BAB II
METODE PENELITIAN

A. Kategori Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni untuk mengetahui aktivitas penangkap radikal dari isolat fraksi etil asetat ekstrak etanol herba meniran (*Phyllantus niruri* L.) dengan metode DPPH serta profil kandungan senyawanya dengan Spektroskopi NMR.

B. Variabel Penelitian

Dalam penelitian ini terdapat tiga variabel uji :

1. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah seri konsentrasi fraksi etil asetat ekstrak etanol herba meniran.
2. Variabel terikat adalah persen (%) penangkapan radikal.
3. Variabel terkendali adalah konsentrasi DPPH dan waktu inkubasi.

C. Alat dan Bahan

1. Alat yang diperlukan

Pada penelitian ini dibutuhkan alat-alat berupa spektrofotometer UV–Vis (UV Mini 1240 SHIMADZU), Spektroskopi NMR kekuatan resonansi 500 Hz, *vacuum rotatory evaporator* (Laborota 4000 Heidolph), *glassware* (Pyrex), pipet volum (Pyrex), vortex, mikropipet (Socorex), pipet ukur (Pyrex), neraca analitik (A&D Co. Ltd.), lampu UV portable 254 nm dan UV 366 nm, serta seperangkat alat penyemprot.

2. Bahan yang diperlukan

Pada penelitian ini dibutuhkan bahan-bahan berupa herba meniran dari toko herbal akar sari (Surakarta), vitamin E, DPPH, etanol 70%, CD3OD, etil asetat *p.a*, n-heksan *p.a*, metanol *p.a*, kloroform *p.a*, kertas saring, lempeng silika $GF_{254,}$ *yellow tips* dan *blue tips*, alumunium foil, aseton *p.a*, serta akuades.

D. Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Kimia Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta laboratorium FMIPA Universitas Sebelas Maret, Surakarta.

E. Jalannya Penelitian

1. Persiapan Simplisia

Herba meniran diperoleh dari toko herbal akar sari (Jl. Dr Rajiman 112 Solo).

2. Isolasi dan Purifikasi Senyawa

a. Ekstraksi

Herba meniran ditimbang sebanyak 1 kg, dimasukkan kedalam bejana untuk dilakukan maserasi. Herba direndam dengan 7000 mL etanol 70% selama 3 hari dengan sesekali digojog, hasil yang didapat disaring dengan kertas saring sehingga didapatkan filtrat etanol. Filtrat dipekatkan dengan evaporator dan diuapkan diatas waterbath pada suhu 60^0C sehingga didapatkan ekstrak kental meniran.

b. Fraksinasi pertama menggunakan enap tuang

Ekstrak sebanyak 20 gram diekstraksi sebanyak 3 kali dengan *n*-hexan @ 200 mL hingga diperoleh fraksi n-hexan 600 mL. Ampas kemudian disari dan diekstraksi kembali sebanyak 10 kali dengan etil asetat @ 200 mL hingga diperoleh fraksi etil asetat 2 L. Ampas kemudian disari dan diekstraksi kembali sebanyak 7 kali dengan etanol @ 200 mL sehingga diperoleh fraksi etanol sebanyak 1400 mL. Fraski yang didapatkan kemudian dipekatkan dengan evaporator sehingga diperoleh fraksi kental n-hexan, etil astetat, dan etanol.

c. Fraksinasi kedua menggunakan kromatografi vakum cair

Kolom berdiameter 6 cm dan tinggi 14 cm disiapkan, kemudian dimasukan silika kolom katalog merck 7731 yang telah ditimbang sebanyak 221,19 gram. Silika dimampatkan dengan bantuan pompa vakum sehingga tidak ada rongga dalam kolom. Sebanyak 15 gram fraksi kental etil asetat diimpregnasi dengan 30 gram silika impreg katalog merck 7734 dan

dimasukkan ke dalam kolom. Kolom dielusi dengan fase gerak kloroform : n-hexan (80:20) kemudian dengan peningkatan polaritas kloroform : metanol (9:1), kloroform : metanol (8:2), kloroform : metanol (7:3), kloroform : metanol (6:4), dan kloroform : metanol (5:5) dielusi 3 kali sebanyak 350 mL. Fraksi yang ditampung sebanyak 130 mL tiap elusi. Hasil semua fraksi dianalisis menggunakan KLT dengan plat silika Gel 60 GF_{254} dan dengan fase gerak n-heksan : etil atetat (3:1). Fraksi yang memiliki kromatogram yang sama digabungkan dan kemudian dipekatkan menggunakan evaporator. Fraksi kental yang didapatkan dianalisis aktivitas antioksidannya dan fraksi paling aktif antioksidan difraksinasi dengan kromatografi kolom tekan.

d. Fraksinasi ketiga menggunakan kromatografi kolom tekan

Silika G 60 mesh 60-200 katalog merck 7731 dan kolom diameter 3 cm disiapkan. Silika yang telah diaktifkan dimasukkan kedalam kolom setinggi 25 cm, kemudian kolom dimampatkan dengan bantuan pompa vakum sehingga tidak ada rongga dalam kolom. Sebanyak 2 gram fraksi yang telah dipekatkan diimpregnasi dengan 4 gram silika impreg katalog merck 7734 dan dimasukkan ke dalam kolom. Elusi dilakukan menggunakan fase gerak dengan peningkatan polaritas yaitu n-heksan : etil asetat (4:1), n-heksan : etil asetat (3:2), n-heksan : etil asetat (2:3), n-heksan : etil asetat (1:4), kloroform : etil asetat (4:1), kloroform : etil asetat (3:2), kloroform : etil asetat (2:3), kloroform : etil asetat (1:4), dan metanol : kloroform (3:7) dielusi sebanyak 3 kali sebanyak 200 mL. Untuk mempermudah dan mempercepat proses elusi ditambahkan alat pemompa bertekanan. Ditampung fraksi yang keluar sebanyak ± 70 mL. Fraksi 1-17 dianalisis menggunakan KLT dengan plat silika Gel 60 GF_{254} dan fase gerak n-heksan : etil asetat (3:1). Fraksi 18-60 dianalisis menggunakan KLT dengan plat silika Gel 60 GF_{254} dan fase gerak kloroform : metanol (9:1). Fraksi yang memiliki kromatogram yang sama digabungkan dan kemudian dipekatkan menggunakan evaporator. Fraksi kental yang didapatkan dianalisis aktivitas antioksidannya dan fraksi paling aktif antioksidan dianalisis dengan kromatografi preparatif.

e. Kromatografi preparatif

Sebanyak 200 mg fraksi kental yg didapat dilarutkan dengan metanol *p.a* 1 mL, kemudian ditotolkan pada plat fase terbalik (C18) dengan fase gerak asetonitril:metanol:air (1:1:1). Hasil pemisahan dilihat pada lampu UV 366 dan 254, kemudian hasil pemisahan dikerok dan dimasukan dalam kolom. Sampel dielusi dengan metanol:kloroform (3:7).

3. Uji Antioksidan

Uji aktivitas antioksidan diadopsi dari penelitian Rohman dan Riyanto (2006) dengan penangkapan radikal menggunakan DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*)

a. Pembuatan larutan stok DPPH

Larutan stok DPPH dibuat dengan konsentrasi 0,4 mM, ditimbang DPPH 15,77 mg kemudian dimasukkan dalam labu takar 100,0 mL. DPPH dilarutkan dengan etanol *p.a* sampai tanda pada labu takar 100,0 mL, labu takar dilapisi *alumunium foil*, dan larutan ini disimpan dalam wadah gelap di almari es.

b. Pembuatan larutan stok sampel fraksi etil asetat herba meniran dan vitamin E

Sampel fraksi etil asetat ekstrak etanol herba meniran dan vitamin E ditimbang 10,0 mg, kemudian dimasukkan labu takar 10,0 mL lalu ditambahkan etanol *p.a* sampai tanda, disonikasi sampai homogen sehingga didapat larutan dengan konsentrasi 0,1 % b/v.

c. Penentuan waktu inkubasi

Larutan stok DPPH 3,0 mL dimasukkan labu takar 5,0 mL ditambahkan 0,200 mL sampel 0,1 % b/v, kemudian ditambahkan etanol *p.a* sampai tanda, *divorteks* selama 20 detik dan diukur absorbansi pada panjang gelombang 571 nm. Interval pembacaan absorbansi 5 menit sampai didapatkan absorbsansi yang stabil dan tidak menunjukan adanya penurunan absorbansi

d. Penentuan panjang gelombang maksimum (λ_{maks}) DPPH

Larutan stok DPPH 700 µl dimasukkan labu takar 5,0 ml, ditambahkan etanol *p.a* sampai tanda, kemudian diukur absorbansi pada panjang gelombang 450-545 nm dengan menggunakan blangko 5,0 mL etanol *p.a*. Panjang

gelombang maksimum diperoleh dari panjang gelombang yang memiliki absorbansi maksimum.

e. Penentuan IC_{50} fraksi etil asetat herba meniran dan vitamin E

Larutan stok sampel fraksi etil asetat ekstrak etanol herba meniran dan vitamin E dibuat dengan lima seri konsentrasi 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm, 5 ppm, dan 6 ppm dimasukkan kedalam labu takar 5,0 mL. Kemudian ditambahkan 700µl DPPH 0,4 mM dan ditambah etanol *p.a* sampai tanda. Kemudian disonikasi selama 20 detik dan diinkubasi selama waktu inkubasi.

Absorbansi sampel diukur dengan blangko etanol *p.a* pada $\lambda_{maks.}$ Sampel dibandingkan dengan kontrol yang terdiri dari 700 µl DPPH 0,4 mM dalam 5,0 ml etanol *p.a* sehingga didapatkan % aktivitas antiradikal.

Kurva regresi linier dibuat antara % aktivitas antiradikal melawan konsentrasi. Didapat rumus regresi linier dan ditentukan konsentrasi sampel pada aktivitas 50%. Percobaan uji aktivitas antiradikal direplikasi sebanyak tiga kali. Setiap sekali percobaan, pembuatan stok direplikasi sebanyak tiga kali dan pengenceran sampel direplikasi sebanyak dua kali.

4. Analisis Isolat menggunakan Spektroskopi NMR

Untuk mengetahui senyawa yang terkandung dalam isolat maka fraksi yang lebih murni dan aktif dianalisis dengan menggunakan spektroskopi ^{1}HNMR (500 Hz) dengan pelarut CD_3OD.

F. Analisis Data

1. Identifikasi isolat menggunakan spektroskopi NMR

Identifikasi kandungan senyawa pada isolat fraksi etil asetat ekstrak etanol herba meniran dideteksi dengan spektroskopi NMR. Identifikasi struktur dengan ^{1}HNMR dapat digunakan untuk mengetahui konstanta kopling, luas puncak, pola pemisahan spin-spin, dan geseran kimia proton.

2. Penentuan aktivitas antioksidan

Perhitungan *inhibitory concentration* (IC_{50}) digunakan untuk mengetahui aktivitas antioksidan. IC_{50} diperoleh melalui persamaan regresi linier konsentrasi sampel sebagai (x) dan persen antioksidan sebagai (y) (Isnindar *et al*., 2011).

$$\% \text{ aktivitas antioksidan} = \frac{(\text{absorbansi kontrol-absorbansi sampel})}{\text{absorbansi kontrol}} \times 100\%$$