

### III. METODOLOGI PENELITIAN

#### 3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian telah dilaksanakan pada bulan Januari 2012 sampai bulan Juni 2012 di Laboratorium Biomasa Terpadu Universitas Lampung.

#### 3.2. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: peralatan laboratorium yang sering digunakan, satu set perlengkapan kromatografi lapis tipis (KLT) dengan plat alumunium silica gel 60F<sub>254</sub> (Merck) dan plat kaca C<sub>18</sub>, inkubator CO<sub>2</sub> *Memmert-Germany/INC-02*, autoclave *Kleinfield-Germany/HV-L25*, jarum ose, lampu spritus, mikropipet, penguap putar vakum *Buchii/R205*, *multivapor Buchii P-12*, lampu UV *Kohler/SN402006*, desikator, neraca analitik *Weigen Hauser*, satu perangkat alat *Medium Pressure Liquid Chromatography Buchii* dengan kolom *sepacore* silika 25 gram, *High Performance Liquid Chromatography Varian 940-LC* dengan kolom C<sub>18</sub> dan Spektroskopi FT-IR *Varian-2000/Scimitar Series*.

Bahan – bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain : sponga *Xestospongia* sp. dengan kode sampel E41 dari koleksi deposit Laboratorium

Biomassa Unila, metanol, diklorometan, akuades, pereaksi Dragendorf, pereaksi  $\text{CeSO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NH}_3$ , n-heksana dan etanol.

### **3.3. Metode Penelitian**

#### **3.3.1. Persiapan sampel sponsa**

Sampel kering sponsa *Xestospongia* sp. diperoleh dari koleksi deposit Laboratorium Biomassa Unila yang diambil dengan teknik *scuba dive* di perairan Kupang, Nusa Tenggara Timur (NTT).

#### **3.3.2. Ekstraksi sampel sponsa**

##### **3.3.2.1. Maserasi**

Sebanyak 100 gram sponsa kering yang telah dipotong kecil – kecil di maserasi 3 kali selama 24 jam dengan 1 liter pelarut metanol teknis (Aoki *et al.*, 2006), lalu disaring untuk memisahkan filtrat dengan residu sponsa. Filtrat dipekatkan dengan mesin pemutar vakum rotavapor BUCHI R-210 pada temperatur  $40^\circ\text{C}$  sehingga diperoleh ekstrak kasar sponsa lalu ditentukan berat kuantitatif dari ekstrak sponsa. Ekstrak ditempatkan dalam wadah tertutup lalu disimpan di tempat yang bersih dan kering hingga mendapat perlakuan lebih lanjut.

##### **3.3.2.2. Ekstraksi cair – cair (partisi)**

Ekstrak metanol sponsa dilarutkan dalam metanol-air yang kemudian ditambahkan n-heksan dan proses dilakukan didalam corong pisah. Larutan dikocok beberapa kali lalu didiamkan hingga terbentuk dua fase. Masing – masing fase dipisahkan dan dilakukan pengulangan partisi

metanol-air oleh pelarut n-heksan sebanyak 3 kali. Fase metanol-air dipartisi kembali sebanyak 3 kali pengulangan dengan diklorometan. Ketiga fase hasil pemisahan yang diperoleh dipekatkan dengan mesin pemutar vakum rotavapor BUCHI R-210 hingga didapatkan ekstrak kering lalu ditentukan berat kuantitatif dari masing – masing ekstrak.

### **3.3.3. Uji pendahuluan ekstrak sponsa menggunakan metode**

#### **Kromatografi Lapis Tipis (KLT)**

Analisis KLT dilakukan dengan menotolkan sedikit ekstrak metanol sponsa pada plat KLT-silika yang kemudian dielusi dengan campuran pelarut metanol dan diklorometan sebagai eluen. Elusi dilakukan didalam wadah tertutup, lalu kromatogram yang dihasilkan diamati dengan lampu UV untuk melihat ada tidaknya gugus ikatan rangkap terkonjugasi dalam sampel. Untuk menganalisis kandungan komponen senyawa alkaloid dalam sampel ekstrak sponsa digunakan pereaksi uji spesifik visualisasi KLT. Pereaksi uji visualisasi KLT yang digunakan adalah pereaksi Dragendorf. Pereaksi ini digunakan untuk mengetahui kandungan alkaloid (gugus N tersier) dalam campuran yang ditandai dengan timbulnya noda merah jingga (*orange*) pada kromatogram KLT. Sedangkan untuk mengetahui kandungan senyawa organik dalam sampel digunakan pereaksi visualisasi spesifik serium sulfat yang ditandai dengan noda berwarna coklat kehitaman.

### **3.3.4. Fraksinasi senyawa alkaloid menggunakan Kromatografi Kolom**

Ekstrak kasar sponsa yang didapat difraksinasi menggunakan metode kromatografi kolom. Kolom yang digunakan dalam kromatografi dibuat

dengan silika gel sebagai fasa diam dan elusi dilakukan secara tepat dengan perbandingan sistem pelarut yang sesuai. Keberadaan komponen senyawa alkaloid dari fraksi yang diperoleh dimonitor kembali dengan metode KLT menggunakan pereaksi visualisasi spesifik Dragendrof. Fraksi yang menunjukkan uji positif alkaloid selanjutnya dilakukan pemurnian dengan teknik MPLC.

### **3.3.5. Pemurnian senyawa alkaloid menggunakan *Medium Pressure Liquid Chromatography* (MPLC)**

Fraksi positif alkaloid hasil pemisahan kolom kromatografi yang diperoleh selanjutnya dimurnikan menggunakan MPLC dengan kolom *Sepacore* silika 25 gram sebagai fasa diam dan diklorometan-metanol sebagai fasa gerak atau eluen. Injeksi sampel dilakukan dengan pengaturan laju alir sebesar 5 mL/menit. Detektor yang digunakan adalah detektor PDA (*Photo Diode Array*). Detektor PDA digunakan untuk mendeteksi senyawa – senyawa yang bersifat UV aktif pada bilangan panjang gelombang 210 nm (sistem nonkonjugasi) dan 280 nm (sistem konjugasi) serta senyawa fluoresens pada bilangan panjang gelombang 360 nm. Untuk mempermudah proses penampungan fraksi dari setiap pemisahan kolom MPLC maka digunakan pengumpul fraksi (*Fraction collector*). Proses pemisahan fraksi dari kolom MPLC adalah berdasarkan bentuk dari kromatogram yang dihasilkan detektor PDA dan pengaturan waktu secara manual dengan pengumpul fraksi pada penampungan setiap tabung.

Fraksi – fraksi yang didapat kemudian diuji keberadaan komponen senyawa alkaloid dengan metode KLT menggunakan pereaksi visualisasi spesifik Dragendrof. Untuk mendapatkan fraksi senyawa yang murni dapat dilakukan refraksinasi dengan cara reinjeksi kembali sampel ke dalam alat MPLC.

### **3.3.6. Uji aktivitas senyawa bioaktif alkaloid terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus***

Uji antibakteri dilakukan dengan metode difusi agar menggunakan ring. Caranya media Nutrien Agar (NA) yang telah steril dituang ke dalam cawan. Kemudian media NA cair yang telah diinokulasi bakteri uji dituang di atas media NA yang telah padat, lalu diratakan dan dibiarkan memadat. Cincin yang telah steril diletakkan di dalam media NA uji. Ekstrak senyawa uji, kloramfenikol dan metanol dimasukkan ke dalam cincin yang berbeda, masing-masing cincin diberi sebanyak 50  $\mu$ L. Kemudian media NA uji diinkubasi selama  $\pm$  24 jam dan diamati diameter zona hambat yang dihasilkan dari senyawa ekstrak, kloramfenikol dan metanol. Kloramfenikol digunakan sebagai kontrol positif antibakteri dan metanol sebagai kontrol negatifnya. Bakteri uji yang digunakan yaitu *Staphylococcus aureus*.

### **3.4. Analisis senyawa menggunakan *High Perform Liquid Chromatography* (HPLC)**

Kemurnian dari senyawa alkaloid yang didapat kemudian dianalisis menggunakan HPLC dengan detektor ELSD (*Evaporative Light Scatter Detector*). Kondisi pengaturan HPLC adalah menggunakan fasa gerak metanol-air, fasa diam  $C_{18}$ , volume injeksi sebanyak 2  $\mu$ L dan laju alir 1 mL/menit.

### 3.5. Karakterisasi senyawa menggunakan *Fourier Transform Infrared* (FTIR)

Fraksi senyawa alkaloid yang didapat kemudian diidentifikasi menggunakan spektrofotometri FTIR. Pada spektrofotometri FTIR, senyawa digerus bersama KBr hingga homogen, kemudian dikempa/dipadatkan hingga menjadi pelet KBr. Pelet tersebut diidentifikasi menggunakan spektrofotometer FTIR (Varian/Scimitar 2000). Spektrum hasil analisis FTIR diinterpretasikan dengan memperhatikan karakteristik serapan dari senyawa alkaloid, yaitu ditandai adanya serapan pada panjang gelombang  $3400 - 3200 \text{ cm}^{-1}$  untuk suatu gugus amina primer dengan terbentuknya dua puncak serapan, gugus amina sekunder dengan satu puncak serapan dan amina tersier dengan bentuk serapan melebar. Selain itu, dapat juga diamati bentuk serapan pada daerah sidik jari (*finger print*) pada daerah panjang gelombang  $1650 - 1580 \text{ cm}^{-1}$  *bend* untuk amina primer dan  $910 - 665 \text{ cm}^{-1}$  *wag* untuk amina primer dan sekunder.