BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. HASIL

4.1.1. Uji fitokimia herbal *Phyllanthus niruri* L

Pada uji fitokimia terhadap herbal phyllanthus niruri L memberikan hasil yang positif terhadap steroid, flavonoid dan fenolik dan memberikan hasil yang negatif terhadap alkaloid, terpenoid dan saponin. Untuk uji steroid(+) ditandai dengan adanya warna hijau setelah penambahan asam sulfat peket dan asam asetat anhidrat, uji flavonoid(+) ditandai dengan adanya endapan coklat kemerahan setelah adanya penambahan asam klorida pekat dan logam Mg, sedangkan uji fenolik(+) ditandai dengan adanya endapan warna hitam setelah penambahan besi(III) klorida.

4.1.2. Meserasi herbal *Phyllanthus niruri* L

Sebanyak 1,00 kg herbal *Phyllanthus niruri* L yang telah kering dan sudah dihaluskan dimeserasi dengan pelarut metanol hingga didapatkan ekstrak total metanol sebesar 106,183 gram. Meserasi ini hanya dilakukan sebanyak 5 kali pengulangan, dimana waktu yang dibutuhkan untuk meserasi setiap pengulangan adalah selama 3 hari. Kemudian ekstrak total di partisi dengan menggunakan pelarut heksan, kemudian dilanjutkan dengan pelarut diklorometan. Sehingga dihasilkan berat ekstrak total heksan sebesar 16,212 gram(15,26%), ekstrak diklorometan 17,414 gram(16,39%) dan ekstrak total metanol sebesar 49,577 gram(46,69%).

Tabel 2 : Hasil ekstraksi serbuk herbal *Phyllanthus niruri* L

No	Ekstrak	Berat Ekstrak(gr)	Rendemen(%)
1	Heksan	16,212	15,26
2	Dikloro metana	17,414	16,39
3	Metanol	49,577	46,69

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/

4.1.3. Pengujian ekstrak total dengan plat KLT

Ekstrak total yang memberikan aktifitas sitotoksik dilakukan pemeriksaan dengan kromatografi lapis tipis. Hal ini dilakukan untuk mengetahui jumlah komponen yang terdapat pada masing-masing ekstrak. Selain itu uji ekstrak total ini dilakukan untuk mengetahui eluen yang tepat untuk uji KLT terhadap hasil pemisahan dengan kromatografi vakum cair dan kolom. Hasil kromatogram uji KLT dapat dilihat pada lampiran 3.

4.1.4. Pemisahan dengan kromatografi vakum cair(VLC)

Ekstrak total dengan aktifitas sitotoksik terbaik dilakukan pemisahan, maka sebanyak 4 gr ekstrak diklorometan dipisahkan dengan menggunakan kromatografi vakum cair . Ukuran silika gel yang digunakan adalah silika gel 60 GF_{254}. Adapun perbandingan silika yang digunakan dengan ekstrak yang akan di VLC adalah 10:1. Pngelusian dilakukan dengan berbagai eluen yang memiliki kepolaran yang meningkat dari n-hesana 100%, perbandingan hexana-etilasetat hingga perbandingan etil asetat-metanol(5:5). Dari hasil pemisahan dengan kromatografi vakum cair diperoleh 8 fraksi.

4.1.5. Pengujian hasil VLC dengan KLT

Fraksi dari hasil VLC ekstrak diklorometan diuji menggunakan plat KLT dengan perbandingan eluen Heksan : Etil asetat (6:4). Hasil uji KLT dapat dilihat pada tabel 3 dan kromatogramnya pada lampiran 4.

Tabel 3 : Hasil uji KLT masing-masing Fraksi hasil VLC

Fraksi	Perbandingan Eluen	Harga Rf
Da	Heksan:etil asetat (4: 6)	0,9
Db	Heksan:etil asetat (2:8)	0,4 ; 0,58 ; 0,82
Dc	Etil asetat (100%)	0,14 ; 0,3 ; 0,44 ; 0,6
Dd	Etil asetat:methanol (9:1)	0,14 ; 0,3 ; 0,46 ; 0,6
De	Etil asetat:methanol (8:2)	-
Df	Etil asetat:methanol (7:3)	-
Dg	Etil asetat:methanol (6:4)	-
Dh	Etil asetat:methanol (5:5)	-

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/

4.1.6. Pemisahan dengan kromatografi kolom

Fraksi Db Hasil VLC dari ekstrak diklorometan dilakukan pemisahan kembali dengan kromatografi kolom, karena pada fraksi ini memberikan uji sitotoksik dan kromatogram KLT yang terbaik.. Pengelusian dilakukan dengan berbagai eluen yang memiliki kepolaran meningkat yaitu dari heksana 100%, Perbandingan heksan dengan etil asetat, etil asetat dengan metanol hingga 100% metanol. Dari hasil kromatografi kolom diperoleh 64 vial. Pelarut yang ada diupkan hingga kering lalu dilakukan uji dengan KLT.

4.1.7. Pengujian hasil kromatografi kolom dengan KLT

Pemisahan dengan kromatografi kolom pada fraksi Db didapatkan kristal dan padatan yang turun pada perbandingan eluen heksan : etilasetat (8:2 dan 7:3) yaitu pada vial dengan no 3 - 6 (kuning) dan 7 - 9 (kuning kecoklatan), 10 - 12 (padatan hijau). Sedangkan pada perbandingan eluen lain senyawa turun dalam bentuk padatan, namun padatan yang dihasilkan dalam jumlah sangat sedikit. Sehingga pengujian KLT dan isolasinya hanya dilakukan pada vial no 2-12. Hasil uji KLT dapat dilihat pada tabel 4 dan kromatogramnya pada lampiran 5.

Tabel 4 : Hasil uji KLT kromatografi kolom

Perbandingan eluen	No.Vial	Rf	Keterangan
8:2 (Heksan: Etil asetat)	3	2,78	Kristal kuning
	4	0,46 ; 0,6	Kristal kuning
	5	0,34 ; 0,44	Kristal kuning
	6	0,34 ; 0,44	Kristal kuning
7:3 (Heksan : Etil asetat)	7	0,36 ; 0,42	Kristal kuning kecoklatan
	8	0,52 ; 0,6	Kristal kuning kecoklatan
	9	0,48 ; 0,54 ; 0,6	Kristal kuning kecoklatan
	10	0,34 ; 0,4 ; 0,48	Kristal kuning kecoklatan
	11	0,32 ; 0,36	Padatan hijau
	12	0,22 ; 0,38	Padatan hijau

4.1.8. Rekristalisasi senyawa hasil kromatografi kolom

Rekristalisasi dilakukan pada vial no 9 dengan perbandingan eluen heksan : etilasetat (7:3) berupa padatan berbentuk kristal berwarna kuning kecoklatan

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/

karena padatan yang yang didapatkan pada vial ini cukup besar diantara vial-vial yang lainnya serta memberikan kromatogram yang terbaik.. Hasil dari rekristalisasi didapat senyawa dengan kode Db9 (50 mg) yang larut dengan pelarut klorofom, kemudian senyawa Db9 diuji KLT. Hasil kromatogram uji KLT dapat dilihat pada lampiran 6.

4.1.9. Pemisahan dengan KLT preparatif

Hasil rekristalisasi seyawa Db9 menunjukkan senyawa tersebut belum murni, hal ini ditandai dengan masih munculnya 2 noda pada kromatogram uji KLT senyawa Db9 pada kondisi pekat, sehingga untuk pemisahan senyawa Db9 (50 mg) dipisahkan dengan kromatografi preparatif dengan perbandingan eluen heksan : etilasetat (8:2). Pemisahan dengan KLT preparatif diperoleh 2 senyawa dengan kode Db9 dan $Db9_1$. Kemudian hasil yang didapat diuji kemurniannya dengan KLT. Kromatogram dari uji KLT dapat dilihat pada Lampiran 7.

4.1.10. Uji toksisitas metoda *Brine shrimp lethality test* (BSLT).

Hasil uji toksisitas terhadap estrak total metanol, heksan, diklorometan serta hasil fraksi dari VLC Da, Db, Dc, Dd, De, Df dan Dg memberikan nilai LC_{50} yang bervariasi. Nilai LC_{50} dapat dilihat pada tabel 5 dan analisa data perhitungan LC_{50} dapat dilihat pada lampiran 10.

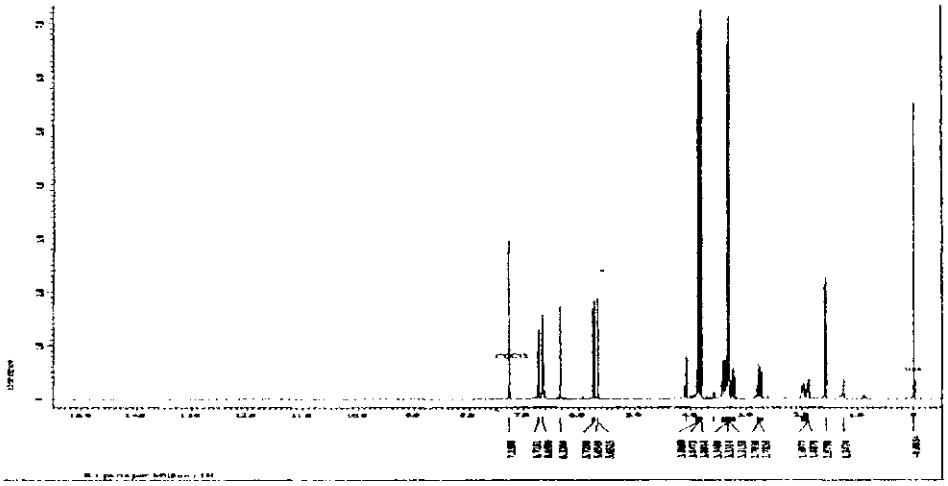
Tabel 5 : Hasil uji toksisitas ekstrak total dan Fraksi VLC

No	Ekstrak	Nilai LC_{50} (µg/ml)
1	Ekstrak Heksan	2.782,5
2	Ekstrak Diklorometan	30,505
3	Ekstrak Metanol	15.800,9
4	Fraksi Da	26,78
5	Fraksi Db	7,74
6	Fraksi Dc	28,70
7	Fraksi Dd	145,86
8	Fraksi De	13.182.567,39
9	Fraksi Df	451.484,51
10	Fraksi Dg	4.383.811,30
11	Fraksi Dh	28.017.447,8

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/

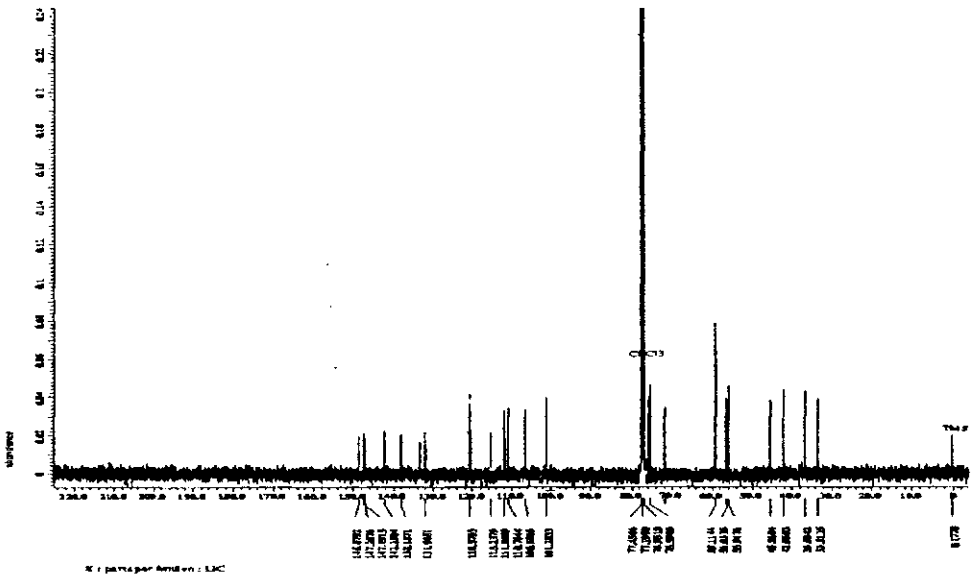
4.1.11. Hasil karakterisasi senyawa murni Db9

Dari spektrum ^{1}H-NMR dapat diinformasikan adanya 5 sinyal metil yang terikat pada O (metoksi), seperti gambar di bawah ini



Gambar 3. Spektrum ^{1}H-NMR senyawa Db9

Dari spektrum ^{13}C-NMR dapat diinformasikan adanya 21 sinyal karbon dan sinyal C=C aromatik yang terikat dengan pergeseran kimia 115,2 ppm, seperti gambar di bawah ini.



Gambar 4. Spektrum ^{13}C-NMR senyawa Db9

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/

4.2. Pembahasan

4.2.1. Isolasi senyawa kimia herbal *Phyllanthus niruri* L

Serbuk kering herbal *Phyllanthus niruri* L yang telah dihaluskan dimaserasi dengan pelarut metanol karena meserasi merupakan metoda yang cocok untuk tumbuhan yang lunak seperti Phyllanthus niruri L sebab tumbuhan ini tergolong kedalam jenis rumput-rumputan. Sebanyak 1 Kilo gram serbuk herbal dimeserasi dengan metanol selama 3 x 24 jam sebanyak 5 kali pengulangan. Sebelum maserat disaring dilakukan ultrasonikasi selama ± 1x30 menit, ini bertujuan untuk memperbesar kelarutan senyawa kimia ke dalam pelarut. Karena gelombang ultrasonik yang dikeluarkan alat ini dapat menggetarkan sampel sehingga senyawa kimia yang ada di dalam sampel akan keluar dan larut dalam pelarut yang digunakan. Maserat yang diperoleh disaring dengan kapas, kemudian digabungkan dan pelarutnya diuapkan dengan alat *rotary evaporator*. Alat ini bekerja secara *in vacuo,* karena dalam keadaan vakum tekanan uap pelarut akan menjadi turun dan pelarut akan mendidih pada temperatur lebih rendah dari titik didihnya sehingga dapat mengurangi kerusakan senyawa termolabil yang ada dalam sampel. Ekstrak total yang diperoleh berwarna hijau tua sebanyak 106,183 gram. Residu hasil maserasi dikeringkan di udara terbuka, kemudian Ekstrak yang sudah kering dipartisi dengan menggunakan pelarut heksan dan diklorometan dengan perlakuan yang sama masing-masing pelarut ekstrak hasil partisi diuapkan maka diperoleh ekstrak total heksan sebesar 16,212 gram(15,26%), ekstrak diklorometan 17,414 gram(16,39%) dan ekstrak total metanol sebesar 49,577 gram(46,69%). Maserasi ini dilakukan berdasarkan perbedaan kelarutannya, senyawa yang nonpolar akan terdistribusi ke dalam pelarut yang nonpolar yaitu n-heksana, senyawa yang semipolar akan terdistribusi dalam pelarut yang semipolar yaitu diklorometan, sedangkan senyawa yang polar akan terdistribusi ke dalam pelarut polar yaitu metanol. Yang perlu diingat yaitu pada saat melakukan partisi ekstrak metanol dengan diklorometan perlu adanya penambahan air, hal ini bertujuan agar pemisahannya lebih tampak jelas karena sifat dari diklorometan yang mendekati kepolar.

Sebelum dilakukan pemisahan dengan kromatografi vacum cair (VLC) terlebih dahulu dilakukan uji aktifitas sitotoksik masing-masing ekstrak total

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/

terhadap larva *Artemia salina* Leacch dengan menggunakan metoda *Brine shrimp lethality test* (BSLT). Pemilihan metoda ini sebagai penapisan awal dalam upaya pencarian senyawa antikanker karena biaya percobaannya yang murah, pengerjaannya yang sederhana dan cepat. Larva salina diperoleh dengan menetaskan telur selama 48 jam. Ekstrak yang akan diuji dibuat dalam kosentrasi 1000, 100, 10 µg/ml dalam air garam. Pembuatan larutan uji menggunakan pelarut metanol karena pelarut ini dapat melarutkan hampir semua senyawa dan mudah menguap. Setelah itu pelarut diuapkan kembali hingga menguap sempurna agar tidak menganggu pada pengujian toksisitas. Sebelum ditambahkan air garam terlebih dahulu kedalam vial uji dimasukan DMSO sebesar 50 µml yang bertujuan membantu kelarutan senyawa uji dalam air garam. Hasil uji sitotoksik ekstrak total dapat dilihat pada tabel 2 Ekstrak dikatakan aktif toksik jika nilai $LC_{50} \leq$ 1000µg/ml, sangat toksik jika $LC_{50} \leq$ 30 µg/ml dan tidak toksik jika $LC_{50} \geq$ 1000 µg/ml (Meyer et.al,1982). Dari uji ini ekstrak yang memiliki aktifitas toksik adalah ekstrak diklorometan yaitu 30.505. Setelah itu ekstrak yang aktif di KLT ini bertujuan untuk menentukan eluen yang sesuai pada uji KLT terhadap hasil pemisahan kromatografi kolom dan untuk melihat jumlah senyawa yang terdapat pada ekstrak. Hasil uji KLT ekstrak total dapat dilihat pada Lampiran 3.

Pemisahan pertama kali dilakukan dengan menggunakan kromatografi vacum cair (VLC), 4 gram ekstrak aktif diklorometan dipreadsorpsi lalu dimasukkan kedalam kolom VLC untuk dielusi dengan berbagai eluen yang memiliki kepolaran meningkat dari n-heksana 100%, perbandingan n-heksana-etilasetat sampai etilaseiat-metanol (1:1). Dari hasil pemisahan dengan kromatografi vacum cair ekstrak aktif diklorometan ini diperoleh 8 fraksi. Sebelum dilakukan pemisahan lebih lanjut dengan kromatografi kolom maka masing-masing fraksi dilakukan uji KLT (Tabel 3 Lampiran 4) dan uji BSLT terhadap hasil fraksi VLC, dimana cara dan perlakuan yang dilakukan sama dengan saat melakukan uji BSLT ekstrak total. Dilihat dari hasil uji BSLT fraksi yang aktif terhadap uji ini yaitu fraksi Da, Db, Dc, dan Dd dengan nilai LC50 berturut-turut yaitu 26,78 µg/ml ; 7,74 µg/ml; 28,70 µg/ml dan 145,86 µg/ml .Fraksi Db memberikan nilai LC_{50} yang tertinggi (Tabel 5)

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/

Kromatografi Kolom dilakukan pada fraksi yang memberikan aktivitas yang terbaik yaitu fraksi Db. Hasil pemisahan menggunakan kromatografi diperoleh senyawa Db9 lalu hasil diuji dengan KLT, ternyata senyawa yang dihasilkan belum murni maka dilakukan rekristalisasi menggunakan klorofrom karena senyawa larut pada pelarut tersebut. Kemudian hasil dari rekristalisasi dilakukan uji KLT kembali untuk melihat kemurnian dari suatu senyawa yang didapat. Senyawa rekristalisasi yang didapatkan memiliki 1 noda pada kondisi encer dan 2 noda pada kondisi pekat, maka agar supaya senyawa yang didapat benar-benar murni dilakukan KLT preparatif sehingga didapatkan senyawa Db9 berupa kristal putih sebesar 11mg yang memiliki titik leleh 110 -112°C.

Analisis spektrum ^{1}H-NMR senyawa Db9 dalam pelarut $CDCl_3$ dengan frekuensi 500 MHz (gambar) memperlihatkan δ_H 1,58 ppm (m, 2H), 1,87-2,00 ppm (mm, 2H), 2,71 - 2,83 ppm (m, 2H), 3,22 - 3,24 ppm (dd, 1H), 3,32 ppm (s, 3H), 3,33ppm (s, 3H), 3,34 - 3,39 ppm (m, 2H), 3,41- 3,44 ppm (dd, 1), 3,81ppm (s, 3H), 3,85 ppm (s, 3H), 3,87 ppm (s, 3H), 4,08 – 4,09 ppm (d, 1H), 5,65 ppm (s, 1H), 5,73 ppm (s, 1H), 6,33 ppm (s, 1H), 6,63 – 6,66 ppm (t, 2H) dan 6,73 – 6,74 ppm (d, 1H). Pada δ_H 3,32 ppm, 3,33ppm, 3,81ppm, 3,85ppm dan 3,87 ppm merupakan gugus CH_3 yang terikat pada O atau pada umumnya disebut dengan gugus metoksi.

Analisis spektrum ^{13}C-NMR (gambar 4) memperlihatkan keberadaan 21 atom karbon. Adapun nilai pergeseran kimianya yaitu δ_C 33,5 ppm, 36,8 ppm, 42,6 ppm, 45,6 ppm, 56,0 ppm, 56,5 ppm, 59,1 ppm, 71,9 ppm, 75,6 ppm, 101,3 ppm, 106,6 ppm, 110,8 ppm, dan 111,9 ppm, 115,2 ppm, 120,6 ppm, 131,9 ppm, 132,4 ppm, 138,2 ppm,142, 3 ppm, 147,3 ppm dan 148,7 ppm. Dari nilai pergeseran kimia diatas dengan menggunakan tabel ^{13}C-NMR kita dapat memprediksi bahwa pada senyawa Db9 terdapat,CH, CH_2, CH_3, $COCH_3$ dan ikatan C=C arcmatik.

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/