

BAB III. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Alat dan bahan

3.1.1 Alat- alat yang digunakan

Alat-alat yang digunakan adalah seperangkat destilasi, pompa vakum, kolom kromatografi cepat dengan diameter 2 cm dan tinggi 39 cm, timbangan analitis, alat pengukur titik leleh Fisher Johns *melting point apparatus*, NMR JEOL tipe ECA 500 dengan medan magnet 500 MHz, autoklaf, inkubator, ingkas (kotak steril), lampu UV model UVL-56, peralatan standar laboratorium lainnya sesuai dengan prosedur kerja.

3.1.2 Bahan-bahan yang digunakan

Bahan-bahan yang digunakan adalah etil asetat teknis, diklorometana teknis, metanol teknis, asetat anhidrat (Merck), piridin (Fisons), etanol absolut, alkohol 70%, silika gel 230-400 mesh (Merck, No. Katalog 1.09385.1000), plat KLT GF₂₅₄ (Merck, No. Katalog 1.05554.0001), streptomisin sulfat (Meiji, No. Batch SS 06406-2), Nutrien Agar (Merck, No. Katalog 1.05450), Nutrient Broth (DIFCO laboratories, No. Katalog 0003-17-8), kertas cakram blank oxoid diameter 6 mm (Testblattchen MN 827 ATD Durchmesser). Pelarut sampel NMR adalah CD₃OD. Sampel total flavanon yang digunakan berasal dari hasil riset Teruna (2006) terhadap daun tumbuhan *Goniothalamus ridleyi*. Mikroba yang digunakan adalah bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Mikroba yang digunakan diperoleh dari koleksi Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi ITB.

3.2 Prosedur Kerja

3.2.1 Pemisahan dan pemurnian senyawa total flavanon

Buat adonan silika gel dengan n-heksana, aduk dan melalui corong masukkan adonan tersebut ke dalam kolom stinggi 15 cm dan kran dalam keadaan terbuka. Masukkan sebanyak 1,029 gram senyawa total flavanon dari ekstrak daun *Goniothalamus ridleyi* yang telah dipreadsorpsi dengan silika gel ke dalam kolom. Segera elusi dengan eluen campuran antara diklorometana dan metanol, mulai dari diklorometana 100% s/d campuran 1 : 9 yang diperoleh dari hasil KLT senyawa

total flavanon. Tampung tetesan yang keluar dari kolom dengan fial bersih dan dapat dipisahkan berdasarkan warnanya. Kristal berbentuk jarum berwarna kuning sebanyak 107,9 mg diperoleh dari hasil kromatografi flash ini. Setelah dilakukan rekristalisasi berulang-ulang menggunakan kombinasi pelarut diklorometana dan etil asetat, maka dihasilkan kristal berwarna kekuningan sebanyak 87,7 mg yang diberi kode GR-8. Disamping itu juga diperoleh senyawa berbentuk kristal jarum berwarna kuning sebanyak 23,3 mg (GR-20). Uji kemurnian senyawa ditentukan dengan kromatografi lapis tipis (KLT) dan pengukuran titik leleh dari padatan tersebut.

3.2.2 Sintesis senyawa asetil pinokembrin (Markham, 1988)

Larutkan 30 mg (0,12 mmol) senyawa pinokembrin dalam 100 μ L piridina dan tambahkan sebanyak 2,68 μ L (0,24 mmol) asetat anhidrat. Biarkan semalam pada suhu kamar dalam labu tertutup. Tuangkan campuran reaksi ke dalam kira-kira 5 mL akuades sambil diaduk, biarkan satu jam. Asetil pinokembrin yang mengendap diisolasi dengan cara diekstraksi menggunakan diklorometana sehingga diperoleh campuran reaksi sebanyak 21 mg. Campuran reaksi yang diperoleh di uji KLT dengan eluen heksana : etil asetat (3:2). Campuran reaksi dipisahkan menggunakan KLT preparatif.

3.2.3 Pemisahan campuran reaksi menggunakan KLT preparatif

Siapkan campuran eluen heksana dan etil asetat dengan perbandingan 3 : 2 dan biarkan menguap pada chamber tertutup agar uapnya menjadi jenuh. Sebanyak 21 mg campuran reaksi dilarutkan dalam metanol dan ditotolkan berupa garis lurus pada salah satu plat silika gel GF₂₅₄ lapisan besar (20 x 20 cm). Masukkan plat ke dalam chamber dan biarkan eluen naik hingga garis akhir sehingga campuran akan terpisah menjadi beberapa pita. Pita dapat dilihat dengan bantuan lampu UV. Adsorben yang mengandung pita dikerok dari plat. Kemudian dielusi dari adsorben dengan pelarut metanol.

3.2.4 Uji aktivitas antibakteri

3.2.4.1 Peremajaan bakteri

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

3.2.4.2 Uji aktivitas antibakteri dengan metode kertas cakram

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

Masukkan 1 mL larutan NB yang berisi biakan bakteri ke dalam cawan petri yang sudah disterilisasi, 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 ditetesi sampel yang akan diuji dengan massa 60, 80 dan 100 µg dalam etanol absolut dan sebagai kontrol negatif adalah kertas cakram yang ditetesi etanol absolut tersebut. Untuk mendapatkan sampel sebanyak 60, 80 dan 100 µg, sebanyak 1 mg sampel dilarutkan dalam 1 mL larutan etanol absolut. Dari volume 1 mL larutan tersebut, dipipet berturut-turut sebanyak 60, 80 dan 100 µL larutan sampel dengan pipet mikro. Dibiarkan selama 30 menit agar sampel berdifusi. Selanjutnya diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C dengan membalikkan cawan petri. Setelah diinkubasi selama 24 jam, ukur diameter daerah bening di sekitar kertas cakram.