

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Bahan dan Alat yang Digunakan

Bahan yang digunakan adalah : sampel daging buah tumbuhan *Tabernaemontana sphaerocarpa* yang merupakan koleksi Laboratorium kimia Organik FMIPA UNRI (Eryanti, dkk., 2004-2005), n-heksan, metanol, etanol absolut, alkohol 70%, *nutrien agar* (NA), *nutrien broth* (NB), *water pepton* (WP), *potato dextrose agar* (PDA), silikagel 60 GF₂₅₄, dan kertas cakram (diameter 6mm).

Bahan hidup yang digunakan adalah : *Artemia salina* Leach, mikroorganisme yang merupakan koleksi Laboratorium Mikrobiologi ITB yaitu *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Candida utilis*, dan *Rhizopus sp*.

Alat-alat yang digunakan adalah : seperangkat alat VLC, inkubator, autoklaf, cawan petri, jarum ose, pipet mikro, *rotary evaporator* dan alat-alat lain yang biasa digunakan di laboratorium.

3.2. Prosedur Kerja

3.2.1. Ekstraksi sampel *Tabernaemontana sphaerocarpa*

1. Sampel daging buah *Tabernaemontana sphaerocarpa* dipotong-potong kecil dan dikering anginkan. Kemudian sampel dihaluskan sehingga diperoleh serbuk halus dengan berat konstan 584.8 gram.
2. Sampel dimaserasi dengan n-heksan, sampai diperoleh maserat yang tidak berwarna. Residu dikering anginkan kembali, kemudian dimaserasi lagi beberapa kali dengan metanol, sehingga diperoleh maserat yang tidak berwarna. Kemudian dievapoarasi sehingga diperoleh ekstrak metanol.
3. Ekstrak metanol sebanyak 5 gram dilakukan *Vacum Liquid chromatography* (VLC) dengan pelarut yang bergradien kepolarannya. Hasil VLC yang didapat sebanyak 11 fraksi.
4. Ekstrak total dan hasil fraksi VLC dilakukan uji antimikrobal dan toksisitas.

3.2.2. Uji aktivitas antimikrobal

3.2.2.1. 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, digoyang perlahan, kemudian dinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam.

3.2.2.2. 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 perlahan agar spora jamur tersuspensi kedalam larutan. Tabung ditutup dengan kapas kemudian dinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam.

3.2.2.3. Uji aktivitas antibakteri dengan metoda difusi

Larutan NB yang mengandung biakan bakteri dipipet sebanyak satu mililiter biakan bakteri yang diremajakan dalam larutan nutrien broth dipipet ke dalam cawan petri. Kemudian 15 ml nutrien agar yang dipersiapkan pada suhu 50°C, dimasukkan juga ke dalam cawan petri. Ratakan dengan cara menggoyang cawan petri agar homogen dan biarkan memadat. Letakkan di atasnya kertas cakram yang berdiameter 6 mm yang telah ditetaskan ekstrak dengan konsentrasi 10% (b/v) dalam etanol absolut lalu dikeringkan. Kertas cakram yang telah ditetaskan sampel ini diletakkan melingkar pada petri. Ditengah-tengah media agar, diletakkan kontrol negatif, yaitu kertas cakram yang ditetaskan dengan etanol absolut yang kemudian dikeringkan. Selanjutnya diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C dengan membalikkan cawan petri. Diameter daerah bening disekitar kertas cakram diukur setelah diinkubasi selama 24 jam.

3.2.2.4. Uji aktivitas antijamur dengan metoda difusi

Larutan water peptone (WP) yang mengandung spora jamur dipipet sebanyak 1 mL ke dalam cawan petri yang sudah disterilkan. PDA dipanaskan sampai mencair kemudian didinginkan hingga suhu 50°C dan dituangkan sebanyak 13 mL kedalam cawan petri. PDA dibiarkan memadat dan di atasnya diletakkan kertas cakram yang telah ditetesi sampel dengan konsentrasi 10% (b/v) dalam etanol absolut dan sebagai kontrol adalah kertas cakram yang ditetesi etanol absolut. Cawan petri dibalikkan dan diinkubasi pada suhu

37°C. Diameter daerah bening disekitar kertas cakram diukur setelah diinkubasi selama 24 jam.

3.2.3. Uji Toksisitas

Uji toksisitas dilakukan terhadap ekstrak total metanol dan fraksi-fraksinya. Telur udang (*Artemia salina* Leach) ditetaskan di dalam wadah persegi dan diisi dengan air laut. Wadah dibagi menjadi dua bagian dengan pembatas plastik yang ditempatkan dua mm di atas dasar wadah. Telur diletakkan dibagian yang dibuat gelap. Pada bagian lain dasar wadah diletakkan lampu dan dibiarkan selama 48 jam agar telur menetas. Udang yang baru menetas akan bergerak menuju cahaya.

Sampel sebanyak 20 mg dilarutkan dalam 2 mL metanol, kemudian dipisahkan masing-masing sebanyak 5 µL, 50 µL, dan 500 µL, lalu pelarut diuapkan hingga mengering. Selanjutnya ke dalam masing-masing wadah ditambahkan 5 mL air laut.

Di masukkan 10 ekor larva udang ke dalam masing-masing sampel yang telah dipersiapkan. Tingkat toksisitas diukur dengan selang waktu 24 jam, dengan menghitung jumlah udang yang hidup. Masing-masing perlakuan dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan metoda Finney's Probit analisis untuk menentukan nilai LC_{50} dengan 95 % *confidence interval*.