

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Sampel dan Lokasi Penelitian

Sampel atau bahan penelitian ini adalah daun *M. australis* (hasil determinasi tumbuhan dilampirkan pada Lampiran 1) yang diperoleh dari perkebunan murbei di Kampung Cibeureum Cisarupan Garut, Jawa Barat.

Lokasi penelitian dilaksanakan di Laboratorium Riset, Laboratorium Kimia Instrumen Jurusan Pendidikan Kimia UPI Bandung, Pusat Penelitian Biologi LIPI Cibinong Bogor, Laboratorium Kimia LIPI Serpong, dan Laboratorium Farmakologi Farmasi UNIGA.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Alat

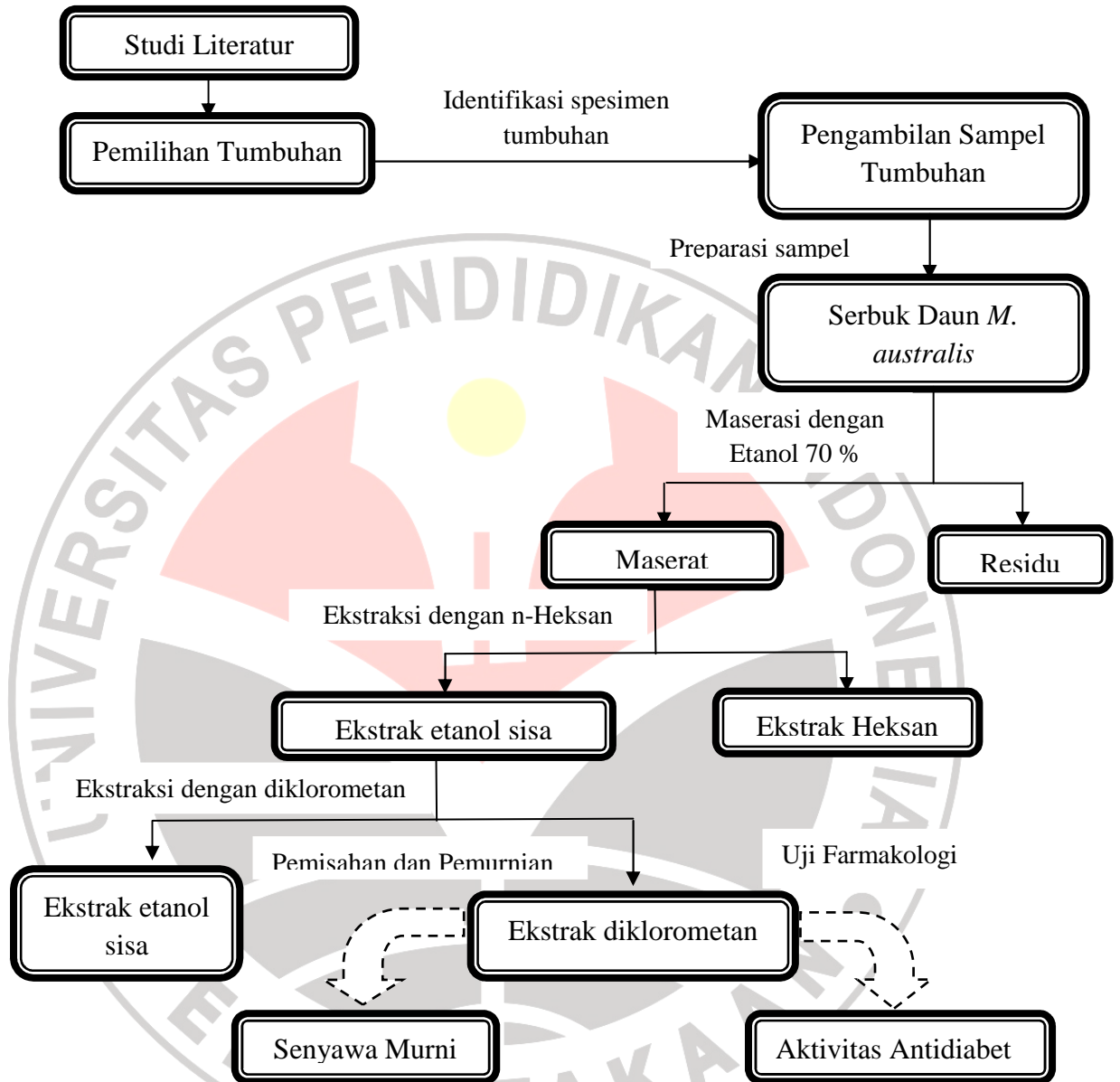
Peralatan yang digunakan pada penelitian ini meliputi alat-alat gelas, penguap berputar vakum (*vaccum rotary evaporator*), pompa vakum, KCV (Kromatografi Kolom Cair Vakum), KKT (Kromatografi Kolom Tekan), KLT (Kromatografi Lapis Tipis) Spektrofotometer FT-IR (*Fourier Transform-Infra Red*) Shimadzu 8400, Spektroskopi resonansi magnet inti (NMR) 1D (^1H NMR, ^{13}C NMR).

3.2.2 Bahan

Pada penelitian ini, bahan utama yang digunakan adalah daun murbei (*M. australis*). Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari bahan teknis dan bahan pro analisis (p.a). Bahan dengan kualitas teknis didestilasi terlebih dahulu sebelum digunakan. Bahan-bahan yang digunakan adalah etanol, metanol, n-heksan, diklorometan, etil asetat, aseton, HgCl₂ p.a, HCl pekat, serbuk Mg p.a, CH₃COOH glasial, H₂SO₄ pekat, FeCl₃ p.a, NaOH, aquades, kertas saring, silika gel Merck 60G, silika gel Merck 60 (70-230 mesh), silika gel Merck Kiesel gel 60 GF₂₅₉.

3.3 Metode Penelitian

Pelaksanaan penelitian dilakukan dengan beberapa tahapan. Tahapan tersebut yaitu penyiapan sampel, ekstraksi, fraksinasi, uji fitokimia, uji aktivitas antidiabetes, karakterisasi FTIR, ¹H NMR, dan ¹³C NMR. Bagan alir penelitian yang dilakukan dapat dilihat pada Gambar 3.1 di belakang ini :



Gambar 3.1. Bagan alir Penelitian

Uraian dari masing-masing pekerjaan yang dilakukan adalah sebagai berikut:

3.3.1 Penyiapan Sampel Tumbuhan

Tahap awal penelitian dimulai dengan pengambilan sampel daun *M. australis* dari daerah Garut, Jawa Barat. Daun murbei ini dikeringkan terlebih dahulu dengan bantuan sinar matahari sampai kering. Daun yang telah kering kemudian dihaluskan dengan mesin penggiling sampai berbentuk serbuk. Kemudian daun yang telah berbentuk serbuk tersebut ditimbang untuk mengetahui berat serbuk daun yang telah kering.

3.3.2 Proses Ekstraksi

Serbuk daun murbei (*M. australis*) diekstraksi menggunakan pelarut etanol 70%. Teknik ekstraksi yang digunakan ialah ekstraksi cair-padat dengan metode maserasi. Sampel direndam dalam pelarut etanol 3 x 9 liter berturut-turut selama 24 jam.

Ekstrak hasil maserasi kemudian disaring menggunakan corong *Buchner*. Lalu filtratnya dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* dalam keadaan vakum. Ekstrak pekat etanol kemudian diencerkan kembali menggunakan 900 ml air hangat (pada suhu ± 50 °C). Kemudian disaring lagi menggunakan corong *Buchner*. Filtrat yang didapat diekstraksi menggunakan pelarut diklorometan p.a. Teknik ekstraksi yang digunakan ialah ekstraksi cair-cair dengan metode corong pisah.

Ekstrak diklorometan yang diperoleh dipekatkan kembali menggunakan *rotary evaporator* dalam keadaan vakum. Ekstrak pekat diklorometan tersebut kemudian ditimbang.

3.3.3 Karakterisasi Senyawa

Ekstrak diklorometan daun *M. australis* di karakterisasi senyawa yang terdapat di dalamnya dengan beberapa cara, yaitu :

3.3.3.1 Uji Fitokimia

Ekstrak diidentifikasi komponen fitokimianya dengan metode pereaksi warna yang bertujuan untuk mengetahui golongan senyawa yang terkandung di dalam ekstrak. Uji fitokimia dilakukan terhadap golongan senyawa alkaloid, flavonoid, terpenoid, steroid, tanin, dan saponin. Prosedur kerja yang dilakukan ialah sebagai berikut :

1. Pemeriksaan Alkaloid

Pemeriksaan alkaloid dilakukan dengan cara, sebanyak 1 mL ekstrak ditambahkan dengan 5 tetes kloroform dan beberapa tetes Pereaksi Mayer. Terbentuknya endapan putih menunjukkan adanya alkaloid.

Pembuatan Pereaksi Mayer yaitu satu gram KI dilarutkan dalam 20 mL aquades sampai semuanya melarut. Lalu ke dalam larutan KI tersebut dimasukkan 0,271 gram HgCl_2 sampai larut.

2. Pemeriksaan Flavonoid

Pemeriksaan flavonoid dilakukan dengan cara, sebanyak 1 mL ekstrak ditambahkan 1 gram serbuk Mg dan 190 mL HCl pekat. Timbulnya warna kuning menunjukkan adanya flavonoid.

3. Pemeriksaan Terpenoid dan Steroid

Pemeriksaan terpenoid dan steroid dilakukan dengan cara, masing-masing ekstrak sebanyak 1 mL ditambahkan 1 mL CH_3COOH glasial dan 1

mL H₂SO₄ pekat. Timbulnya warna merah menunjukkan adanya terpenoid sedangkan warna biru atau ungu menunjukkan adanya steroid.

4. Pemeriksaan Tanin

Pemeriksaan tanin dilakukan dengan cara, sebanyak 1 mL ekstrak ditambahkan beberapa tetes FeCl₃ 1%. Timbulnya warna biru tua menunjukkan adanya senyawa tanin (fenolik).

5. Pemeriksaan Saponin

Pemeriksaan saponin dilakukan dengan cara, sebanyak 1 mL ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian dikocok secara vertikal selama satu detik. Lalu amati perubahan yang terjadi. Terbentuknya busa atau buih setelah penambahan HCl encer menunjukkan reaksi yang positif untuk saponin.

3.3.3.2 Pengujian dengan Spektrometri FTIR (*Fourier Transform-Infra Red*)

Pemeriksaan IR dilakukan untuk mengetahui gugus-gugus fungsi yang terdapat dalam ekstrak diklorometan dari daun *M. australis*. Penentuan gugus-gugus fungsi dilakukan dengan menggunakan Spektrometri FT-IR (*Fourier Transform-Infra Red*) Shimadzu 8400.

3.3.3.3 Pengujian dengan Spektrometri NMR

Pemeriksaan NMR ini memberikan informasi mengenai berbagai jenis atom hidrogen yang terdapat dalam ekstrak diklorometan dari daun *M. australis*. Spektrum NMR yang dihasilkan memberikan informasi mengenai lingkungan

kimia atom hidrogen, jumlah atom hidrogen dalam setiap lingkungan dan struktur gugusan yang berdekatan dengan setiap atom hidrogen. Selain memberikan informasi mengenai lingkungan kimia atom hidrogen, pemeriksaan NMR ini memberikan informasi mengenai lingkungan kimia atom karbon. Pemeriksaan jenis atom hidrogen dan atom karbon dilakukan dengan menggunakan spektroskopi resonansi magnet inti (NMR) 1D (^1H NMR, ^{13}C NMR).

3.3.4 Uji Aktivitas Antidiabet

Hewan uji yang digunakan adalah mencit jantan galur Swiss Webster dengan bobot badan rata-rata 20-40 gram yang diperoleh dari Pusat Antar Universitas Institut Teknologi Bandung (PAU ITB).

3.3.4.1 Induksi Aloksan pada Mencit

Aloksan monohidrat dosis 70 mg/kg bb diberikan secara intra vena melalui ekor mencit. Perkembangan diabetes diuji setiap hari dengan menentukan kadar gula darah dalam urin dengan menggunakan stik glukotest. Mencit yang positif diabetes pada stik glukotest akan memberikan warna hijau. Mencit-mencit diabetes kemudian dikelompokkan menjadi 5 kelompok, tiap kelompok terdiri dari 3 ekor mencit.

3.3.4.2 Pengujian Efek Antidiabetes Fraksi Diklorometan Daun *M. australis*

Mencit diabetes aloksan dipuaskan selama 16 jam, kemudian diambil darah mencit sebagai kadar glukosa awal. Mencit dibagi menjadi 5 kelompok

mencit. Masing-masing kelompok terdiri dari 3 ekor mencit. Kepada masing-masing kelompok mencit diberi perlakuan sebagai berikut, kelompok I, diberi suspensi tragakan 2% sebagai kelompok kontrol positif; kelompok II, diberi air suling sebagai kelompok kontrol negatif; kelompok III, diberi fraksi diklorometan daun *M. australis* dosis 50 mg/kg bb; kelompok IV, diberi fraksi diklorometan daun *M. australis* dosis 100 mg/kg bb; kelompok V, diberi fraksi diklorometan daun *M. australis* dosis 200 mg/kg bb.

Sediaan uji diberikan secara peroral sebanyak 0,5 mL/20 g bb satu kali sehari terhadap semua kelompok perlakuan selama 14 hari. Pengambilan cuplikan darah dilakukan dengan cara memotong sedikit bagian ekor mencit. Pengukuran kadar glukosa darah dilakukan sebelum pemberian zat uji dan pada jam ke 1 setelah pemberian sediaan uji pada hari ke-1, 7, dan 14.