

BAB III METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Alat dan Bahan

3.1.1. Alat yang digunakan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut : wadah tumbuh bnur udang, lampu 10 watt, peralatan destilasi, *rotary evaporator* R-114, water bath B-480, Vakum system B-169, kerry pulsatron merk sonik(ultrasonifikasi), kromatografi kolom vakum cair berdiameter 3 cm dan tinggi 20 cm, kolom kromatografi cepat(*flash chromatography*) berdiameter 2 cm dan tinggi 30 cm, *Chamber*, alat pengukur titik leleh Fisher John, lampu UV merk camag, spektrofotometer IR, spektrofotometer UV-Visible, spektrofotometer NMR, dan peralatan lainnya yang sesuai prosedur kerja.

3.1.2. Bahan yang digunakan

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah herbal tumbuhan *Phyllanthus niruri* L. Bahan yang digunakan adalah air laut, bnur udang, pelarut teknis untuk proses isolasi dan pelarut analitis untuk analisis spektroskopi, silika gel 60 GF₂₅₄ , silika gel 40-60 µm(230-400 mesh), plat KLT GF₂₅₄ (Merck, 1.05554.0001, 60 F₂₅₄) dan reagen penampak noda anisaldehyd (0,5 mL anisaldehyd + 50 mL asam asetat glasial + 9 mL H₂SO₄ pekat).

3.2. Peryediaan sampel

3.2.1. Pengambilan sampel

Tumbuhan meniran atau yang lebih sering disebut orang dengan nama sidukung anak ini merupakan jenis tumbuhan rumput-rumputan. Hidup liar pada kondisi tanah yang lembab. Sidukung anak dimanfaatkan oleh masyarakat pada umumnya yaitu sebagai obat reumatik, pegal-pegal, sakit kuning, sariawan dan perkembangan terakhir dapat menghambat pertumbuhan sel kanker dan HIV. Pengambilan sampel dilakukan di daerah panam kecamatan tampan pekanbaru sesuai dengan observasi yang telah dilakukan. Dimana observasi /pencarian sampel ini dimulai tanggal 29 Febuari 2009 selama kurang lebih 3 hari.

3.2.2. Penangan sampel

Tumbuhan *Phyllanthus niruri* L(sidukung anak) segar yang sudah diambil dibersihkan dari pengotor seperti tanah yang menempel pada akar tumbuhan, rumput yang ikut tercabut dengan sidukung anak, setelah itu dikeringkan dengan cara dianginkan (tanpa terkena cahaya matahari langsung). Kemudian tumbuhan yang sudah kering dipotong kecil-kecil lalu diblender hingga halus. Selanjutnya dikeringkan sampai didapat berat yang konstan.

3.2.3. Uji fitokimia herbal tumbuhan *Phyllanthus niruri* L

Uji pendahuluan kandungan senyawa metabolit sekunder dilakukan terhadap herbal tumbuhan *Phyllanthus niruri* L. Uji ini sangat diperlukan untuk mengetahui senyawa apa saja yang terdapat pada herbal *Phyllanthus niruri* L, dimana senyawa yang termasuk kedalam metabolit sekunder yaitu Flavonoid, alkaloid, fenolik, terpenoid, steroid dan saponin

3.3. Metoda pemisahan dan kemurnian

3.3.1. Isolasi senyawa kimia dari herbal tumbuhan *Phyllanthus niruri* L

Sampel kering yang sudah halus dari tumbuhan *Phyllanthus niruri* L dimaserasi dengan pelarut metanol selama 3x24 jam. Lalu di ultrasonifikasi selama 1x30 menit. Kemudian disaring, maserat yang diperoleh ditampung dan pelarutnya diuapkan dengan alat *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental dari pelarut metanol. Metode ini dilakukan pengulangan sebanyak 5x dengan perlakuan yang sama. Kemudian ekstrak secara keseluruhan yang diperoleh ditimbang, maka diperoleh ekstrak total dari pelarut metanol.

3.3.2. Penentuan jumlah komponen dengan KLT

Untuk menentukan banyaknya komponen senyawa yang terdapat dalam suatu ekstrak atau sampel dapat diketahui dengan menggunakan kromatografi lapis tipis(KLT). Dimana KLT dilakukan dengan menggunakan perbandingan pelarut yang sesuai. Banyaknya jumlah komponen ditandai dengan banyaknya noda yang terpisah dengan baik pada plat KLT(Gritter *et al.*, 1991).

3.3.3. Pemisahan dengan kromatografi vakum cair

Untuk memisahkan senyawa-senyawa yang ada dalam masing-masing ekstrak dilakukan fraksinasi dengan menggunakan kromatografi kolom vakum cair. Kromatografi kolom vakum cair diisi dengan silika gel 60 GF₂₅₄ hingga mencapai ketinggian lebih kurang 5 cm. Pengisian kolom dilakukan dalam keadaan vakum, agar diperoleh kerapatan kemasan maksimum. Ekstrak yang akan difraksinasi dilakukan preadsorpsi dan dimasukkan ke dalam kolom. Selanjutnya dielusi secara bergradien menggunakan pelarut n-heksan, etilasetat, dan metanol. Hasil pemisahan ditampung dalam erlenmeyer yang telah diberi nomor.

3.3.4. Pemisahan senyawa dengan kolom

Untuk memisahkan senyawa komponen yang ada pada suatu ekstrak dapat dilakukan dengan fraksinasi menggunakan kromatografi kolom. Kolom kromatografi dibuat dengan cara membuat bubuk silika gel terlebih dahulu menggunakan pelarut n-heksan, diaduk rata dan kemudian dituangkan kedalam kromatografi secara perlahan-lahan. Perbandingan silika gel yang digunakan untuk kromatografi kolom dengan berat cuplikan yaitu (20:1) gram. Padatkan silika gel dengan menggunakan pelarut n-heksan beberapa kali pada kolom.

Sampel dipreadsorpsi sebelum dimasukan kedalam kolom, kemudian dielusi dengan pelarut dengan cara menaikkan tingkat kepolarannya yaitu dari pelarut n-hesan, etil asetat dan metanol. Hasil fraksinasi yang keluar ditampung dalam botol vial yang sudah diberi nomor.

3.3.5. Pengujian hasil pemisahan dengan KLT

Fraksi-fraksi hasil pemisahan kromatografi kolom vakum cair dan kromatografi kolom dilakukan uji KLT. Plat KLT diberi garis 1 cm di tepi atas dan bawahnya, lalu masing-masing fraksi ditotolkan pada plat yang telah diberi nomor sesuai dengan nomor vial kemudian dielusi dengan eluen yang sesuai sampai garis atas plat KLT, plat dikeluarkan dan dikeringkan. Untuk melihat noda yang dihasilkan dapat dilakukan dengan penyinaran lampu UV dan pereaksi penampak noda (Anisaldehyd). Selanjutnya ditentukan harga R_f dari masing-

masing noda. Vial-vial yang mempunyai harga Rf yang sama digabungkan menjadi satu fraksi untuk dilakukan pemisahan kembali.

3.3.6. Rekristalisasi dan karakterisasi

Jika dari hasil pemisahan didapatkan fraksi berupa kristal yang belum murni, maka dilakukan rekristalisasi untuk menghilangkan kotoran yang melekat pada padatan untuk menghasilkan kristal yang murni. Rekristalisasi dilakukan dengan melarutkan padatan dengan pelarut yang dapat melarutkannya dalam keadaan panas dan tidak larut dalam keadaan dingin. Padatan yang telah larut langsung disaring dan kemudian didinginkan sampai terbentuk kristal yang sempurna. Untuk menentukan kemurnian padatan atau kristal dapat ditentukan dengan menggunakan titik leleh Fisher John dan uji KLT, kemudian senyawa murni yang diperoleh dilakukan karakterisasi dengan spektroskopi IR, UV, dan NMR.

3.4. Uji toksisitas (*Brine shrimp lethality test*) ekstrak total

Kista udang *Artemia salina* L. ditetaskan dalam wadah pembiakan yang berisi air laut, dan digunakan setelah 48 jam setelah membentuk larva. Vial uji dikalibrasi sebanyak 5 ml. Pengujian dilakukan dengan konsentrasi 1000, 100, 10 $\mu\text{g/ml}$ dengan pengulangan masing-masing 3 kali. Sebanyak 20 mg ekstrak uji dilarutkan dalam 2 ml metanol maka didapat larutan induk ekstrak uji dengan konsentrasi 10000 $\mu\text{g/ml}$, kemudian larutan induk dipipet sebanyak 0,5 ml kedalam vial uji hingga nantinya didapat konsentrasi 1000 $\mu\text{g/ml}$ setelah penambahan air laut hingga 5 ml.

Pembuatan konsentrasi 100 $\mu\text{g/ml}$ dengan cara pengenceran larutan induk 10000 $\mu\text{g/ml}$ sebanyak 0.2 ml ditambahkan metanol 2 ml maka diperoleh larutan ekstrak uji 1000 $\mu\text{g/ml}$ kemudian dipipet 0,5 ml larutan ekstrak uji tersebut kedalam vial uji hingga didapat konsentrasi 100 $\mu\text{g/ml}$ setelah penambahan air laut hingga 5 ml. Dan untuk konsentrasi 10 $\mu\text{g/ml}$ dibuat dari larutan uji 100 $\mu\text{g/ml}$ dengan cara yang sama.

Masing-masing vial uji di uapkan pelarutnya. Larutkan kembali senyawa uji dengan 50 μl DMSO, selanjutnya tambahkan air laut hampir mencapai batas

kalibrasi. Masukkan larva udang pada masing-masing vial sebanyak 10 ekor. Tambahkan lagi air laut beberapa tetes hingga batas kalibrasi, kematian larva udang diamati setelah 24 jam. dari data yang dihasilkan dihitung LC_{50} .

Untuk kontrol, 50 μ l DMSO dipipet dengan pipet mikro kedalam vial uji tambahkan air laut hampir mencapai batas kalibrasi. Masukkan larva *Artemia salina* 10 ekor. Tambahkan lagi air laut beberapa tetes hingga batas kalibrasi. Uji toksisitas ini dilakukan pada hasil ekstrak total, VLC dan jika memungkinkan juga pada senyawa murni.

3.5. Analisis data toksisitas

Untuk menentukan LC_{50} data yang diperoleh diamati dengan menggunakan metode analisis probit dengan selang kepercayaan 95% dengan pembobotan menurut busvine(1960) yang terdiri dari beberapa langkah yaitu:

1. Penentuan konsentrasi bahan uji
2. Jumlah hewan uji; Tiap wadah diberikan 10 ekor hewan uji sehingga setiap konsentrasi perlakuan terdapat $10 \times 3 = 30$ ekor.
3. Menentukan persentase kematian; Pada masing-masing konsentrasi uji dihitung persentase uji yang mati.
4. Log konsentrasi(X); Sesudah ditentukan konsentrasi yang digunakan dalam uji toksisitas, perhitungan selanjutnya dalam bentuk log.

5. Probit empiris

Transformasi % kematian kepada nilai probit berdasarkan table transformasi probit.

6. Probit harap(Y)

Nilai kematian yang diharapkan sesuai dengan konsentrasi perlakuan. Dalam menentukan probit harapan ini dengan jalan menghubungkan % kematian dengan dosis bahan uji yaitu memplotkan angka % kematian yang diperoleh dari uji biologis dengan grafik yang diperoleh dari uji biologis dengan grafik yang tersedia yaitu probit mortality (dapat dilihat pada lampiran 9).

7. Probit kerja (y)

Digunakan untuk melihat daya kerja dari bahan uji.

$$y = y_0 + kp$$

Dimana: y = probit kerja
 k dan y_0 = faktor pembobotan (nilai k dan y_0 dapat dilihat pada lampiran 8)
 p = persentase kematian

Untuk perhitungan selanjutnya langkah-langkah dari 1-7 disusun dalam bentuk tabel.

Tabel .1. Analisis probit toksisitas terhadap hewan uji selama 24 jam.

Kosentrasi	Jumlah hewan uji	jumlah larva mati	% kematian	X	Prob.E mpiris	Y

Dengan persamaan regresiya adalah:

$$y = a + bx$$

Dimana: a = kostanta
 b = koefisien regresi
 y = 5 (kematian 50 % maka nilai probitnya 5)
 x = kosentrasi