

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Sampel sponge diperoleh hasil rekoleksi dari perairan Sabang bulan Agustus 2014 dan penelitian dilakukan pada bulan September 2014 sampai dengan bulan Januari 2015 di UPT Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi, Universitas Lampung.

3.2 Alat dan bahan

3.2.1. Alat

Alat gelas yang biasa digunakan di dalam laboratorium, LC-MS Mariner, FTIR Shimadzu IR Prestige 21, NMR Jeol JNMECA 500 MHz, *Rotary Evaporator* Buchi R-210, Inkubator, lampu UV, hot plate, dan timbangan analitik.

3.2.2. Bahan

Bahan yang digunakan adalah *Nutrient Agar* (NA), KLT NP-SiO₂, KLT RP-18, MeOH, EtOH, DCM, *n*-heksana, CHCl₃, H₂SO₄ pekat, serium (IV) sulfat, *n*-butanol, kalium iodida, bismut (III) nitrat, asam tartarat, asam asetat glasial dan aquadest.

3.3 Spesimen Sponge

Sponge *Callyspongia* sp. diambil di perairan Sabang dan kemudian dianalisis ke UPT Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi.

3.4 Spesimen Bakteri Resisten *Escherichia coli*

Bakteri resisten *Escherichia coli* diambil dari pasien RSUD Abdul Moeloek dan dibiakkan di UPT Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi.

3.5 Screening Antibakteri

Uji screening sponge menggunakan media *Nutrient Agar* (NA) sebanyak 2,5 gram dilarutkan kedalam 100 mL aquadest. Kemudian dimasukkan kedalam autoclave bersamaan dengan petri dish, tabung reaksi, cakram (ring) selama 2 jam pada suhu 121°C. Setelah *autoclave* selesai, media NA dituangkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan bakteri resisten *Escherichia coli* kemudian dituang di petri dish dan didiamkan beberapa saat hingga media NA membentuk jell. Kemudian ditambahkan cakram (ring) di media NA dan diberikan DMSO 2% sebagai kontrol negatif dan senyawa sponge sebanyak 50 µL dan chloramphenicol 30 µg/mL sebagai kontrol positif. Petri dish dimasukkan kedalam inkubator selama 18 – 24 jam pada suhu 37°C dan zona hambat pertumbuhan bakteri yang terbentuk disekitar cakram (ring) diukur (Mbah *et al.*, 2012).

3.6 Ekstraksi

Sampel sponge yang diambil langsung dari perairan sabang di potong kecil - kecil dan dikering anginkan dan disimpan untuk proses maserasi. Metode ekstraksi yang digunakan metode maserasi. Didalam wadah tersebut ditambahkan metanol 95% selama 1 x 24 jam (Yeon-Ju *et al.*, 2014). Volume pelarut ekstraksi yang digunakan sebanyak 5 L/Kg sampel dengan tiga kali pengulangan ekstraksi.

3.7 Kromatografi

3.7.1. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Senyawa sponge ditotolkan sedikit pada plat KLT SiO₂ dan dielusi dengan menggunakan pelarut organik. Setelah dielusi, nilai R_f dihitung. Kemudian diberikan zat visualisasi Dragendorf, ninhidrin dan serium sulfat untuk menentukan kelompok senyawa (Harborne, 1984; Silverstein *et al.*, 2005).

3.7.2. Kromatografi Kolom

Sampel sponge diambil beberapa gram dan dielusi menggunakan fasa diam NP-SiO₂ dan RP-18 dengan fasa gerak metanol, chloroform dan etanol yang melalui beberapa tahapan kromatografi kolom. Fraksi-fraksi yang menunjukkan noda bercak diuji bioaktivitasnya (Nicholas and Christopher, 1976; Yeon-Ju *et al.*, 2014).

3.8 Elusidasi Struktur

3.8.1. LC-MS (*Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy*)

Untuk mendapatkan data berat molekul dan formula molekul, senyawa bioaktif yang diperoleh dari beberapa hasil tahapan kromatografi kolom dianalisis menggunakan LC-MS Mariner dengan metode *flow rate* 0,05 mL/min, volume injeksi 2 μ L, eluen metanol.

3.8.2. *Infrared Resonance* (IR)

Untuk mendapatkan informasi mengenai gugus fungsi, senyawa bioaktif yang diperoleh dari hasil *Liquid Chromatography* dianalisis menggunakan FTIR Shimadzu IR Prestige 21.

3.8.3. *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR)

Analisis lebih lanjut penentuan struktur, senyawa bioaktif dianalisis menggunakan NMR Jeol JNMECA 500MHz dengan pelarut CD₃OD; H₂O (¹H NMR) dan CD₃OD (¹³C NMR).