

III. METODE PENELITIAN

3.1. Bahan Kimia dan Peralatan yang dipergunakan

Bahan kimia yang dipergunakan dalam penelitian ini adalah n-heksan, metanol, etilasetat, etanol absolut, nutrient agar (NA), nutrient broth (NB), potato dextro agar (PDA), water pepton, antiseptik dan lain-lain.

Peralatan yang dipergunakan seperti inkubator, autoclave, jarum ose, cawan petri, kertas cakram, penangas air, rotari evaporator, pipet volum, kolom kromatografi, plat KLT dan lain-lain.

3.2. Persiapan Sampel Tumbuhan

Sampel berupa daun tumbuhan Pacar jawa atau Inai (*Lawsonia inermis* Linn) diambil di daerah Simpangbaru, Kecamatan Tampan, Kodya Pekanbaru. Daun tumbuhan terlebih dahulu dibersihkan dari kotoran dan dikeringkan. Sampel kering dihaluskan sampai menjadi bubuk.

3.3. Ekstraksi Sampel

Sampel berupa bubuk kering diperkolasi pertama sekali dengan n-heksan untuk mendapatkan ekstrak nonpolar, kemudian dilanjutkan dengan pelarut metanol untuk mendapatkan ekstrak yang polar. Masing-masing hasil ekstraksi diuapkan pelarutnya dengan rotari evaporator sampai kering dan ditimbang hasil ekstrak yang diperoleh. Masing-masing ekstrak yang diperoleh siap untuk dilakukan pemisahan dengan kromatografi kolom.

3.4. Fraksinasi Senyawa dari Ekstrak Pacar jawa (*Lawsonia inermis* Linn)

Masing-masing ekstrak heksan dan metanol dilakukan fraksinasi dengan kromatografi kolom. Hasil pengoloman ditampung dalam beberapa botol yang diberi nomor urut dan kemudian dilakukan uji kromatografi lapis tipis (KLT). Botol yang mempunyai harga Rf sama digabungkan menjadi satu fraksi dan pelarutnya diuapkan.

Masing-masing hasil fraksinasi ini dan ekstrak totalnya dilakukan uji aktivitas antimikrobia.

Fraksi-fraksi hasil kromatografi kolom yang berupa padatan atau kristal, dilakukan pemurnian dengan rekristalisasi dengan pelarut yang sesuai atau dikolom ulang.

Kristal yang diperoleh dilakukan uji kemurnian dengan mengukur titik leleh dan uji kromatografi lapis tipis dengan berbagai sistem eluen yang berbeda. Kristal yang telah murni dilakukan karakterisasi dengan spektroskopi ultraviolet (UV) dan inframerah (IR).

3.5. Mikroorganisme yang dipergunakan

Bakteri yang dipergunakan untuk uji aktivitas antimikrobia adalah bakteri gram negatif seperti *Escherichia coli* dan bakteri gram positif seperti *Staphylococcus aureus* dan *Bacillus subtilis*. Jamur yang dipergunakan adalah *Rhizopus sp*, *Penicillium sp* dan *Neurospora sp*. Mikroorganisme yang dipergunakan ini berasal dari Laboratorium Mikrobiologi, Jurusan Biologi FMIPA ITB Bandung.

3.6. Uji Aktivitas Antimikrobia

Prinsip: mengukur diameter daerah bening yaitu daerah yang tidak ditumbuhi oleh mikroorganisme karena adanya efek antimikrobia dari ekstrak tumbuhan yang diuji. Semua uji aktivitas ini dilakukan secara aseptik.

3.6.1. Uji aktivitas antibakteri metode difusi

Biakkan bakteri dari agar miring diinokulasi dalam nutrient broth (NB) yang telah disiapkan dalam keadaan steril, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Biakkan bakteri ini siap untuk dipergunakan untuk uji aktivitas antimikrobia.

Uji aktivitas antimikrobia dilakukan sebagai berikut: Ambil cawan petri steril, masukkan 1 ml biakkan bakteri dalam NB, kemudian tambahkan 15 ml media nutrisi agar (NA) yang telah disiapkan dalam keadaan steril pada suhu $\pm 50^{\circ}\text{C}$, campuran ini diratakan dengan cara menggoyangkannya, kemudian dinginkan. Setelah dingin, masukkan kertas cakram (diameter 6 mm) yang telah dibasahi sampel ekstrak tumbuhan /hasil fraksinasi dengan konsentrasi 10% b/v dalam etanol absolut. Sebagai kontrol, masukkan

pula kertas cakram yang hanya dibasahi dengan etanol absolut. Inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dengan cara membalikkan cawan petrinya. Adanya daerah bening disekitar kertas cakram menunjukkan uji positif, ukur diameter daerah bening yang terdapat disekitar kertas cakram. Bandingkan dengan beberapa senyawa standar seperti antibiotika yang beredar dipasaran.

3.6.2. Uji aktivitas antijamur metode difusi

Media PDA yang telah steril pada suhu $\pm 50^{\circ}\text{C}$ dituangkan ke dalam cawan petri dibiarkan memadat. Dengan jarum ose goreskan secara zig-zag jamur yang berasal dari agar miring. Biarkan media ini pada suhu 37°C selama 24 jam. Potong dengan ukuran 1 x 1 cm media yang telah ditumbuhi jamur dan masukkan ke dalam larutan water pepton dan uduk sampai spora tersuspensi merata.

Larutan water pepton yang mengandung spora jamur dipipet sebanyak 1 ml ke dalam cawan petri. Tambahkan media cair PDA dengan suhu $\pm 50^{\circ}\text{C}$ sebanyak 15 ml, goyang sampai merata. Setelah media PDA memadat, masukkan kertas cakram yang telah dicelupkan ke dalam sampel berupa ekstrak/ fraksi dari tumbuhan dengan konsentrasi 10% b/v dalam etanol absolut. Sebagai kontrol, masukkan pula kertas cakram yang hanya dibasahi dengan etanol absolut. Inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dengan cara membalikkan cawan petrinya. Ukur diameter daerah bening yang terbentuk.