

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kimia Organik, jurusan kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Riau selama $\pm$ 6 bulan. Spektra NMR direkam di Pusat Penelitian Kimia LIPI-Serpong.

3.2. Alat dan Bahan

3.2.1. Alat-alat yang digunakan

Alat-alat yang digunakan adalah perangkat destilasi biasa, rotary evaporator Heidolph 2000, kolom kromatografi, neraca analitik, lampu UV, ultrasonicator Kery Pulsatron, autoklaf, inkubator, cawan petri ukuran 120 mm dan 90 mm, vortex-genie 2, pipet mikro 200-1000 μ L, chamber, jarum ose dan peralatan gelas lainnya.

3.2.2. Bahan-bahan yang digunakan

Sebagai sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak metanol dari kulit batang tumbuhan *Polyalthia* sp., diklorometana teknis, metanol teknis, etil asetat teknis, Nutrient Agar, Nutrient Broth, kertas cakram dengan diameter 6mm, silika gel 70-230 mesh, silika gel 60 GF₂₅₄ untuk preparatif, alkohol 70%, bakteri *S. aureus* (gram positif), *E. Coli* (gram negatif), streptomycin sebagai kontrol positif dan plat KLT.

3.3. Rancangan Penelitian

3.3.1 Penanganan sampel

Sampel tumbuhan diambil dari Taman Nasional Bukit Tigapuluh dengan kode koleksi DA-TN 052. tumbuhan yang diambil lengkap organnya, seperti organ vegetatif dan organ generatif. Bahan tumbuhan yang akan digunakan adalah kulit batang tumbuhan, terlebih dahulu daunnya dibersihkan dari kotoran yang



melekat, kemudian dikeringkan tanpa sinar matahari langsung tetapi dengan aliran udara yang baik, setelah itu dipotong kecil-kecil, dirajang dan dihaluskan.

3.3.2. Ekstraksi

Bahan tumbuhan yang berupa serbuk dimasukkan kedalam botol dan dimaserasi lebih kurang 48 jam, kemudian maseratnya dipisahkan. Sebelum dilakukan pemisahan, sampel disonikasi selama 30 menit. Langkah ini dilakukan berulang-ulang sampai maserat yang dihasilkan tidak berwarna lagi. Kemudian maserat diuapkan dengan rotary evaporator sehingga diperoleh ekstrak kental dan ditimbang beratnya.

3.3.3. Pemisahan dan pemurnian

3.3.3.1. Pengujian dengan KLT

Ekstrak kental metanol diKLT untuk menentukan jumlah komponen dalam ekstrak tersebut. Banyaknya komponen ditandai dengan banyaknya noda yang dihasilkan pada plat KLT. Selain untuk menentukan banyaknya komponen juga digunakan untuk mencari eluen dalam pola pemisahan yang bagus pada ekstrak metanol.

3.3.3.2. Pengujian hasil pemisahan dengan KLT dan uji antibakteri

Fraksi-fraksi hasil pemisahan secara partisi diuji dengan KLT. Plat KLT diberikan batas atas dan bawah, masing-masing 1 cm dari atas dan bawah plat. Masing-masing fraksi ditotolkan pada plat KLT sesuai dengan nomor yang telah diberikan, biarkan pelarutnya menguap. Selanjutnya dielusi dengan eluen sampai pada batas atas plat yang telah ditandai kemudian plat diangkat dan dikeringkan eluennya. Tandai noda yang dihasilkan dengan pensil. Jika noda yang di hasilkan tidak tampak bisa dibantu melihatnya dengan lampu UV atau pereaksi penampak noda..

Hasil partisi ekstrak metanol tersebut dilakukan pengujian antimikrobal (uji aktivitas antibakteri) dengan beberapa bakteri. Fraksi yang memberikan aktivitas akan dilanjutkan pemisahan dengan kromatografi kolom.

3.3.3.3. Pemisahan dengan kromatografi kolom

Fraksi yang memberikan aktivitas terhadap uji antibakteri dilanjutkan pemisahan dengan kromatografi kolom. Kolom dapat dibuat dengan membuat bubur silika yang berfungsi sebagai zat penyerap, dengan cara merendam silika tersebut dengan heksan dan diaduk rata, kemudian dituangkan kedalam kolom dengan perlahan sampai dengan ketinggian 15 cm. Silika gel dalam kolom dibuat padat dan permukaannya jangan sampai kering. Ekstrak yang akan dipisahkan dilakukan preadsorpsi dan dimasukkan kedalam kolom. Lalu dielusi secara bergradien menggunakan pelarut n-Heksan, etil asetat, dan metanol. Hasil pemisahan ditampung dalam botol vial yang telah diberi nomor.

3.3.3.4. Rekristalisasi

Setelah didapat komponen berupa padatan yang masih kotor maka dilakukan rekristalisasi untuk menghilangkan pengotor sehingga didapatkan senyawa yang murni. Cara melakukan rekristalisasi adalah dengan melarutkan kristal (zat padat) yang akan direkristalisasi dalam pelarut yang melarutkan kristal dengan baik dalam keadaan panas dan tidak larut dalam keadaan dingin. Filtrat yang didapat kemudian didinginkan sampai terbentuk kristal yang sempurna. Kristal disaring dengan penyaring *Buchner* dan dicuci dengan pelarut yang dingin dan dikeringkan sampai kristal terbentuk sempurna.

3.3.3.5. Uji kemurnian

Hasil rekristalisasi diuji dengan KLT dalam berbagai sistem eluen, jika menghasilkan satu noda berarti kristal tersebut sudah murni. Uji kemurnian yang lain dengan melihat titik lelehnya dengan menggunakan alat penentu titik leleh Fisher Jones. Pembacaan titik leleh dimulai saat kristal mulai meleleh sampai habis meleleh semuanya. Jika selisih harga titik lelehnya kecil atau sama dengan 2°C maka senyawa tersebut sudah murni

3.3.4. Uji aktivitas antibakteri

3.3.4.1. Peremajaan bakteri

Peremajaan bakteri bertujuan untuk mengaktifkan kembali bakteri dari agar miring ke dalam larutan *NB* (*nutrient broth*). Media *NB* yang telah disiapkan dimasukkan ke dalam tabung reaksi masing-masing sebanyak 9 ml, dan ditutup dengan kapas yang telah disterilkan dengan menggunakan autoklaf. Dengan menggunakan jarum ose yang telah disterilkan goreskan pada agar miring yang berisi biakan bakteri. Selanjutnya dicelupkan ke dalam tabung reaksi yang berisi media *NB*. Tabung ditutup dengan kapas, kemudian divortex, selanjutnya diinkubasi dalam inkubator pada suhu 35°-37°C selama $\pm$ 24 jam.

3.3.4.2. Uji aktivitas antibakteri dengan metode difusi agar

Dimasukkan 1 ml larutan *NB* yang berisi biakan bakteri dan telah diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam kedalam cawan petri yang sudah disterilisasi, kemudian tambahkan 15 ml *NA* (*Nutrient Agar*) digoyang-goyang supaya bakteri tersuspensi merata dan dibiarkan memadat. Kemudian letakkan kertas cakram (diameter 6 mm) yang telah dicelupkan kedalam sampel yang akan diuji dengan konsentrasi sampel 10% (b/v) dalam etanol absolut dan sebagai kontrol adalah kertas cakram yang dicelupkan pada etanol absolut. Selanjutnya dibiarkan selama lebih kurang 30 menit, kemudian diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C dengan membalikkan cawan petri. Setelah diinkubasi selama 24 jam, Perhatikan zona bening yang dihasilkan pada sekitar cakram yang berisi sampel dan ukur diameternya.