

3.1 Alat dan Bahan

3.1.1 Alat-alat yang digunakan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah peralatan destilasi, neraca analitik, kolom kromatografi, bejana KLT, vial, pipa kapiler, lampu ultraviolet, alat penentu titik leleh Fisher Jones, inkubator, autoklaf, chamber, cawan petri ukuran 120 mm dan 60 mm, jarum ose, vortex-genie 2, pipet mikro 200-1000 μ L dan peralatan laboratorium lainnya yang sesuai dengan prosedur kerja.

3.1.2 Bahan-bahan yang digunakan

Bahan yang digunakan adalah n-heksan teknis, etil asetat teknis, metanol teknis, serium sulfat, etanol absolute, KLT Kiesgel silika gel 60 GF₂₅₄ (230-240 mesh), silika gel 60 (70-230 mesh ASTM), *Nurten Broth* (NB) dehidrat X4341, *Potato Dextrose Agar* (PDA) Difco Laboratories, *Nutrient Agar* (NA) Merck KgaA Germany, *Bacto Peptone Water* (WP) Difco Laboratories, kertas cakram oxoid 1000 Antibiotik MN 827 ATD, alkohol 70 %, aluminium foil dan aquades.

3.1.3. Mikroorganisme yang digunakan

Mikroba yang digunakan adalah bakteri *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, dan jamur *Candida albicans*, *Penicillium sp.*, *Rhizopus oryzae*. Mikroba yang digunakan diperoleh dari koleksi Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi ITB.

3.2 Penyediaan Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun *Tabernaemontana sphaerocarpa* Blume yang merupakan koleksi Laboratorium Kimia Organik, FMIPA UNRI. Penelitian terdahulu yang dilakukan oleh Mamik Suryani (2009) dengan melakukan maserasi daun tumbuhan tersebut menggunakan pelarut metanol, sehingga didapatkan ekstrak total metanol. Selanjutnya ekstrak total metanol di partisi menggunakan metoda kromatografi

vaum cair (VLC). Hasil partisi dengan kromatografi vakum cair (VLC) diperoleh tiga fraksi yaitu fraksi heksan, fraksi etil asetat dan fraksi metanol. Fraksi etil asetat selanjutnya digunakan dalam penelitian ini.

3.3 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Riau, Pekanbaru selama lebih kurang 6 bulan. Pengujian aktivitas antimikrobia lebih kurang membutuhkan waktu sekitar 3 bulan dan 3 bulan berikutnya akan dilakukan uji toksisitas dengan metoda *Brine shrimp lethality*.

3.4 Metoda Pemisahan dan Pemurnian

3.4.1 Pemisahan dengan kromatografi kolom

Untuk memisahkan senyawa-senyawa yang ada didalam fraksi etil asetat dilakukan pemisahan dengan menggunakan kromatografi kolom. Pemisahan dilakukan dengan cara memasukkan secara perlahan-lahan silika gel yang telah dicampurkan dengan heksan ke dalam kolom. Silika gel dalam kolom dibuat padat dan permukaannya jangan sampai kering.

Ekstrak etil asetat yang akan difraksinasi terlebih dahulu dipreadsorpsi dengan silika gel dan dimasukkan ke dalam kolom. Selanjutnya dielusi secara bergradien menggunakan pelarut yang kurang polar terlebih dahulu yaitu heksan, etil asetat, dan metanol.

3.4.2 Pengujian hasil pemisahan dengan KLT

Ekstrak kental etil asetat dan fraksi-fraksi hasil pemisahan kromatografi kolom dilakukan uji KLT dengan cara menotolkan pada plat KLT yang diberi garis 1 cm di bawah dan 0.5 cm di atasnya dengan menggunakan pipa kapiler. Masing-masing fraksi ditotolkan pada plat yang telah diberi nomor sesuai dengan nomor vial, kemudian dielusi dengan eluen yang sesuai hasil KLT ekstrak kasar. Noda dapat dilihat dengan lampu ultraviolet (UV) atau dengan reagen penampak noda. Fraksi-fraksi yang mempunyai harga R_f sama digabungkan dan diuapkan pelarutnya. Selanjutnya setiap fraksi gabungan dilakukan uji aktivitas antimikrobia dan uji toksisitas.

3.5. Uji Aktivitas Antibakteri

3.5.1. Peremajaan bakteri

Peremajaan bakteri bertujuan untuk mengaktifkan kembali bakteri dari agar miring ke dalam larutan NB (nutrient broth). Media NB yang telah dibuat kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi masing-masing 5 ml dan disterilisasikan dalam *autoklaf*. Jarum ose yang sudah disterilkan dengan pembakaran diinokulasi pada agar miring yang berisi biakan bakteri kemudian jarum ose tersebut diinokulasi kembali ke dalam tabung reaksi yang berisi media NB dan dihomogenkan. Tabung ditutup dengan kapas kemudian diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37 °C selama 24 jam.

3.5.2. Uji aktivitas antibakteri dengan metode difusi

Hasil peremajaan bakteri dilanjutkan dengan uji aktivitas antibakteri terhadap sampel uji. Campurkan suspensi bakteri (1 ml) dan NA (13 ml) yang sudah dibuat dalam cawan petri (d=10 cm). Biarkan memadat, kemudian tanamkan kertas cakram yang sudah diserapkan dengan sampel uji di atas permukaan media agar tersebut. Biarkan beberapa menit agar sampel berdifusi ke dalam media agar. Kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37 °C. Perhatikan zona bening yang dihasilkan pada sekitar cakram yang berisi sampel dan ukur diameternya.

3.6. Uji Aktivitas Anti jamur

3.6.1. Peremajaan jamur

Media PDA yang berada dalam keadaan steril dituangkan ke dalam cawan petri dan dibiarkan beberapa saat sehingga memadat atau beku. Jamur yang akan diremajakan ditanam ke dalam media yang telah disediakan secara zig-zag dan diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu kamar. Media yang telah ditumbuhi ini dipotong dengan ukuran 1x1 cm, kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi water pepton yang telah disiapkan. Tabung digoyang secara perlahan agar semua spora jamur tersuspensi ke dalam larutan. Jamur siap untuk diuji.

3.6.2. Uji aktivitas antijamur dengan metoda difusi

Larutan water pepton (WP) yang mengandung spora jamur dipipet ke dalam cawan petri. Potato dextro agar (PDA) yang telah dipanaskan pada suhu 50°C dituangkan ke dalam cawan petri. PDA dibiarkan memadat, di atasnya diletakkan kertas cakram yang telah dicelupkan ke dalam sampel yang akan diuji dengan konsentrasi 10 % (b/v) dalam etanol absolut dan kertas cakram yang dicelupkan pada larutan etanol sebagai kontrol. Cawan petri dibalik dan diinkubasi pada suhu kamar. Diameter daerah hambatan terhadap daerah pertumbuhan jamur diukur setelah diinkubasi selama 24-48 jam.

3.7. Uji Toksisitas (*Brine shrimp lethality test*)

3.7.1. Pembiakan telur *Artemia salina* Leach

Pembiakan telur *Artemia salina* dilakukan dengan mengisi air laut ke dalam suatu wadah persegi dangkal yang telah dibagi menjadi dua sisi yang akan ditutup, sedangkan sisi yang lain dibiarkan terbuka dan diberi cahaya. Biarkan selama lebih kurang dua hari agar telur tersebut menetas. Telur *Artemia salina* yang menetas akan tertarik ke sisi yang terbuka dan terkena cahaya, dan larva *Artemia salina* ini selanjutnya digunakan untuk uji toksisitas.

3.7.2. Pengujian terhadap sampel

Uji toksisitas terhadap ekstrak total etil asetat daun tumbuhan *Tabernaemontana sphaerocarpa* Bl dan hasil fraksi gabungan dari kromatografi kolom dilakukan dengan prosedur sebagai berikut : Sampel dilarutkan dalam metanol dengan perbandingan 10:1. Larutan sampel tersebut diambil menggunakan pipet mikro sebanyak 5 μ L, 50 μ L, 500 μ L dan dimasukkan ke dalam vial dan kemudian larutan tersebut diuapkan sampai bebas pelarut. Setelah pelarut menguap seluruhnya, lalu ditambahkan air laut dan diaduk sampai rata. Dimasukkan 10 ekor larva *Artemia salina* ke dalam masing-masing vial. Toksisitas diukur dalam selang waktu 24 jam dengan menghitung jumlah larva yang hidup. Masing-masing dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan metode Finney's Probit analisis untuk LC₅₀ dengan selang kepercayaan (*confidence interval*) 95%.