrasi

2 mg sampel dilarutkan dalam metanol, kemudian dibuat dalam konsentrasi 1000 ppm, 100ppm dan 10 ppm.

4. Penentuan L_{D50} dengan *Bliss Methode*

100 μ L masing-masing larutan di atas (3), ditempatkan dalam mikroplate, kemudian diberi 10-30 ekor *Artemia salina* dan setelah 24 jam diamati jumlah *Artemia salina* yang hidup dan mati. Perlakuan yang sama dilakukan juga terhadap kontrol. Data yang diperoleh diolah dengan program basil untuk menentukan L_{D50} .²⁹⁾