

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

Penelitian ini, yang pada prinsipnya memiliki tujuan eksplorasi senyawa bahan alam dari tanaman pare, dilakukan di enam laboratorium yaitu :

1. Identifikasi taksonomi tumbuhan di Laboratorium Taksonomi, Jurusan Biologi, F-MIPA UNDIP Semarang.
2. Isolasi senyawa bioaktif di Laboratorium Kimia Organik, Jurusan Kimia, F-MIPA UNDIP Semarang.
3. Analisa dengan spektrofotometer ultraviolet di Laboratorium Kimia Instrumen, Jurusan Kimia, F-MIPA UGM Yogyakarta.
4. Analisa dengan spektrometer massa di Laboratorium BATAN, Jakarta.
5. Analisa dengan spektrometer inframerah di Laboratorium Kimia Instrumen, Jurusan Kimia, F-MIPA UNDIP Semarang.
6. Uji aktivitas di Laboratorium Phytokimia, Jurusan Farmasi ITB Bandung dan PAU (IUC : Inter University Centre) Ilmu Hayati ITB Bandung.

3.1. Sampel, Bahan dan Alat

3.1.1. Sampel

Buah pare hutan (*Momordica charantia*, Linn) diambil dari hutan di daerah Meteseh Bukit Kencana, Semarang.

3.1.2. Bahan

Semua pelarut yang digunakan, seperti metanol, *n*-heksan, kloroform, dan petroleum benzen memiliki tingkat kemurnian p.a (pro analisis), kecuali bila disebutkan lain. Plat KLT (Kromatografi Lapis Tipis) dengan silika gel GF 254 dari E-Merck Darmstat.

3.1.3. Alat

Peralatan gelas yang digunakan adalah peralatan yang biasa digunakan di laboratorium antara lain gelas ukur, gelas arloji, gelas beker, corong gelas, pengaduk, spatula, pipet tetes, erlenmeyer dan alat perkolasi. Selain peralatan gelas digunakan juga “rotary evaporator” Buchi Switserland, “melting point” Fisher John, lampu UV dengan spesifikasi “Long Wave” (286 nm) dan “Short Wave” (254 nm), spektrofotometer UV tipe Sescoman S.1000 dan Milton Roy Spectronic 3000 ARRAY, spektrometer IR tipe Beckmam.

3.2. Cara Kerja

3.2.1. Identifikasi dan Penanganan Tanaman Target

Identifikasi tanaman target yang akan dijadikan sampel dalam penelitian ini dilakukan di laboratorium taksonomi jurusan Biologi F-MIPA UNDIP, Semarang. Dengan membandingkan sampel dengan referensi yang ada dapat disimpulkan bahwa tanaman target tersebut adalah *Momordica charantia*, Linn (pare hutan).

Buah pare hutan, yang telah dipisahkan dari batang, bunga, biji dan daunnya, dikering-anginkan selama 7 hari dan dihaluskan dengan cara ditumbuk sampai berbentuk serbuk.

3.2.2. Pembuatan Ekstrak dari Buah *Momordica charantia*, Linn

Serbuk buah tanaman *Momordica charantia*, Linn (217 gram) diekstraksi dengan cara perkolasi-maserasi menggunakan pelarut metanol. Hasil ekstraksi dipekatan dengan “rotary evaporator”, hingga menghasilkan ekstrak kasar berupa gel yang berwarna hijau kehitaman seberat 25,8 gram.

3.2.3. Pemeriksaan Golongan Senyawa Terhadap Crude Ekstrak Metanol

a) Pengujian Adanya Triterpenoid dan Steroid

Sampel crude ekstrak metanol dilarutkan dengan kloroform. Larutan diambil 10 tetes dan ditempatkan dalam plat tetes. Dibiarkan sampai kering setelah itu ditambahkan 5 tetes asam asetat anhidrida dan 1 tetes asam sulfat pekat. Adanya triterpenoid menunjukkan perubahan warna merah-ungu sedangkan adanya steroid menunjukkan adanya perubahan warna biru.

b) Pengujian Adanya Alkaloid

Sampel dari crude ekstrak metanol dimasukkan dalam tabung reaksi, ditambahkan asam sulfat dengan konsentrasi 2 N sebanyak 10 tetes. Kemudian kocok dengan teratur. Larutan bagian atas yang terdiri dari asam sulfat dan alkaloid dipipet dan dimasukkan pereaksi meyer. Adanya alkaloid ditandai dengan terbentuknya endapan putih pada penambahan pereaksi meyer.

c) Pengujian Adanya Saponin

Sampel crude ekstrak metanol dimasukkan dalam tabung reaksi ditambah air hingga seluruh sampel terendam. Kemudian dididihkan selama 2-3 menit dan didinginkan. Setelah dingin dikocok kuat-kuat. Adanya buih yang stabil selama 30 menit setelah pengocokan menunjukkan adanya saponin.

d) Pengujian Adanya Fenol

Sampel crude ekstrak metanol ditambahkan air suling, dipanaskan hingga mendidih dan air rebusan dipipet, dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 1% FeCl_3 . Ke dalam tabung reaksi kemudian diamati adanya perubahan warna dari hijau sampai hitam menunjukkan adanya senyawa fenol.

3.2.3. Isolasi dan Pemurnian Kandungan Ekstrak

Sebelum dilakukan isolasi terlebih dahulu dilakukan pemeriksaan awal dengan KLT, sehingga dapat diidentifikasi banyaknya jenis senyawa yang terkandung dalam crude ekstrak metanol.

Isolasi dilakukan dengan metode ekstraksi cair-cair. Ekstrak kasar dari fraksi metanol diekstraksi cair-cair dengan pelarut *n*-heksan. Bagian *n*-heksan hasil ekstraksi cair-cair dipisahkan dengan “rotary evaporator” hingga diperoleh crude ekstrak yang berbentuk gel berwarna hijau kehitaman (0,48 gram). Dari 0,48 gram crude ekstrak, kemudian ditambahkan 10 mL petroleum benzen serta dipisahkan antara lapisan lemak dan endapan kuning tua yang terbentuk.

Selanjutnya endapan kuning tua yang dihasilkan dicuci beberapa kali dengan pelarut *n*-heksan sehingga diperoleh endapan putih. Endapan putih ini

selanjutnya dikristalisasi dengan menggunakan pelarut *n*-heksan dan selanjutnya direkristalisasi dengan pelarut kloroform kemudian dengan pelarut *n*-heksan. Dari hasil rekristalisasi diperoleh kristal murni sebanyak 0,45 gram. Kristal murni yang dihasilkan di analisa menggunakan spektrometri ultraviolet, infra merah dan spektrometri massa. Uji aktivitas dilakukan dengan metode *Brine Shrimp Lethality*.

3.2.3. Uji Aktivitas

- a) ***Pembuatan media larutan NaCl***. Natrium klorida (3,8 gram) dilarutkan dalam 100 mL aquadest dan disaring.
- b) ***Penetasan telur***. Air laut yang sudah disiapkan dimasukkan dalam tanki kecil (tanki penetas). Kemudian telur *Artemia salina* dimasukkan selama 24 jam sampai telur-telur tersebut menetas.
- c) ***Pembuatan variasi konsentrasi***. Kristal (2 mg) yang dihasilkan, dilarutkan dalam metanol. Selanjutnya larutan sampel dibuat dalam konsentrasi 500 ppm, 50 ppm, dan 5 ppm.
- d) ***Penentuan LD₅₀ Dengan "Bliss Methode"***. Masing-masing larutan yang disiapkan pada tahap c (100 μ L) ditempatkan dalam mikropate, kemudian diberi 10 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 *Bliss Method* untuk menentukan LD₅₀.