

## BAB IV

### PENELITIAN

#### 4.1 Ekstraksi dan fraksinasi.

Serbuk kering kulit batang tumbuhan seberat 1 kg diekstraksi pada temperatur kamar dengan metanol. Ekstraksi dihentikan bila telah didapat ekstrak sejumlah 6 l. Ekstrak metanol yang didapat diuapkan sampai hampir kering di dalam rotavapor dan kemudian diuapkan sampai kering pada temperatur kamar di dalam almari asam. Terhadap ekstrak kering yang didapat dilakukan partisi kloroform-air. Fasa kloroform dan air dipisahkan. Fasa kloroform yang didapat diuapkan di dalam rotavapor sampai hampir kering dan pengeringan dilanjutkan pada temperatur kamar di dalam almari asam sehingga didapat ekstrak kloroform kering (EKK). EKK dilarutkan di dalam etanol dan dilakukan penghilangan warna dengan penambahan arang aktif sebanyak 2%. Penambahan arang aktif ini diulang sampai didapat larutan yang hampir tidak berwarna. Larutan ini kemudian diuapkan di dalam rotavapor sampai hampir kering dan pengeringan dilanjutkan di dalam almari asam pada temperatur kamar. Didapatkan masa yang berwarna keputih-putihan. Terhadap masa ini kemudian dilakukan fraksinasi secara kromatografi kolom dengan metoda eluasi fraksi. Fasa diam yang digunakan adalah Kieselgel 60,35-70 Mesh ASTM Merck dan fasa gerak berturut-turut, kloroform, kloroform-metanol (9:1), kloroform-metanol (4:1), kloroform-metanol (1:1) dan

terakhir dengan metanol. Perbandingan antara masa yang dipisahkan dengan fasa diam adalah 1 : 25 dan setiap sistem pelarut yang digunakan jumlahnya tiga kali jumlah fasa diam (Robert dan Kawan-kawan, 1979). Fraksi yang didapat dikelompokkan berdasarkan hasil kromatografi lapisan tipis menggunakan fasa gerak kloroform-petroleumbensin-metanol (7:2:1) dan fasa diam Kieselgel 60 GF 254 Merck.

#### 4.2. Identifikasi.

**Asetilasi.** Zat sebanyak 10 mg dilarutkan dalam 2,5 ml piridina dan ditambah 7,5 ml asetat anhidrat. Larutan ini didiamkan selama 12 jam kemudian diuapkan di dalam almari asam sampai kering. Kemudian ditambahkan 5 ml metanol Merck p.a dan diuapkan sampai kering. Sisa kering yang tertinggal dikumpulkan.

**Hidrolisis saponin.** Saponin sebanyak 5 mg ditambah 5ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> Merck p.a. 1N dalam dioksan Merck p.a. - air suling ( 1 : 3 ) dipanaskan didalam penangas air selama 8 jam. Endapan yang timbul disaring dan dicuci dengan air suling dan kemudian dikeringkan. Filtrat di kocok tiga kali berturut-turut dengan 10 ml eter Merck p.a. Fasa eter yang didapat dikocok tiga kali berturut-turut dengan air. Fasa eter digunakan untuk melarutkan endapan yang tertinggal di kertas saring. Larutan yang didapat diuapkan di dalam almari asam pada temperatur

kamar. Sisa kering yang tertinggal dikumpulkan ( G<sub>n</sub> ). Fasa air dinetralkan dengan Ba(OH)<sub>2</sub>. Endapan yang terjadi dipisahkan dengan cara penyaringan. Filtrat yang didapat diuapkan di atas penangas air sampai didapatkan larutan yang relatif kental (G<sub>g</sub>).

Isolat-isolat yang didapat diidentifikasi dengan cara :

#### 1. Kromatografi lapisan tipis

Fasa diam yang digunakan Kieselgel 60 GF254 Merck. Spesifikasi fasa gerak dicantumkan pada hasil penelitian.

Penampakan noda :

##### Metode Stahl

Pereaksi terdiri dari campuran 0,5 ml anisal dehidra, 85 ml metanol, 10 ml asam asetat dan 5 ml asam sulfat pekat. Setelah penyemprotan lempeng kromatografi dipanasi 110<sup>o</sup>C selama 5 menit (Stahl, 1970)

##### Metode Ikan dan Kawan-kawan

Pereaksi terdiri dari campuran 10% anhidrida asetat dan 10% asam sulfat dalam etanol mutlak. Setelah penyemprotan papan kromatografi dipanasi 120<sup>o</sup>C selama 5 menit (Ikan dan Kawan-kawan, 1964)

## 2 . Titik lebur

Penentuan titik lebur dilakukan dengan alat Fisher-Johns melting point apparatus

## 3 . Spektrofotometri infra-merah

Alat yang digunakan Perkin Elmer Infra-red Spectrophotometer 735 B dengan medium pembawa KBr.

## 4 . Spektrometri masa

Alat yang digunakan Jeol JMS-DX 303 Mass Spectrometer

## 5 . Spektrometri resonansi magnet inti

Alat yang digunakan Bruker 300 with Aspect 2000 Data System.

Spesifikasi pelarut dicantumkan pada hasil

## 6 . Analisis unsur

Alat yang digunakan adalah Perkin Elmer 240 C Elemental Analyzer

## 7 . Kromatografi kertas.

Kertas yang digunakan adalah kertas Whatman no. 41.

Digunakan empat macam fasa gerak yaitu ;

1. butanol-asam asetat-air (4:1:5, lapisan atas).
2. n-butanol-etanol-air (4:12,2)
3. n-butanol-benzena-piridina-air (5:1:3:3 )
4. fenol jenuh air

Penampakan noda ; kertas setelah dikeringkan dicelupkan ke dalam larutan anilina hidrogen ftalat kemudian dikeringkan kembali. Kertas dipanasi  $105^{\circ}\text{C}$  selama 5 menit dan noda diamati di bawah sinar ultra-violet.

Cara pembuatan pereaksi anilina hidrogenftalat; anilina sebanyak 9,2 ml dan 16 g sam ftalat dilarutkan dalam campuran 490 ml n-butanol, 490 ml dietileter dan 20 ml air (Harborne, 1973).

#### 4.3.Uji aktivitas antifertilitas

**Pembuatan sediaan.** Satu bagian zat dilarutkan dalam sejumlah etanol sampai larut sempurna. Empat bagian PVP (polivinilpirolidon) dilarutkan dalam sejumlah etanol sampai larut sempurna. Kedua larutan dicampur dan kemudian diuapkan sampai kering di dalam rotavapor. Didapatkan sediaan yang larut atau hampir larut di dalam air (Lee dan Chi, 1985).

**Pembuatan larutan sediaan.** Sediaan dilarutkan dalam air suling dengan kadar sedemikian rupa sehingga pemberian per-oral untuk mencit dengan berat badan 30 g.maksimal 1 ml larutan sediaan (Ritschel, 1974).

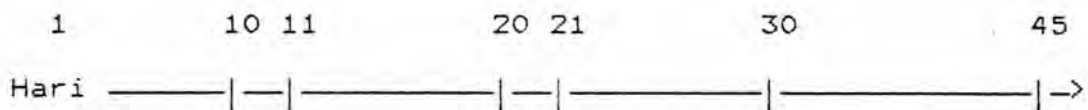
**Dosis.** Dosis dalam g zat/ kg berat badan mencit. Berat badan mencit adalah berat badan yang diperoleh dari hasil penimbangan setiap hari akan pemberian larutan. Lama pemberian larutan disesuaikan dengan masing-masing metoda pengujian.

Uji fertilitas mencit jantan. Mencit betina ditempatkan dalam kandang tersendiri. Dilakukan oles vagina. Bila pada pagi hari dijumpai mencit betina dalam stadium proestrus maka mencit jantan dikumpulkan dengan mencit betina tersebut pada sore hari antara pukul 16.00 sampai pukul 18.00. Besok paginya mencit jantan dipisahkan. Diamati terjadi tidaknya kopulasi. Adanya sumbat vagina menandai bahwa kopulasi telah terjadi (lihat Lampiran IV). Mencit betina tersebut kemudian dibiarkan sampai teramati terjadinya kebuntingan. Dengan teramatinya kebuntingan berarti mencit jantan telah layak sebagai pejantan. Hal yang sama dilakukan terhadap mencit jantan yang lain sehingga didapat suatu koloni pejantan (lihat Lampiran V)

#### 1. Uji aktivitas antifertilitas I.

Mencit betina ditempatkan di dalam kandang tersendiri. Selama sepuluh hari dilakukan oles vagina (Farnsworth dan Kawan-kawan, 1975). Kemudian dipilih mencit yang mempunyai siklus estrus yang teratur. Mencit-mencit yang terpilih secara acak dibagi menjadi dua kelompok yaitu kelompok perlakuan dan kelompok kontrol. Masing-masing kelompok terdiri dari sepuluh ekor mencit (Lee dan Chi, 1985). Kelompok perlakuan diberi larutan sediaan dan kelompok kontrol diberi larutan PVP. Pemberian larutan dilakukan setiap hari sekali disertai dengan oles vagina. Setelah sepuluh hari pemberian larutan, mencit jantan dikumpulkan dengan yang betina (satu pe-

jantan dengan satu betina). Pemberian larutan dan oles vagina diteruskan sambil diamati kemungkinan telah terjadinya kopulasi. Apabila telah terjadi kopulasi, pemberian larutan dan oles vagina dihentikan serta mencit pejantan dipisahkan. Apabila tidak teramati terjadinya kopulasi, pemberian larutan dan oles vagina diteruskan selama sepuluh hari terhitung sejak mencit betina dikumpulkan dengan pejantannya (Laurence dan Bacharach, 1964). Pada hari ke enam belas sejak mencit betina dan mencit pejantan dipisahkan, mencit betina dibunuh dengan menggunakan eter dan kemudian dibedah. Dihitung jumlah mencit yang mengalami kebuntingan, jumlah fetus, jumlah tapak implantasi (lihat Lampiran VI) dan jumlah badan kuning dari masing-masing mencit yang bunting tersebut.



Gambar 4. Skema uji aktivitas antifertilitas I

Hari ke		
1---	10	aklimatisasi, oles vagina
11--	20	pemberian larutan, oles vagina
20		pejantan dikumpulkan dengan mencit betina
21--	30	pemberian larutan, oles vagina diteruskan sampai teramati terjadinya kopulasi. Bila terjadi kopulasi mencit pejantan dipisahkan, pemberian larutan dan oles vagina dihentikan. Bila tidak terjadi kopulasi hal ini baru dilakukan pada hari ke 30. Pembedahan dilakukan pada hari ke 16 sejak mencit betina dipisahkan dengan pejantannya.
45		pembedahan bagi mencit betina yang tidak melakukan kopulasi.

## 2. Uji aktivitas antifertilitas IIa.

Mencit betina dikumpulkan dengan mencit pejantan. Hari ditemukannya sumbat vagina adalah hari pertama kebuntingan (H-1). Mencit-mencit yang telah melakukan kopulasi ini dikelompokkan secara acak menjadi kelompok perlakuan dan kelompok kontrol. Masing-masing kelompok terdiri dari sepuluh ekor mencit. Sejak (H-1) mencit perlakuan diberi larutan sediaan dan kelompok kontrol larutan PVP setiap hari sekali sampai dengan (H-5). Mencit pejantan dipisahkan dari yang betina pada (H-1).Pembedahan dilakukan pada (H-16).Dihitung jumlah mencit yang bunting dan dari mencit ini dicatat jumlah fetus,tapak implantasi dan jumlah badan kuning.

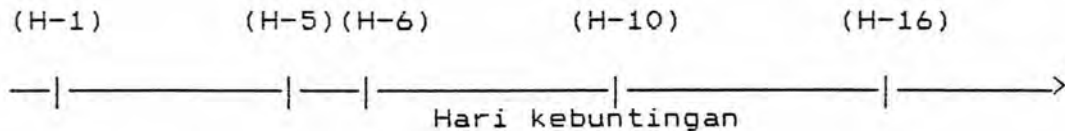
## 3. Uji aktivitas antifertilitas IIb.

Metoda uji ini hampir sama dengan metoda uji aktivitas antifertilitas IIa, hanya pada metoda ini pemberian larutan dimulai pada (H-6) sampai dengan (H-10).

## 4. Uji aktivitas antifertilitas IIc.

Metoda uji ini hampir sama dengan metoda uji aktivitas antifertilitas IIa, hanya pemberian larutan dimulai pada (H-1) sampai dengan (H-10).





Gambar 5. Skema uji aktivitas antifertilitas Iia, Iib, Iic

- (H-1) = ditemukannya sumbat vagina, mencit pejantan dipisahkan dari mencit betinanya.  
 (H-1)-(H-5) = pemberian larutan menurut metoda Iia  
 (H-6)-(H-10) = pemberian larutan menurut metoda Iib  
 (H-1)-(H-10) = pemberian larutan menurut metoda Iic  
 (H-16) = dilakukan pembedahan

Penilaian. Data yang didapat dinilai dengan kriteria Lee dan Chi (1985) sebagai berikut :

#### 1. Tingkat A

Laju kebuntingan =

$$\frac{\text{Jumlah mencit bunting}}{\text{Jumlah anggota kelompok}} \times 100 \%$$

Bila laju kebuntingan kelompok kontrol 100% maka untuk laju kebuntingan kelompok perlakuan :

< 60 % hasil uji : Positif

70 % hasil uji : Medium

> 70 % hasil uji : Negatif

Bila laju kebuntingan kelompok kontrol 90 % hasil uji dikategorikan positif bila laju kebuntingan kelompok perlakuan 50% atau lebih kecil.

## 2. Tingkat B

Prosentase pengurangan jumlah rata-rata tapak im-  
plantasi =

$$\frac{\text{Pengurangan jumlah rata-rata tapak implantasi}}{\text{Jumlah rata-rata tapak implantasi kelompok kontrol}} \times 100\%$$

Hasil uji :

Positif bila prosentase pengurangan :  $\geq 60\%$

Medium bila prosentase pengurangan : 40 %

Negatif bila prosentase pengurangan :  $< 40\%$

Jumlah rata-rata tapak implantasi hanya dihitung  
dari mencit yang bunting.

## 3. Tingkat C

Prosentase jumlah fetus =

$$\frac{\text{Jumlah rata-rata fetus dari kelompok perlakuan}}{\text{Jumlah rata-rata fetus dari kelompok kontrol}} \times 100\%$$

Hasil uji :

Positif bila prosentase jumlah fetus :  $\leq 20\%$

Medium bila prosentase jumlah fetus : 40%

Negatif bila prosentase jumlah fetus :  $> 40\%$

Jumlah rata-rata fetus hanya dihitung dari mencit  
yang bunting.

#### 4. Tingkat D

Prosentase pengurangan jumlah rata-rata badan kuning

$$\frac{\text{Pengurangan jumlah rata-rata badan kuning}}{\text{Jumlah rata-rata badan kuning kelompok kontrol}} \times 100\%$$

Hasil uji :

Positif bila prosentase pengurangan :  $\geq 60\%$

Medium bila prosentase pengurangan :  $= 40\%$

Negatif bila prosentase pengurangan :  $< 40\%$

Jumlah badan kuning hanya dihitung dari mencit yang bunting.