

III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Desember 2014 hingga April 2015 di Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi (LT SIT) Universitas Lampung. Analisis Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) dan spektrofotometer ultraviolet-tampak di LT SIT Universitas Lampung. Analisis inframerah di Laboratorium Kimia Organik Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Gajah Mada.

3.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini, yaitu alat-alat yang sering digunakan pada laboratorium, neraca analitik, seperangkat *rotary evaporator*, satu set perlengkapan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan plat silika dan plat C₁₈, lampu UV, satu set perlengkapan kromatografi kolom, jarum ose, lampu spritus, pinset, mikropipet, ring, *laminar air flow*, inkubator, *autoclave*, kromatografi cair kinerja tinggi, spektrofotometer ultraviolet-tampak dan spektrofotometer inframerah.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak spons dengan kode B05H87, K06K69 dan K01A04 dari koleksi deposit LT SIT Universitas

Lampung, metanol, etil asetat, kloroform, diklorometan, n-heksana, akuades, pereaksi *Dragendorff*, pereaksi serium sulfat, *nutrient agar* (NA), bakteri resisten *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* dan *chloramphenicol*.

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Sampel Spons

Sampel spons yang digunakan pada penelitian ini adalah ekstrak metanol spons B05H87 dengan jenis *Callyspongia* sp. yang berasal dari perairan Biak Papua dan disimpan sebagai stok di Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi Universitas Lampung.

3.3.2 Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*

Bakteri resisten *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* didapatkan dari stok RSUD Abdul Moeloek Bandar Lampung dan dibiakkan di LT SIT Universitas Lampung.

3.3.3 Preparasi Pereaksi

Pada analisis KLT akan digunakan beberapa pereaksi, yaitu *Dragendorff* dan serium sulfat. Pereaksi *Dragendorff* dibuat dengan melarutkan 1,7 gram bismut nitrat dan 20 gram asam tartarat dalam 80 mL aquades (A). Pada wadah lain, sebanyak 16 gram kalium iodida dilarutkan dalam 10 mL akuades (B). Pereaksi *Dragendorff* dibuat dengan melarutkan 2 gram asam tartarat dalam 10 mL akuades dan ditambah larutan A dan B masing-masing 1 mL. Sedangkan pereaksi

serium sulfat dibuat dengan mereaksikan larutan serium (IV) sulfat 10% dengan asam sulfat 15% dengan perbandingan 1:1 (Jork *et al.*, 1990).

3.3.4 Partisi

Pada penelitian ini, ekstrak spons dipartisi sebanyak dua kali. Pertama, ekstrak kasar spons dipartisi dalam campuran pelarut metanol dan n-heksan. Larutan dikocok beberapa kali dalam corong pisah, lalu didiamkan hingga terbentuk dua fraksi. Masing-masing fraksi dipisahkan dan dilakukan pengulangan partisi metanol dengan diklorometan. Ketiga fraksi hasil pemisahan yang diperoleh dipisahkan dengan *rotary evaporator* hingga didapatkan fraksi kering lalu ditentukan berat kuantitatif dari masing-masing ekstrak. Partisi ekstrak spons yang kedua yaitu menggunakan pelarut etil asetat dan metanol.

3.3.5 Analisis Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Analisis KLT dilakukan dengan menotolkan sedikit sampel pada plat KLT dan kemudian dielusi dengan campuran pelarut sebagai eluen. Elusi dilakukan didalam wadah tertutup sehingga eluen bersifat jenuh. Kemudian, kromatogram yang dihasilkan, diamati dengan lampu UV. Analisis kandungan komponen senyawa alkaloid dalam sampel digunakan pereaksi uji spesifik visualisasi KLT. Pereaksi uji visualisasi KLT yang digunakan adalah pereaksi *Dragendorff* dan ditandai dengan timbulnya noda merah jingga pada plat KLT. Sedangkan untuk mengetahui kandungan senyawa organik secara umum dalam sampel digunakan pereaksi serium sulfat yang ditandai dengan noda berwarna coklat kehitaman (Jork *et al.*, 1990).

3.3.6 Fraksinasi Senyawa Alkaloid Menggunakan Kromatografi Kolom

Ekstrak spons difraksinasi menggunakan metode kromatografi kolom. Kolom yang digunakan sebagai fasa diam dan elusi dilakukan secara tepat dengan perbandingan sistem pelarut yang sesuai. Keberadaan komponen dari fraksi yang diperoleh dimonitor kembali dengan metode KLT. Fraksi yang memiliki nilai Rf yang sama akan digabungkan menjadi satu fraksi. Fraksi positif alkaloid dan memiliki kelimpahan paling besar akan ditetapkan sebagai sampel analisis lanjutan, kemudian dimurnikan.

3.3.7 Uji Bioaktivitas Senyawa Bioaktif Terhadap Pertumbuhan Bakteri

Uji antibakteri dilakukan dengan metode difusi agar menggunakan ring. Medium *nutrient agar* (NA) steril dituang secara aseptis ke dalam cawan petri dan dibiarkan menjadi padat sebagai lapisan dasar. Kemudian media NA cair yang telah diinokulasi bakteri uji dituang di atas media NA yang telah memadat, lalu diratakan dan dibiarkan setengah padat sebagai lapisan pembedahan (Mbah *et al.*, 2012).

Cawan kemudian ditanam ring steril yang diletakkan secara aseptis menggunakan pinset steril diatas media NA uji. Kemudian masing-masing ring diisi dengan larutan senyawa uji dan metanol:air (7:3) sebagai kontrol negatif sebanyak 50 μ L. Selanjutnya media NA uji diinkubasi selama \pm 12 jam. Pengamatan dilakukan dengan cara mengukur diameter hambatan pertumbuhan bakteri berupa zona bening yang terbentuk disekitar ring (Mbah *et al.*, 2012).

3.3.8 Analisis Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

Kemurnian senyawa hasil kromatografi kolom dianalisis menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi. Senyawa hasil kromatografi kolom dipekatkan dengan *rotary evaporator* dan selanjutnya dilarutkan dengan eluen metanol. Analisis KCKT tersebut menggunakan kolom C18, detektor *Photo Dioda Array* (PDA) dengan fasa gerak metanol : air (9:1). Hasil KCKT ini berupa kromatogram yang selanjutnya dianalisis berdasarkan puncak-puncak yang terbentuk.

3.3.9 Analisis Spektrofotometri Inframerah

Karakterisasi gugus fungsi pada sampel digunakan spektrofotometer inframerah. Pada spektrofotometer inframerah, senyawa digerus bersama KBr hingga homogen, kemudian dikempa hingga menjadi pelet KBr. Spektrum inframerah yang terbentuk selanjutnya dianalisis berdasarkan ilmu dasar karakterisasi gugus-gugus fungsi senyawa dalam spektrofotometer inframerah.

3.3.10 Analisis Spektrofotometri Ultraviolet-Tampak

Sampel hasil isolasi $2,16 \times 10^{-6}$ g dilarutkan dalam 1 mL metanol. Larutan ini kemudian dianalisis dengan spektrofotometri ultraviolet-tampak. Pelarut yang digunakan diukur serapan maksimumnya. Selanjutnya, larutan dianalisis lebih lanjut dan hasil kromatogram UV-tampak akan dikaji ulang berdasarkan pengetahuan dasar dalam menentukan struktur molekul suatu senyawa kimia terutama gugus ikatan rangkap terkonjugasi yang terdapat dalam komponen tersebut.