

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Alat dan Bahan

3.1.1. Alat-alat yang digunakan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut : rotary evaporator, ultrasonik, maserator, lumpang, blender, kromatografi kolom vakum cair, chamber, alat pengukur titik leleh Fisher John, termometer, pipa kapiler, oven, lampu UV, inkubator, autoklaf dan cawan petri serta peralatan gelas yang umum digunakan di Laboratorium Kimia Organik.

3.1.2. Bahan-bahan yang digunakan

Sebagai sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun dari tumbuhan *Quercus gemelliflora* Bl yang dikoleksi oleh lab. Kimia organik bahan alam FMIPA-UR. Bahan yang digunakan adalah n-heksan teknis, etil asetat teknis, metanol teknis, kloroform, etanol absolut, diklorometan, piridin, silika gel 70-230 mesh, plat KLT GF₂₅₄, PDA (Potato Dextrose Agar), NB (Nutrient Broth), NA (Nutrient Agar), water peptone, kertas cakram (diameter 6 mm), silika gel 60 GF₂₅₄ dan alkohol 70%.

3.1.3. Mikroorganisme yang digunakan

Mikroba yang digunakan adalah bakteri *Escherichia coli* (gram negatif), *Staphylococcus aureus* (gram positif) dan fungi *Candida albicans*. Mikroba yang digunakan diperoleh dari koleksi Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi ITB Bandung.

3.2. Penyediaan Sampel

3.2.1. Pengambilan sampel

Cara yang digunakan dalam pengambilan sampel adalah dengan menggunakan pendekatan etnobotani, yaitu pengambilan sampel dilakukan dengan penyeleksian tumbuhan berdasarkan sejarah dan penggunaan tumbuhan tersebut oleh penduduk asli di daerah setempat. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun dari tumbuhan *Quercus gemelliflora* Bl, diperoleh dari

Cerenti Kabupaten Kuantan Singingi Provinsi Riau. Nama spesiesnya diidentifikasi pada lembaga Herbarium Bogoriensis LIPI- Bogor (Eryanti *at al.*, 2006).

3.2.2. Penanganan sampel

Sampel yang diambil dibersihkan dan dipisahkan daun yang segar dengan daun yang terkena jamur. Daun *Quercus gemelliflora* Bi dikering anginkan (tanpa terkena sinar matahari langsung). Daun *Quercus gemelliflora* Bi yang telah dikering anginkan kemudian diblender hingga halus, kemudian ditimbang sampai berat konstan.

3.3. Metoda Pemisahan dan Pemurnian

3.3.1. Isolasi senyawa kimia dari daun tumbuhan *Quercus gemelliflora* Bi

Sampel kering yang sudah halus dari daun *Quercus gemelliflora* Bi dimaserasi dengan pelarut n-heksan selama 1x24 jam. Lalu diultrasonikasi selama 1x30 menit. Kemudian disaring, maserat yang diperoleh ditampung dan pelarutnya diuapkan dengan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental heksan dari pelarut n-heksan. Kemudian residu dikering anginkan dan dilanjutkan proses meserasi dengan pelarut metanol, dengan cara yang sama sampai diperoleh ekstrak total metanol.

3.3.2. Pemisahan dengan kromatografi vakum cair

Untuk memisahkan senyawa-senyawa yang ada dalam masing-masing ekstrak dilakukan fraksinasi dengan menggunakan kromatografi vakum cair. Kolom kromatografi vakum cair yang berdiameter 3 cm dan tinggi 20 cm diisi dengan silika gel 60 GF₃₅₄ hingga mencapai ketinggian lebih kurang 15 cm. Pengisian kolom dilakukan dalam keadaan vakum, agar diperoleh kepadatan maksimum dari fase diam. Ekstrak (sebanyak 5 gram) yang akan difraksinasi dilakukan preadsorpsi dan dimasukkan ke dalam kolom. Selanjutnya dielusi secara bergradien menggunakan pelarut n-heksan, etilasetat, dan metanol. Hasil pemisahan ditampung dalam erlemeyer yang telah diberi nomor.

3.3.3. Pemisahan dengan kromatografi kolom

Fraksi yang diperoleh dari hasil pemisahan dengan kromatografi vakum cair, dilanjutkan pemisahan dengan menggunakan kromatografi kolom. Kromatografi kolom (yang berdiameter 2 cm dan tinggi 30 cm) diisi dengan Silika gel 60 (0.040-0.063 mm) hingga mencapai ketinggian 12 cm. Ekstrak yang akan dipisahkan dilakukan preabsorpsi dan dimasukkan kedalam kolom. Lalu dielusi secara bergradien menggunakan pelarut n-heksana, etilasetat, dan metanol. Guna dilakukan preabsorpsi yaitu agar pemisahan yang didapat lebih bagus. Hasil pemisahan ditampung dalam botol vial yang telah diberi nomor.

3.3.4. Pengujian hasil pemisahan dengan KLT

Fraksi-fraksi hasil pemisahan kromatografi kolom vakum cair dan kromatografi kolom dilakukan uji KLT. Plat KLT diberi garis 1 cm ditepi atas dan tepi bawah, lalu masing-masing fraksi di totolkan pada plat yang telah diberi nomor sesuai dengan nomor vial kemudian dielusi dengan eluen yang sesuai sampai garis atas plat KLT, plat dikeluarkan dan dikeringkan. Untuk melihat noda yang dihasilkan dapat dilakukan dengan penyinaran lampu UV dan pereaksi penampak noda. Selanjutnya ditentukan harga Rf dari masing-masing noda. Vial-vial yang mempunyai harga Rf yang sama digabungkan menjadi satu fraksi untuk dilakukan pemisahan kembali.

3.3.5. Rekristalisasi dan karakterisasi

Jika dari hasil pemisahan didapatkan fraksi berupa kristal yang belum murni, maka dilakukan rekristalisasi untuk menghilangkan kotoran yang melekat pada padatan untuk menghasilkan kristal yang murni. Rekristalisasi dilakukan dengan melarutkan padatan dengan pelarut yang dapat melarutkannya dalam keadaan panas dan tidak larut dalam keadaan dingin. Padatan yang telah larut langsung disaring dan kemudian didinginkan sampai terbentuk kristal yang sempurna. Untuk menentukan kemurnian kristal yang didapat, dilakukan dengan uji titik leleh menggunakan alat Fisher John dan uji KLT, kemudian senyawa murni dikarakterisasi dengan spektroskopi IR, UV, MS dan NMR.

3.4. Uji Aktivitas Antimikrobia

3.4.1. Peremajaan bakteri

Peremajaan bakteri bertujuan untuk meremajakan kembali bakteri dari agar miring ke dalam larutan NB. Media NB yang telah dibuat dimasukkan kedalam tabung reaksi masing-masing 9 mL dan disterilisasi. Jarum ose yang disterilisasi dengan pembakaran digoreskan pada agar miring yang berisi biakan bakteri dan selanjutnya dicelupkan kedalam tabung reaksi yang berisi media NB. Tabung ditutup dengan kapas kemudian diinkubasi dalam incubator pada suhu 37°C selama 24 jam.

3.4.2. Peremajaan jamur

Media PDA yang berada dalam keadaan steril dituangkan kedalam cawan Petri dan dibiarkan beberapa saat hingga memadat. Jamur yang akan diremajakan ditanam kedalam media yang telah disediakan secara zig-zag. Media yang ditumbuhi ini dipotong dengan ukuran 1 x 1 cm dan dimasukkan kedalam tabung yang berisi water peptone yang telah disiapkan, tabung digoyang secara perlahan agar semua spora jamur tersuspensi kedalam larutan.

3.4.3. Uji aktivitas antibakteri dengan metoda difusi

Biakan bakteri dalam agar miring diinokulasi dalam larutan NB (Nutrient Broth) yang telah disiapkan dalam keadaan steril, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Biakan bakteri siap dipakai untuk uji bioaktivitas.

Ke dalam cawan Petri yang sudah disterilisasi, masukkan 1 mL larutan NB yang berisi biakan bakteri, kemudian tambahkan 15 mL NA (Nutrient Agar) digoyang-goyang agar bakteri tersuspensi merata. Media NA dibiarkan memadat, kemudian diletakkan kertas cakram (diameter 6 mm) yang telah dicelupkan kedalam sample yang akan diuji dengan konsentrasi sample 1% (b/v) dalam etanol absolute dan sebagai control adalah kertas cakram yang dicelupkan pada etanol tersebut. Selanjutnya diinkubasi dalam incubator pada suhu 37°C dengan membalikkan cawan petri. Diameter daerah bening disekitar kertas cakram diukur setelah diinkubasi selama 24 jam.

3.4.4. Uji aktivitas antijamur dengan metoda difusi

Larutan water peptone yang mengandung spora jamur dipipet sebanyak 1 mL kedalam cawan Petri. PDA dipanaskan sampai mencair kemudian didinginkan pada suhu 50°C dan dituangkan sebanyak 15 mL kedalam cawan Petri. PDA dibiarkan memadat dan diatasnya diletakkan kertas cakram yang telah dicelupkan kedalam sample yang akan diuji dengan konsentrasi 1% (b/v) dalam etanol absolut dan kertas cakram yang dicelupkan kedalam larutan etanol absolute sebagai kontrol. Cawan Petri dibalikkan dan diinkubasi pada suhu 37°C. Diameter daerah bening disekitar kertas cakram diukur setelah diinkubasi selama 24 jam.