

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Tempat dan waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di tiga laboratoium yaitu :

1. Laboratorium Kimia Organik, Jurusan Kimia, F MIPA, Universitas Diponegoro Semarang.
2. Laboratorium Taksonomi, Jurusan Biologi, F MIPA, Universitas Diponegoro Semarang.
3. Laboratorium Fitokimia, Jurusan Farmasi, F MIPA, Institut Teknik Bandung.

Waktu Penelitian : Juli - Desember 1998

3.2 Bahan dan Alat

3.2.1 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain daun *C roseus var albus*, silika gel G₆₀, pelat silika GF₂₅₄, reagen Mayer. Pelarut heksan, metanol, asam sitrat 5%, eter, amonium hidroksida, kloroform, natrium hidroksida 5%, acetone, etanol, asam sulfat dan etil asetat.

3.2.2 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian adalah gelas piala, erlemeyer, gelas arloji, tabung reaksi, labu ukur, gelas ukur, corong kaca, corong pisah, pipet tetes, perkolator, *rotary evaporator*, kertas saring, kapas, kolom kromatografi, pH meter, pemanas listrik, timbangan elektrik, *drop plate*.

3.3 Metode Kerja

3.3.1 Isolasi Alkaloid dari Daun *Croceus var Albus*

3.3.1.1 Pembuatan Serbuk Daun

Daun *Catharanthus roseus var albus* yang dikumpulkan dari seputar Tembalang dan Mrican Semarang dicuci hingga bersih. Daun yang telah bersih tersebut selanjutnya diiris halus, dijemur di tempat teduh sampai kering, kemudian ditimbang sebanyak 500 gram.

3.3.1.2. Perkolasi dengan Heksan

Serbuk yang telah dikeringkan dimasukkan kedalam perkolator yang bagian dasarnya telah dilapisi kapas bebas lemak, kemudian direndam dengan pelarut heksan selama 6 x 24 jam. Perkolat diturunkan melalui kran perkolator, perkolasi dihentikan bila perkolat terakhir tidak berwarna. Ekstrak heksan digabung, selanjutnya pelarutnya diuapkan dengan menggunakan rotary evaporator hingga diperoleh cairan kental.^[22]

3.3.1.3 Perkolasi dengan Metanol

Terhadap serbuk yang bebas lemak dari perkolasi dengan heksan dan sudah dikeringkan tersebut, dilakukan perkolasi selanjutnya dengan menggunakan metanol. Perkolasi diulangi beberapa kali sampai perkolat terakhir memberikan hasil negatif terhadap reagen penguji alkaloid atau perkolat terakhir tidak berwarna. Selanjutnya perkolat digabung dan diuapkan pelarutnya dengan menggunakan rotary evaporator hingga diperoleh cairan kental. Kemudian ekstrak metanol dikeringkan.^[22]

3.3.2 Uji Golongan Senyawa Metabolit Sekunder dari Ekstrak Metanol

Ekstrak metanol dari daun *C roseus var albus* yang diperoleh di atas dilakukan uji golongan senyawa metabolit sekunder yang meliputi golongan :

1. Senyawa alkaloid

Ekstrak metanol dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan pereaksi Mayer . Terbentuknya endapan putih menunjukkan adanya alkaloid.

2. Senyawa fenol

Ekstrak metanol ditambah aquadest kemudian dididihkan, air rebusan dimasukkan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan larutan FeCl_3 1 %. Perubahan warna dari hijau sampai hitam, menunjukkan adanya senyawa golongan fenol.

3. Triterpen dan Steroid

Ekstrak sampel dalam kloroform ditempatkan dalam drop plate sebanyak 10 tetes kemudian dikeringkan. Ekstrak kering selanjutnya ditambahkan asam asetat anhidrat sebanyak 5 tetes dan diaduk. Campuran yang terjadi ditambah asam sulfat pekat 1 tetes, jika terjadi warna biru berarti mengandung steroid dan jika yang terjadi warna merah sampai ungu berarti mengandung triterpen.

4. Golongan Saponin

Ke dalam sedikit ekstrak metanol ditambahkan aquadest selanjutnya dididihkan selama 3 menit kemudian didinginkan. Jika dengan pengocokkan selama 15 menit terjadi busa yang stabil selama 10 menit berarti positif mengandung senyawa saponin.^[22,23]

Uji golongan minyak atsiri dilakukan terhadap daun basah atau segar dengan diremas-remas, jika memberikan bau yang khas berarti mengandung minyak atsiri.

3.3 Pemisahan Fraksi Alkaloid dan Non Alkaloid

Ekstrak metanol kering di atas, selanjutnya dimasukkan ke dalam gelas piala satu liter, sambil diaduk ditambahkan asam sitrat 5% hingga pH larutan mencapai pH 3-4. Penambahan larutan asam diulangi beberapa kali sampai larutan tersebut memberikan hasil negatif terhadap reagen penguji alkaloid. Lapisan asam yang diperoleh dimasukkan ke dalam corong pisah, dikocok dengan eter beberapa kali hingga fraksi eter yang terakhir tidak berwarna (fraksi non alkaloid).

Selanjutnya lapisan asam dibasakan dengan amonium hidroksida pekat hingga pH larutan mencapai pH 8-9. Lapisan basa yang diperoleh dikocok dengan kloroform berulang-ulang sampai lapisan kloroform yang terakhir memberikan hasil negatif terhadap reagen penguji alkaloid. Lapisan alkaloid yang diperoleh dicuci berkali-kali dengan air sampai air cucian terakhir bersifat netral. Lapisan kloroform tersebut dikeringkan dengan natrium sulfat anhidrat, disaring dan filtrat yang diperoleh diuapkan hingga diperoleh padatan yaitu alkaloid total.^[22,23]

3.4 Penentuan Pelarut untuk Kromatografi Kolom

Pada pemeriksaan KLT digunakan pelat dari jenis silika gel GF₂₅₄ dengan cara sebagai berikut : Sedikit ekstrak alkaloid total dilarutkan dalam metanol, kemudian dengan menggunakan pipa kapiler larutan sampel tersebut ditotolkan kurang lebih 0,5 cm dari bagian bawah pelat. Selanjutnya pelat tersebut dielusi dengan berbagai macam eluent guna menentukan pelarut yang cocok untuk kromatografi kolom.

3.5 Pemisahan Fraksi Alkaloid dengan Kolom Kromatografi

Ekstrak alkaloid total yang telah dicuci dengan heksan dilarutkan dalam kloroform kemudian ditambahkan silika gel sambil diaduk sampai terbentuk pasta dan

dikeringkan. Alkaloid dalam silika gel kemudian dimasukkan kedalam kolom yang telah disiapkan sebelumnya. Kolom dielusi dengan pelarut yang cocok dari hasil penentuan dengan menggugurkan KLT. Eluat yang keluar di tampung setiap 5 ml, kemudian tiap 5 fraksi atau dilihat dari perubahan warnanya diperiksa dengan KLT dengan cara mengamati noda di bawah penyinaran lampu ultra violet.

3.6 Uji Aktivitas dengan Metode Brine Shrimp Lethality

Bioassay dengan Brine Shrimp meliputi beberapa tahap, antara lain :

1. Pembuatan medium

Natrium klorida sebanyak 3,8 gram dilarutkan dalam 100 ml aquadest kemudian disaring.

2. Penetasan telur

Medium penetasan yang sudah disiapkan ditempatkan dalam tangki penetas kemudian diberi telur *Artemia salina* dan didiamkan selama 24 jam sampai telur-telur tersebut menetas.

3. Pembuatan variasi konsentrasi

Satu mg dari masing-masing senyawa alkaloid hasil isolasi dilarutkan dalam metanol. Kemudian dibuat konsentrasi 333 ; 66,7 ; 16,7 ppm. Sedangkan untuk ekstrak metanol daun *C roseus var albus* dan varitas *ocellatus* masing-masing dilarutkan dalam metanol dan dibuat konsentrasi 1000 ; 100 ; 10 ppm.

4. Penentuan LD₅₀

Dari masing-masing larutan sampel di atas (tahap 3) ditempatkan dalam mikroplate, kemudian diberi 8-15 *Artemia salina* dan setelah 24 jam diamati jumlah

Artemia salina yang hidup dan mati. Data yang diperoleh diolah dengan program Basil untuk menentukan L_{D50} .

