



METODOLOGI PENELITIAN

Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Bagian Kimia Hasil Hutan Departemen Hasil Hutan Fakultas Kehutanan IPB, Laboratorium Kimia Analitik Fakultas MIPA IPB, Laboratorium Bioteknologi Hewan Pusat Antar Universitas IPB, Pusat Studi Biofarmaka serta Pusat Penelitian Kimia Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Serpong Tangerang. Penelitian berlangsung dari bulan Januari hingga Agustus 2009.

Bahan dan Alat Penelitian

Bahan utama dalam penelitian ini adalah kulit kayu rambai (*B. Motleyana*) yang diperoleh dari Kabupaten Sanggau Kalimantan Barat dengan diameter pohon sekitar 35 cm. Bahan kimia untuk ekstraksi, fitokimia, fraksinasi, kromatografi kolom dan kromatografi lapis tipis antara lain: etanol 70%, metanol 70%, n-heksan, etilasetat, aquadest, kloroform, amoniak, pereaksi Mayer, pereaksi Liebermann-Burchard, $FECL_3$ dan natrium hidroklorida, lempeng silika gel GF₂₅₄, silika gel 60 F₂₅₄ dan *glass wool*. Bahan untuk analisis antibakteri antara lain media padat dengan komposisi: media agar (bacto tryptone 1%, yeast extract 0.5%, NaCl 1% dan agar 1.5%), media cair (bacto tryptone 1%, yeast extract 0.5%, NaCl 1%), klorampenikol, bakteri *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, dan *Pseudomonas aeruginosa* koleksi Laboratorium Bioteknologi Hewan Institut Pertanian Bogor.

Alat yang digunakan untuk preparasi sampel antara lain oven, *hammer mill*, saringan ukuran 40 dan 60 mesh, eksikator, pinggan porselin. Alat yang digunakan untuk ekstraksi dan fraksinasi antara lain bejana maserasi, kertas Whatman, alat-alat gelas, neraca analitik, refrigerator, *rotary evaporator* Buchi Switzerland B-490, *shaker*, dan *freezedryer*. Alat untuk uji antimikroba antara lain *cork borer*, *microbiological safety cabinet*, lemari pendingin, cawan petri, pipet pasteur, timbangan analitik, inkubator 37⁰C, jarum ose, lampu spiritus dan *shaker incubator*, *Column Chromatography* (CC). Untuk identifikasi senyawa aktif digunakan spektrofotometri FTIR, *Liquid Chromatography Mass Spectroscopy* (LC-MS) dan Nuclear Magnetic Resonance (NMR) JNM ECA 500.



Metode Penelitian

Metode penelitian meliputi beberapa kegiatan sebagai berikut :

Persiapan bahan baku sebagai simplisia

Persiapan simplisia meliputi beberapa kegiatan, yaitu pengumpulan bahan baku, disortasi, pengeringan dan penggilingan kulit batang *B.motleyana* bagian dalam menjadi serbuk dengan ukuran 40-60 mesh.

Penetapan Kadar Air

Penetapan kadar air dilakukan dengan mengeringkan piringan porselin pada suhu $105\pm 3^{\circ}\text{C}$ selama 30 menit. Setelah didinginkan di dalam eksikator kemudian ditimbang. Serbuk kulit kayu sebanyak 3 gram dimasukkan ke dalam piringan porselin kemudian dikeringkan dalam oven selama 3 jam pada suhu $105\pm 3^{\circ}\text{C}$, didinginkan dalam eksikator kemudian ditimbang. Prosedur ini dilakukan berulang-ulang sampai diperoleh bobot yang konstan. Kadar air diukur dengan cara berikut ini :

$$\text{Kadar air (\%)} = \frac{\text{Bobot serbuk} - \text{bobot serbuk setelah dikeringkan}}{\text{Bobot serbuk}} \times 100\%$$

Ekstraksi

Metode ekstraksi yang digunakan adalah maserasi menggunakan pelarut etanol dan air. Maserasi dengan pelarut etanol dilakukan pada suhu ruang selama 24 jam dengan pengadukan sesering mungkin. Perbandingan sampel dan etanol sebesar 1:3. Selanjutnya filtrat etanol dipisahkan dari residunya dengan cara penyaringan dilanjutkan dengan maserasi ulangan selama 4x24 jam. Filtrat dievaporasi dengan rotavapor pada suhu $\pm 40^{\circ}\text{C}$ sehingga diperoleh ekstrak pekat. Maserasi dengan air dilakukan dalam lemari pendingin (4°C) selama 24 jam dan dilanjutkan dengan maserasi ulangan. Hasil maserasi disaring dan filtratnya dikeringbekukan dengan *freezedryer*. Masing-masing ekstrak ditimbang untuk mengetahui rendemennya, dan dilakukan uji fitokimia untuk mengetahui kandungan kimia utamanya (Harborne 1996). Selanjutnya dilakukan uji aktivitas antibakteri terhadap masing-masing ekstrak.

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.

b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



Perhitungan rendemen :

Rumus perhitungan rendemen :

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{\text{Bobot ekstrak (gram)}}{\text{Bobot serbuk yang diekstrak (gram)}} \times 100\%$$

Pengujian Aktivitas Antibakteri

Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan secara *in vitro* terhadap bakteri *S. aureus*, *S. epidermidis*, dan *P. Aeruginosa*, yang meliputi penentuan zona hambat terhadap pertumbuhan bakteri dan penentuan nilai konsentrasi daya hambat minimum (MIC/ *Minimum Inhibitory Concentration*). Pengujian aktivitas antibakteri menggunakan difusi sumur agar ini merupakan modifikasi dari cara yang dilakukan oleh Esimone *et al.* (1998). Pada pengujian aktivitas antibakteri dari ekstrak kulit batang rambai digunakan jenis antibiotik standar yang biasa digunakan dalam pengobatan sebagai kontrol positif, yaitu kloramfenikol.

a. Penentuan zona hambat

Sebanyak 20 μ l kultur bakteri ditanamkan ke dalam media cair 50 ml dan diinkubasi pada temperatur 37⁰C selama 24 jam. Setelah itu dilihat pertumbuhannya dengan membaca tingkat kekeruhan kultur menggunakan alat spektrofotometer pada panjang gelombang 595 nm. Tingkat kekeruhan yang diinginkan adalah OD (*Optical density*) 0.7 dengan jumlah bakteri sekitar 10⁵ cfu/ml. Kultur bakteri yang telah dipersiapkan kemudian dipindahkan secara aseptik sebanyak 10 μ l ke dalam media agar sebanyak 20 ml dan dituang ke dalam cawan petri steril. Media dibiarkan memadat, kemudian dibuat lubang sumur dengan diameter 8 mm. Ekstrak kulit kayu sebanyak 60 μ l dimasukkan ke dalam sumur dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37⁰C (Lampiran 1). Pengamatan zona hambat dilakukan dengan mengukur diameter zona bening (milimeter) yang terbentuk disekitar sumur. Pengujian dilakuan tiga kali ulangan.

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



b. Penentuan Nilai MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) .

Penentuan nilai MIC dilakukan seperti uji aktivitas antimikroba dengan metode difusi agar. Untuk mengetahui nilai MIC, ekstrak yang dimasukkan ke dalam sumur terdiri dari beberapa konsentrasi (25mg/ml – 225 mg/ml). Penghitungan nilai MIC yaitu dengan memplotkan antara konsentrasi ekstrak terhadap nilai kuadrat zona penghambatan. Nilai logaritma dari masing-masing konsentrasi akan dianggap sebagai nilai pada sumbu X dan besar diameter penghambatan yang diperoleh, dikuadratkan dan akan dianggap sebagai nilai pada sumbu Y. Kemudian ditentukan persamaan regresinya dan eksponensial pada nilai X tersebut. Nilai X kemudian disebut sebagai nilai Mt. Besarnya nilai MIC ditetapkan sebagai $\frac{1}{4} \times Mt$ (Bloomfield 1991).

Uji fitokimia

- a. **Uji alkaloid** : 1 gram ekstrak dilarutkan dalam 5ml kloroform dan beberapa tetes amoniak. Fraksi kloroform dipisahkan dan selanjutnya fraksi kloroform diasamkan dengan asam sulfat 2M, kemudian dikocok sehingga terbentuk dua lapisan. Lapisan asam sulfat diteteskan pada lempeng tetes dan ditambahkan pereaksi Dragendorf, Mayer dan Wagner yang akan menimbulkan endapan dengan warna berturut-turut merah jingga, putih dan coklat.
- b. **Uji terpenoid dan steroid** : 1 gram ekstrak dilarutkan dalam 25 ml etanol panas ($50^{\circ}C$), kemudian disaring ke dalam piringan porselin dan diuapkan sampai kering. Residu ditambahkan eter dan ekstrak eter dipindahkan ke dalam lempeng tetes, lalu ditambahkan 3 tetes anhidrida asetat dan satu tetes H_2SO_4 pekat (pereaksi Lieberman-Burchard). Warna merah atau ungu menunjukkan adanya terpenoid dan warna hijau atau biru menunjukkan adanya steroid.
- c. **Uji saponin** : 1 gram ekstrak dilarutkan dalam 100 ml air dan dipanaskan selama 5 menit. Setelah itu ekstrak disaring dan filtrat digunakan untuk pengujian. Uji saponin dilakukan dengan pengucukan 10 ml filtrat dalam tabung reaksi tertutup selama 10 menit. Adanya saponin ditunjukkan dengan terbentuknya buih yang stabil selama 15 menit.

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.

b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang memurnikan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

- d. **Uji tanin** : 1 gram bubuk dilarutkan dalam 5 ml air, kemudian dididihkan selama beberapa menit, lalu disaring. Filtrat yang dihasilkan ditambahkan 5 tetes FECL₃ 1% (b/v). Timbulnya warna biru tua atau hitam kehijauan menunjukkan adanya tanin.
- e. **Uji kuinon** : 1 gram ekstrak ditambahkan 100 ml air, dididihkan selama 5 menit dan disaring. 10 ml filtrat ditambahkan 5 tetes larutan natrium hidroklorida 1N. Apabila terbentuk warna merah menunjukkan adanya kuinon.
- f. **Uji flavonoid**: 1 g ekstrak ditambah metanol sampai terendam lalu dipanaskan. Filtratnya ditambah H₂SO₄. Terbentuknya warna merah menunjukkan adanya senyawa flavonoid

Fraksinasi dan isolasi

Ekstrak terpilih (yang menunjukkan daya hambat paling tinggi) difraksinasi dengan berbagai pelarut dengan tingkat kepolaran yang berbeda (metanol, etil asetat dan n-heksan). Fraksi yang memiliki daya hambat terhadap bakteri uji paling tinggi kemudian diisolasi dengan kromatografi kolom (KK).

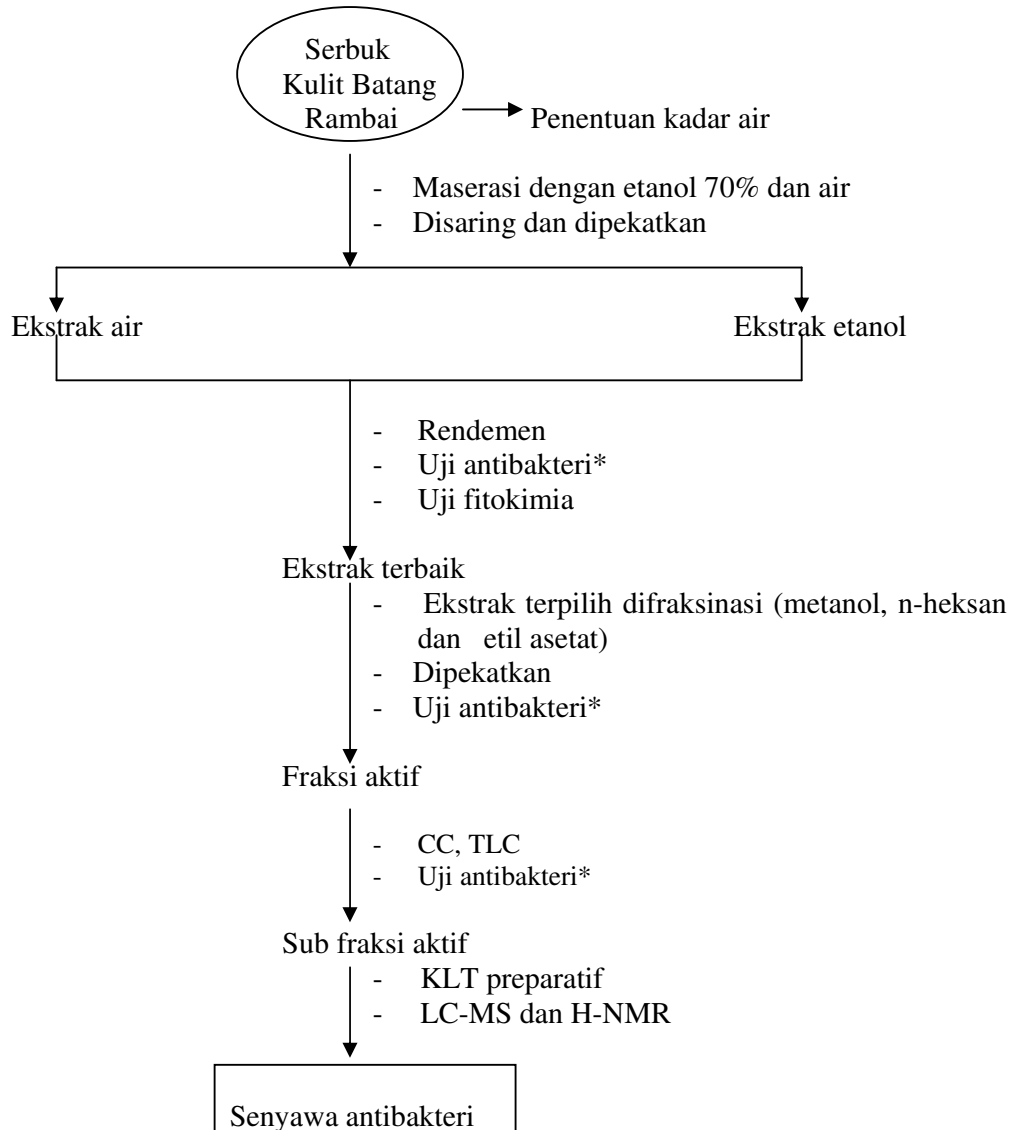
Sebelum melakukan isolasi dengan KK terlebih dahulu dilakukan pencarian eluen terbaik menggunakan kombinasi eluen dengan tingkat kepolaran yang berbeda, sedangkan fraksi yang diperoleh ditotolkan pada plat kromatografi lapis tipis (KLT) dan dimasukkan pada cawan gelas, dilihat jumlah spotnya dibawah sinar UV 254 nm dan 366 nm. Selanjutnya digunakan kromatografi kolom untuk mengisolasi semua komponennya. Kolom dielusi dengan sistem pelarut yang tepat sesuai dengan analisis KLT. Sistem pelarut yang digunakan adalah gradien menggunakan kloroform, metanol, dan air. Fraksi yang keluar dari kolom ditampung dan dianalisis dengan KLT. Fraksi-fraksi dengan pola kromatogram yang serupa disatukan, diuapkan, dan dilanjutkan dengan uji antibakteri untuk memilih subfraksi yang paling aktif.

Identifikasi senyawa aktif

Identifikasi senyawa untuk fraksi terpilih hasil KLT preparatif dilakukan dengan menggunakan spektrofotometri FTIR, kromatogram LCMS dan NMR

sehingga dapat diketahui gugus fungsi, kelompok senyawa dan bobot molekulnya serta kemungkinan peluang ditemukan senyawa baru.

Keseluruhan tahapan penelitian dapat dilihat pada gambar 3.



Keterangan : * diuji terhadap bakteri *S.aureus*, *S.epidermidis*, dan *P.aeruginosa*

Gambar 3. Diagram alir penelitian.