

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Sampel dan Lokasi Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah cabe jawa (*Piper retrofractum* Vahl.) yang dikumpulkan dari kebun percobaan Manoko di Lembang, Jawa Barat. Lokasi penelitian dilakukan di Laboratorium Riset Kimia Hayati FPMIPA Universitas Pendidikan Indonesia. Identifikasi tanaman dan buah cabe jawa dilakukan dengan cara determinasi di *Herbarium Bogoriense*.

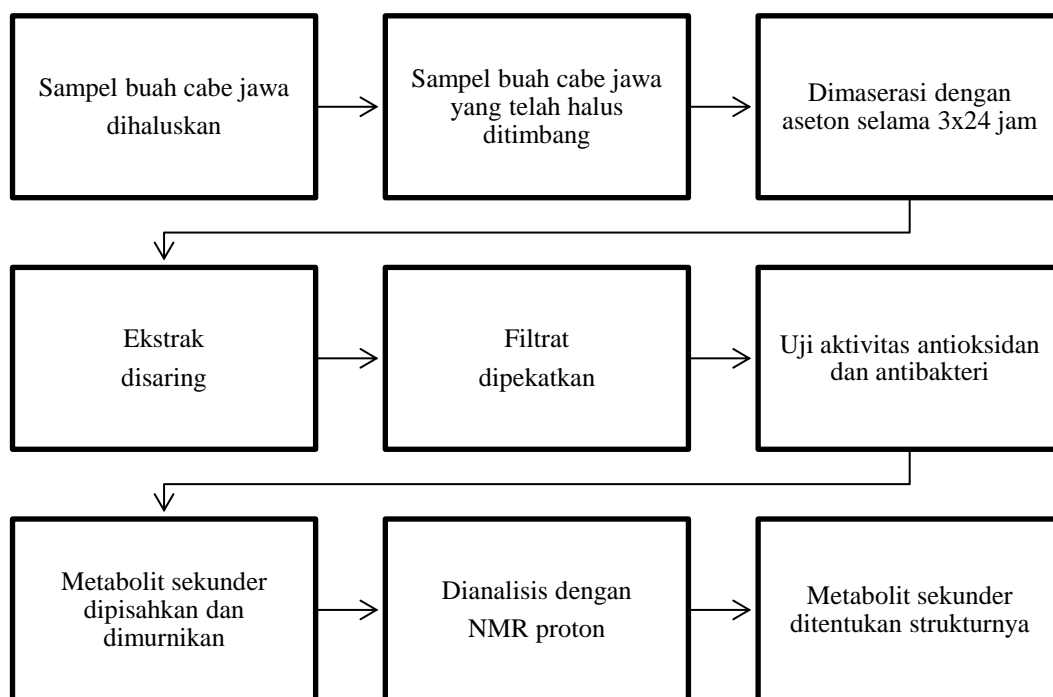
3.2. Alat dan Bahan Penelitian

Pada penelitian ini digunakan beberapa peralatan, antara lain alat-alat gelas, set alat destilasi sederhana, *vacuum rotary evaporator*, set peralatan kromatografi vakum cair, set alat kromatografi lapis tipis, set alat kromatografi radial, dan instrumen *Proton Nuclear Magnetic Resonance* (NMR ^1H). Untuk pengujian aktivitas antioksidan digunakan instrumen spektrofotometer UV-Vis.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yakni pelarut organik berupa aseton, metanol, heksana, dan etil asetat. Untuk keperluan kromatografi lapis tipis dan kromatografi vakum cair digunakan fasa diam silika gel. Untuk uji aktivitas antioksidan digunakan metanol sebagai pelarut dan senyawa 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) sebagai radikal. Untuk uji antibakteri digunakan media *Mueller Hinton Agar* serta bakteri uji *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli*, dan *Pseudomonas aeruginosa*.

3.3. Prosedur Penelitian

Penelitian ini dilakukan melalui beberapa tahap, yakni preparasi sampel, ekstraksi, uji aktivitas biologi, pemisahan dan pemurnian, serta penentuan struktur senyawa sesuai uraian pada **Gambar 3.1**.



Gambar 3.1. Bagan alir penelitian.

3.3.1. Penimbangan Sampel

Sampel buah cabe jawa yang telah kering dihaluskan dengan cara diblender, kemudian ditimbang massanya sebanyak 500 gram untuk selanjutnya diekstrak.

3.3.2. Proses Ekstraksi

Sampel buah cabe jawa yang telah dihaluskan selanjutnya diekstrak dengan cara maserasi. Pelarut yang digunakan adalah aseton. Maserasi dilakukan sebanyak 3x dengan waktu maserasi masing-masing selama 24 jam. Hasil maserasi disaring, kemudian diupkan pelarutnya menggunakan *vacuum rotary evaporator*.

3.3.3. Pemisahan dan Pemurnian Metabolit Sekunder

Pemisahan senyawa diawali dengan uji kromatografi lapis tipis untuk menentukan eluen yang tepat dalam proses pemisahan. Adapun proses pemisahannya dilakukan menggunakan teknik kromatografi vakum cair, sedangkan pemurnian dilakukan dengan KLT preparatif dan teknik kromatografi radial.

3.3.4. Penentuan Struktur Metabolit Sekunder

Penentuan struktur senyawa yang berhasil diisolasi dilakukan menggunakan teknik spektroskopi NMR karbon dan NMR proton di Laboratorium Kimia Instrumen, Institut Teknologi Bandung.

3.3.5. Uji Aktivitas Biologi

Uji aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode DPPH. Sejumlah tertentu larutan ekstrak Cabe Jawa direaksikan dengan larutan DPPH. Setelah diinkubasi selama 30 menit, absorban larutan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 517 nm. Data absorban selanjutnya diolah hingga diperoleh nilai IC_{50} ekstrak Cabe Jawa.

Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi sumur. Media *Muller Hinton Agar* dituangkan ke cawan petri dan ditambahkan biakan bakteri uji. Media yang telah memadat kemudian dibuat beberapa sumur dengan diameter 5 mm. Sebanyak 50 μ L larutan ekstrak dipipet ke dalam sumur tersebut, lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Setelah diinkubasi selanjutnya biakan diamati dan diukur zona hambatannya.