

BAB III

METODE PENELITIAN

Pada penelitian ini ekstrak fraksi kloroform dan etanol didapatkan melalui ekstraksi bertingkat soklet menggunakan pelarut n-heksan, kloroform dan etanol. Senyawa alkaloid digaramkan dengan asam sitrat 5% dilanjutkan dengan ekstraksi menggunakan eter, sehingga senyawa alkaloid dan non alkaloid dapat terpisah. Senyawa non alkaloid dari fraksi kloroform dan etanol kemudian diuji aktivitas antibakterinya terhadap *Staphylococcus aureus* secara *in vitro* menggunakan metode *paper disk*.

3.1. Waktu dan tempat pelaksanaan

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia FMIPA dan di Laboratorium Mikrobiogenetika Jurusan Biologi FMIPA, Universitas Diponegoro Semarang pada bulan April– Desember 2004.

3.2. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat-alat gelas, set alat soklet, petri dish, jarum ose, lampu spiritus, autoklaf, inkubator, corong pisah, jangka sorong, neraca analitis dan evaporator putar.

3.3. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan adalah kulit kayu pulai gading yang diambil dari hutan Wanagama Yogyakarta, biakan murni *Staphylococcus aureus*, pelarut n-heksan (teknis), kloroform (teknis), etanol (teknis), asam sitrat 5% (p.a Merck), eter (teknis), kertas saring (Whatman), media Nutrient Agar/NA (Oxoid) dan Nutrient Broth/NB (Oxoid).

3.4. Cara Kerja

3.4.1. Pembuatan ekstrak fraksi kloroform dan etanol

Kulit kayu dicuci bersih kemudian dikeringkan dengan diangin-anginkan, diblender sampai halus dan siap diekstraksi. Tiap fraksi ekstrak didapatkan secara bertingkat dari 400 g serbuk kulit kayu atau residu ekstraksi sebelumnya.

Serbuk kulit kayu diekstraksi dengan pelarut n-heksan menggunakan alat soklet. Ekstraksi dihentikan setelah bahan terekstrak sempurna. Filtrat hasil ekstraksi selanjutnya diuapkan dengan eveporator hingga semua pelarut habis sehingga diperoleh ekstrak fraksi n-heksan kering.

Residu hasil ekstraksi dengan pelarut n-heksan, diekstraksi dengan pelarut kloroform menggunakan alat soklet. Ekstraksi dihentikan setelah bahan terekstrak sempurna. Filtrat hasil ekstraksi kemudian diuapkan dengan evaporator sehingga diperoleh ekstrak fraksi kloroform kering.

Residu hasil ekstraksi dengan pelarut kloroform, diekstraksi dengan pelarut etanol menggunakan alat soklet. Ekstraksi dihentikan setelah bahan terekstrak

sempurna. Filtrat hasil ekstraksi kemudian diuapkan dengan evaporator sehingga diperoleh ekstrak fraksi etanol kering.

3.4.2. Skrinning fitokimia

Terhadap fraksi kloroform dan etanol dilakukan uji golongan kimia meliputi :

1. Senyawa alkaloid

Uji adanya senyawa alkaloid dilakukan berdasarkan metoda Culvenor dan Fitzgerald (1963). Ekstrak ditambah dengan 10 tetes asam sulfat 2 N, kemudian didalamnya tambahkan pereaksi Mayer. Reaksi positif ditandai dengan adanya kabut putih hingga gumpalan ataupun endapan putih.

2. Senyawa flavonoid

Metoda pemeriksaan kandungan flavonoid, terpenoid, steroid, saponin dan senyawa fenolik diadopsi dari Simes et. al. dalam Cit. Nordin, et. al (1985). Ekstrak ditambah serbuk magnesium dan beberapa tetes asam klorida pekat. Terbentuknya warna orange sampai merah menandakan adanya flavonoid.

3. Senyawa fenolik

Ekstrak ditambah dengan larutan FeCl_3 1%, terbentuknya warna biru/ungu menunjukkan adanya kandungan senyawa fenolik.

4. Senyawa saponin

Ekstrak dilarutkan dalam akuades kemudian kocok kuat-kuat dalam sebuah tabung reaksi. Terbentuknya busa yang permanent (± 1 menit) menunjukkan adanya saponin.

5. Senyawa triterpenoid/ steroid

Ekstrak dimasukkan dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan pereaksi *Lieberman-Burchard* yaitu asam asetat anhidrat dan H_2SO_4 yang dimasukkan secara berturut-turut. Terbentuknya warna biru ungu menandakan adanya steroid, sedangkan bila terbentuk warna merah menunjukkan adanya senyawa triterpenoid.

3.4.3. Pemisahan fraksi alkaloid dan non alkaloid

Ekstrak fraksi kloroform kering di atas, selanjutnya dimasukkan ke dalam gelas piala, sambil diaduk ditambahkan asam sitrat 5% hingga pH larutan mencapai pH 3-4. Penambahan larutan asam diulangi beberapa kali sampai larutan tersebut memberikan hasil negatif terhadap reagen penguji alkaloid. Larutan asam yang diperoleh dimasukkan dalam corong pisah dan diekstraksi dengan eter beberapa kali hingga fraksi eter yang terakhir tidak berwarna. Fraksi eter dan asam dipisahkan, fraksi eter ini kemudian diuapkan dengan evaporator sehingga diperoleh ekstrak murni yang merupakan senyawa non alkaloid. Hal yang sama dilakukan pada ekstrak fraksi etanol. Ekstrak murni yang diperoleh, selanjutnya digunakan sebagai bahan uji.

3.4.4. Pembuatan suspensi bakteri

Biakan bakteri ditanam pada media NA miring dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam. Satu ose dari biakan tersebut diinokulasikan ke dalam media NB dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam. Penentuan kerapatan suspensi dilakukan dengan spektrofotometer hingga mendapat transmittan 70% ($\lambda=600$ nm) dengan kerapatan sekitar 10^7 - 10^8 sel/mL.

3.4.5. Pembuatan larutan ekstrak

Dari masing-masing fraksi ekstrak dilakukan pengenceran dengan akuades untuk memperoleh konsentrasi 5%, 10% dan 20% (b/v). Sebelumnya fraksi ekstrak dilarutkan dengan 10 tetes tween-80 agar semua ekstrak terlarut dalam akuades.

3.4.6. Pengujian Antibakteri

Masing-masing senyawa non alkaloid dari fraksi yang berbeda diuji dengan konsentrasi yang berbeda terhadap pertumbuhan bakteri *S. aureus* secara *in vitro*. Satu mililiter suspensi bakteri uji dengan kerapatan 10^7 - 10^8 sel/mL, diinokulasikan pada 15 mL media NA secara tuang ke dalam cawan petri, kemudian diratakan dan dibiarkan memadat. Cakram kertas berdiameter sekitar 1 cm, dicelupkan ke dalam larutan senyawa non alkaloid fraksi kloroform dan etanol dengan konsentrasi 5%, 10% dan 20% (b/v), sebagai kontrol digunakan akuades dan tween-80. Cakram kertas selanjutnya diangkat dan dilewatkan di atas lampu spiritus, kemudian diletakkan di atas permukaan media agar yang telah diinokulasi dengan suspensi bakteri. Pada setiap cawan petri diletakkan 3 buah cakram kertas, 2 cakram kertas

mengandung larutan fraksi ekstrak dengan konsentrasi yang sama sedangkan satu cakram kertas sebagai kontrol. Setelah itu diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu 37°C.

3.4.7. Parameter yang diamati

Parameter yang diamati pada penelitian ini adalah lebar daerah hambatan (cm) dari masing-masing perlakuan pada setiap cawan petri (Pelczar, 1988). Masing-masing perlakuan diulang 4 kali. Diujikan pada satu jenis bakteri, yaitu *S. aureus*.

