III. METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat

Penelitian ini telah dilaksanakan dari bulan Agustus 2012 sampai dengan bulan Februari 2013, dengan tahapan kegiatan, yaitu: preparasi sampel sponga *Xestospongia* sp dan pelaksanaan penelitian mulai dari isolasi, modifikasi, uji bioaktifitas dan karakterisasi struktur yang dilakukan di Laboratorium Biomassa Terpadu Universitas Lampung.

3.2. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah peralatan gelas yang umum digunakan untuk isolasi sampel; seperangakat alat *Medium Pressure Liquid Chromatography* (MPLC) Buchi yang terdiri dari control unit C-620, *fraction collector* C-660, pompa modul C-605, detektor fotometer C-640, dan PC untuk menjalankan *software* SepacoreControl 1.2; satu set perlengkapan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan plat alumunium silica gel $60F_{254}$ (Merck) dan plat kaca C_{18}; inkubator CO_2 *Memmert-Germany/INC*-02, *autoclave kleinfield-Germany/HV*-L25, jarum ose, lampu spritus, mikropipet, *rotavapor* vakum Buchi*/R205*, *multivapor* Buchi *P-12*, lampu UV *kohler/SN402006*, desikator, neraca analitik Weigen Hauser, dan alat untuk elusidasi struktur berupa spektroskopi FT-IR *Varian-2000/Scimitar Series*.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel kering sponga *Xestospongia* sp. yang disimpan di laboratorium Biomassa Unila, metanol, etanol, n-heksan, diklorometan (DCM), etil asetat, akuades, bromin (Br_2), asam asetat glasial, pereaksi Dragendorf, pereaksi serium sulfat, kloramfenikol, dan nutrien agar (NA).

3.3. Metode Penelitian

3.3.1. Sampel Sponga

Sampel sponga yang digunakan pada penelitian ini adalah sampel kering sponga *Xestospongia* sp yang berasal dari perairan teluk Kupang, Nusa Tenggara Timur (NTT) dan disimpan sebagai stok di Laboratorium Biomassa Terpadu Universitas Lampung (UNILA). Sampel sponga kering tersebut terlebih dahulu dipotong-potong menjadi bagian-bagian kecil sebelum dimaserasi lalu ditimbang secara berulang menggunakan *analytical balance*.

3.3.2. Ekstraksi dan Partisi

Sampel kering sebanyak ± 1,23 kg yang telah dipotong-potong menjadi bagian kecil dimaserasi dengan n-heksan sebanyak 20 L selama 1 x 24 jam pada suhu kamar. Ekstrak n-heksan yang diperoleh kemudian dikumpulkan dan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* hingga diperoleh maserat kental berupa residu. Kemudian ekstrak kasar yang diperoleh dipartisi dalam campuran pelarut air dan n-heksan. Sisa sampel kemudian dimaserasi kembali menggunakan pelarut DCM sebanyak 20 L, dan hasilnya disimpan sebagai stok.

3.3.3 Fraksinasi dan Pemurnian

Ekstrak n-heksana hasil partisi, kemudian difraksinasi dengan alat *Medium Pressure Liquid Chromatography* (MPLC) menggunakan fasa gerak campuran antara n-heksan-etanol. Hasil fraksinasi yang diperoleh kemudian dimonitor dengan uji KLT yang divisualisasi dengan pereaksi serium sulfat dan Dragendrof. Fraksi yang memiliki nilai Rf yang sama akan digabungkan menjadi satu fraksi. Salah satu fraksi yang ditetapkan sebagai sampel analisis lanjutan kemudian dimurnikan menggunakan alat MPLC juga dengan fasa gerak n-heksana-etanol dengan jumlah perbandingan yang dapat diketahui dari hasil uji KLT. Proses pemisahan dengan alat MPLC akan dilakukan berulang-ulang hingga diperoleh isolat murni.

3.3.4. Modifikasi dan Karakterisasi Struktur Komponen

Teknik modifikasi struktur yang akan dilakukan adalah halogenasi alfa terhadap gugus karbonil (Fessenden, 1991) dan dilanjutkan dengan substitusi alkil halida (Fessenden, 1982). Pertama kali 114,6 mg sampel terlebih dahulu dilarutkan dalam pelarut DCM-Metanol, kemudian dimasukkan ke dalam labu refluks. Setelah itu ditambahkan larutan asam asetat glasial yang berfungsi sebagai katalis asam dan disusul dengan penambahan beberapa tetes air brom (bromin) hingga terjadi perubahan warna larutan menjadi merah yang berasal dari warna pereaksi bromin. Setelah itu, labu refluks yang telah berisi sampel dan pereaksi dipanaskan diatas *hotplate stirrer* pada suhu ± 50 ºC dan di tunggu hingga reaksi selesai. Untuk mengetahui bahwa reaksi telah selesai, maka dilakukan uji KLT secara bertahap.

Untuk tahap selanjutnya yaitu proses pemurnian senyawa produk menggunakan teknik partisi. Larutan produk yang diperoleh dari hasil reaksi tahap sebelumnnya dipartisi menggunakan pelarut air dan etil asetat dengan perbandingan komposisi 1: 1. Proses partisi dilakukan secara berulang dengan penambahan etil asetat, hingga diperoleh lapisan air yang berwarna bening

3.3.5. Pengujian Aktivitas Antibakteri Dengan Metode Difusi Agar

Pada tahap uji aktivitas antibakteri digunakan sampel fraksi murni (induk) dan sampel hasil modifikasi (produk). Pertama kali Medium Nutrien Agar (NA) steril dituang secara aseptis ke dalam dua cawan petri dan dibiarkan menjadi padat sebagai lapisan dasar atau "*base layer*". Kemudian media NA cair yang telah diinokulasi bakteri uji (*Staphylococcus aureus*) dituang di atas media NA yang telah memadat, lalu diratakan dan dibiarkan setengah padat sebagai lapisan pembenihan atau "*seed layer*".

Kedalam masing-masing cawan kemudian ditanam lima buah cincin yang telah steril yang diletakkan secara aseptis menggunakan pinset steril diatas media NA uji. Kemudian masing-masing cincin diisi dengan isolat murni (2 mg/mL, 0.2 mg/mL dan 0,02 mg/mL) untuk cawan pertama, produk hasil modifikasi (2 mg/mL, 0.2 mg/mL dan 0,02 mg/mL) untuk cawan kedua, dan kemudian dua cincin lain pada masing-masing cawan diisi dengan kloramfenikol sebagai kontrol positif dan metanol sebagai kontrol negatif masing-masing sebanyak 50 μL.

Larutan kloramfenikol dan metanol digunakan sebagai kontrol positif dan kontol negatif. Selanjutnya media NA uji diinkubasi selama ± 24 jam. Pengamatan dilakukan dengan cara mengukur diameter hambatan pertumbuhan bakteri berupa zona bening yang terbentuk di sekeliling cincin.

3.3.6. Karakterisasi Struktur Molekul Dengan FTIR

Untuk karakterisasi struktur molekul, isolat murni dan produk hasil reaksi akan dielusidasi menggunakan FTIR. Spektrum hasil pengukuran ini kemudian dikaji ulang berdasarkan pengetahuan dasar dalam menentukan struktur molekul suatu senyawa kimia terutama gugus fungsi utama yang terdapat dalam komponen tersebut.