

III. METODOLOGI

Penelitian ini adalah pengujian aktivitas antimikrobia dari ekstrak tumbuhan. Penelitian dilakukan di Taman Nasional Bukit Tiga Puluh, Kabupaten Indragiri Hulu, Propinsi Riau. Daerah ini terletak lebih kurang 250 km sebelah tenggara Pekanbaru, dengan pusat kegiatan di hutan sekitar Desa Siambul. Mayoritas suku yang mendiami lokasi ini adalah suku Talang Mamak dengan kategori termasuk salah satu suku terasing di Propinsi Riau.

Bukit Tiga Puluh telah menjadi Taman Nasional Sejak tahun 1994. Satu-satunya institusi yang mengelola saat ini adalah Word Wildlife Fund (WWF). Universitas Riau sebagai salah satu institusi penelitian pernah mengadakan penelitian di hutan ini pada tahun 1995, 1996, 1997 dan bersama Departemen Kesehatan RI, IPB, UI dan LIPI melakukan ekspedisi penelitian yang diberi nama Ekspedisi Biota Medika pada tahun 1998.

Metoda yang digunakan adalah metoda isolasi dengan bantuan uji aktivitas (*biologically guided isolation*).

3.1. Bahan-bahan

Bahan-bahan yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah amonium hidroksida pa, asam asetat anhidrida pa, asam asetat glasial pa, asam sulfat pa, asam klorida pa, serbuk Mg, bismut sub nitrat pa, kalium iodida pa, raksa (II) klorida pa, besi (III) klorida pa, natrium hidroksida pa, etanol 96%, kloroform, kertas karton, label spesimen, plastik besar dan kecil, medium PDA, NA, SDA, mikroba *Bacillus cereus*, *Bacillus*

subtilis, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* dan *Penicillium sp.*

3.2. Peralatan

Alat yang digunakan untuk melakukan survei ini adalah sebagai berikut; kapak, parang, gunting bunga, gunting kertas, lumpang, tabung reaksi, corong, pipet tetes dan plat tetes, cawan petri, inkubator, inkas dan ose.

3.3. Cara kerja

Dalam penelitian tahap-tahap yang dilakukan merujuk kepada prosedur dalam suatu survei fitokimia dan skrining senyawa antimikrobia. Tahap-tahap ini meliputi:

3.3.1. Koleksi sampel

Sampel yang dikoleksi adalah tumbuhan rendah dan tinggi. Diusahakan tumbuhan yang dikoleksi memiliki organ generatif yang lengkap.

3.3.2. Uji kimia lapangan

Uji lapangan yang dilakukan adalah uji alkaloida dengan menggunakan pereaksi Mayer.

3.3.3. Wawancara

Wawancara dilakukan untuk mengetahui manfaat tumbuhan yang dikoleksi. Wawancara dilakukan secara informal, mengingat responden adalah suku terasing. Untuk menjamin validitas data dilakukan cross check dengan penduduk asli lainnya.

3.3.4. Pengawetan herbarium

Herbarium diawetkan dengan menggunakan etanol 70%. Pengawetan ini dilakukan selama 3 hari.

3.3.5. Pengeringan sampel

Sampel yang diuji dikering-anginkan hingga diperhitungkan kadar air yang tersisa cukup rendah.

3.3.6. Uji kimia laboratorium

Pengujian kimia dilakukan dengan metoda Simes yang telah dimodifikasi. Golongan senyawa yang diuji adalah golongan alkaloida, flavonoid, terpenoid/steroid, saponin dan fenolik lainnya.

3.3.7. Pengeringan herbarium

Pengeringan herbarium dilakukan dengan menggunakan oven pada suhu 70°C.

3.3.8. Mounting dan labelling herbarium

Spesimen yang telah kering ditempelkan dengan cara menjahitkan pada selembar karton. Kemudian spesimen ini diberi label.

3.3.9. Identifikasi spesimen herbarium

Spesimen diidentifikasi pada Herbarium Bogoriense, Balitbang Botani, Puslitbang Biologi, LIPI Bogor.

3.3.10. Inventarisasi data

Data yang terkumpul ditabulasi dalam sebuah tabel yang berisi No. Koleksi, Nama Spesies, Famili, Nama Daerah, Manfaat/Khasiat, Bagian yang digunakan, Kandungan Kimia.

3.3.11. Ekstraksi

Sampel yang memiliki kandungan metabolit sekunder yang relatif tinggi diuji aktivitas antimikrobal pendahuluan.

3.3.12. Uji Antimikrobal Pendahuluan

Uji antimikrobal pendahuluan ini dilakukan dengan metoda difusi terhadap tiga bakteri dan dua jamur. Konsentrasi dari ekstrak sampel adalah 10% b/v.

3.3.13. Isolasi Komponen Aktif

Isolasi dilakukan hanya pada sampel yang memiliki aktivitas antimikrobal yang cukup kuat yaitu sampel yang memiliki diameter hambatan sama dan lebih besar dari 10 mm. Metoda isolasi yang digunakan adalah kromatografi kolom polaritas bertingkat (*step gradient polarity*).

Sampel di-defatting dengan n-heksana. Ekstrak n-heksana ditampung dan dievaporasi dengan rotary evaporator. Sedangkan residunya dimeserasi dengan metanol secara berulang-ulang. Ekstrak metanol hasil maserasi dievaporasi dengan rotary evaporator, dan diketahui beratnya. Ekstrak kasar ini kemudian diasamkan dengan menambahkan asam sitrat 5% berulang-ulang hingga larutan memberikan hasil negatif terhadap pereaksi penguji senyawa alkaloid. Pengasaman ini bertujuan untuk

memisahkan senyawa alkaloid dan non alkaloid. Fraksi asam ini kemudian dibasakan dengan menambahkan amonia pekat, hingga pH berkisar 10. Selanjutnya dilakukan partisi dengan etilasetat berulang-ulang dengan menggunakan corong pisah, hingga lapisan air bereaksi negatif dengan pereaksi Mayer. Selanjutnya fraksi etilasetat dievaporasi dan diketahui berat ekstrak kasarnya. Kemudian ekstrak ini dipersiapkan untuk pemisahan dengan kolom kromatografi.

Sebelum dilakukan pemisahan dengan kolom kromatografi, sampel di KLT untuk mengetahui kandungan alkaloidnya, dengan cara menotolkan pada plat KLT dengan 5 jenis eluen yaitu campuran n-heksana-etilasetat (5:5), etilasetat, campuran etilasetat:metanol (9:1), (8:2), (6:4).

3.3.14 Uji Antimikrobial Lanjut

Hasil isolasi dilakukan uji antimikrobial lanjut ini juga dilakukan dengan metoda difusi terhadap tiga bakteri dan dua jamur. Konsentrasi dari sampel masing-masing adalah 0.1%, 0.5% dan 1.0%.

3.3.15 Pemurnian

Sampel hasil isolasi yang aktif dilakukan pemurnian. Metoda pemurnian yang dilakukan adalah dengan berbagai metoda kromatografi yang sesuai dan metoda rekristalisasi.

Untuk memisahkan senyawa-senyawa yang terdapat di dalam ekstrak kasar etilasetat dilakukan fraksinasi dengan menggunakan kolom kromatografi. Pada kolom kromatografi terlebih dahulu dibuat bubuk silika gel dengan menggunakan pelarut

n-heksana, diaduk rata dan kemudian dituangkan ke dalam kolom secara perlahan-lahan.

Ekstrak kasar etilasetat yang difraksinasi, terlebih dahulu dipreadsorpsi sebelum dimasukkan ke dalam kolom. Setelah itu dielusi secara bergradien menggunakan pelarut n-heksana, etilasetat dan metanol. Permukaan kolom harus dijaga agar jangan sampai kering. Hasil pemisahan ditampung dalam vial dengan laju tetesan diusahakan konstan.

Vial-vial yang berisi fraksi-fraksi hasil pemisahan kromatografi kolom diuji dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Plat KLT diberi garis 1 cm di atas dan di bawahnya, lalu masing-masing fraksi ditotolkan pada plat yang telah diberi nomor yang sesuai dengan nomor vial, kemudian dielusi dengan eluen yang sesuai, hingga batas atas plat, plat dikeluarkan dan dikeringkan dan diperiksa dengan lampu UV dan reagen penampak noda (reagen Dragendroff). Noda yang tampak diberi tanda, dan selanjutnya ditentukan nilai Rf masing-masing noda. Noda yang memiliki nilai Rf yang sama, digabungkan menjadi satu fraksi, lalu diuapkan lagi dengan pelarutnya. Masing-masing fraksi yang didapat dengan nilai Rf yang berbeda kemudian dilakukan pemurnian.

Rekristalisasi dilakukan dengan melarutkan kristal atau padatan masing-masing fraksi dengan pelarut yang dapat melarutkannya dalam keadaan panas tapi tidak larut dalam keadaan dingin. Kemudian pelarutnya diuapkan sampai setengah pelarut semula. Lalu didinginkan sampai terbentuk lagi kristal sempurna, kristal yang terbentuk disaring dengan menggunakan corong buchner dan dicuci berulang-ulang dengan menggunakan pelarut dingin, kemudian dikeringkan.

3.3.16 Karakterisasi

IV HASIL DAN PEMBAHASAN

Senyawa murni yang diperoleh dikarakterisasi dengan UV, IR, dan bila memungkinkan sekaligus MS dan RMI. Selain itu dilakukan uji titik leleh sebagai acuan tetapan fisik senyawa diperoleh.

3.3.17 Analisis Data

Dari seluruh data dilakukan analisis sehingga terlihat keterkaitan satu data dengan data lainnya dan dapat diambil suatu kesimpulan.

