

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan lokasi penelitian

Penelitian ini dilakukan selama 6 bulan. Waktu penelitian dimulai dari bulan Januari 2017 sampai Juni 2017. Lokasi penelitian dilakukan di berbagai tempat, antara lain :

- a. Pusat Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Bogor – LIPI, dilakukan proses determinasi sampel Cabe Jawa.
- b. Laboratorium Riset Kimia Hayati Gedung B Lantai 4 FPMIPA Universitas Pendidikan Indonesia, dilakukan proses ekstraksi, pemisahan, dan pemurnian senyawa.
- c. Institut Teknologi Bandung, dilakukan proses karakterisasi senyawa yaitu pengujian spektroskopi NMR ^1H .
- d. Laboratorium Kimia Instrumen FPMIPA Universitas Pendidikan Indonesia dan Sekolah Farmasi Institut Teknologi Bandung, dilakukan proses uji aktivitas antioksidan dan uji aktivitas antibakteri.

3.2. Alat dan bahan penelitian

3.2.1. Alat

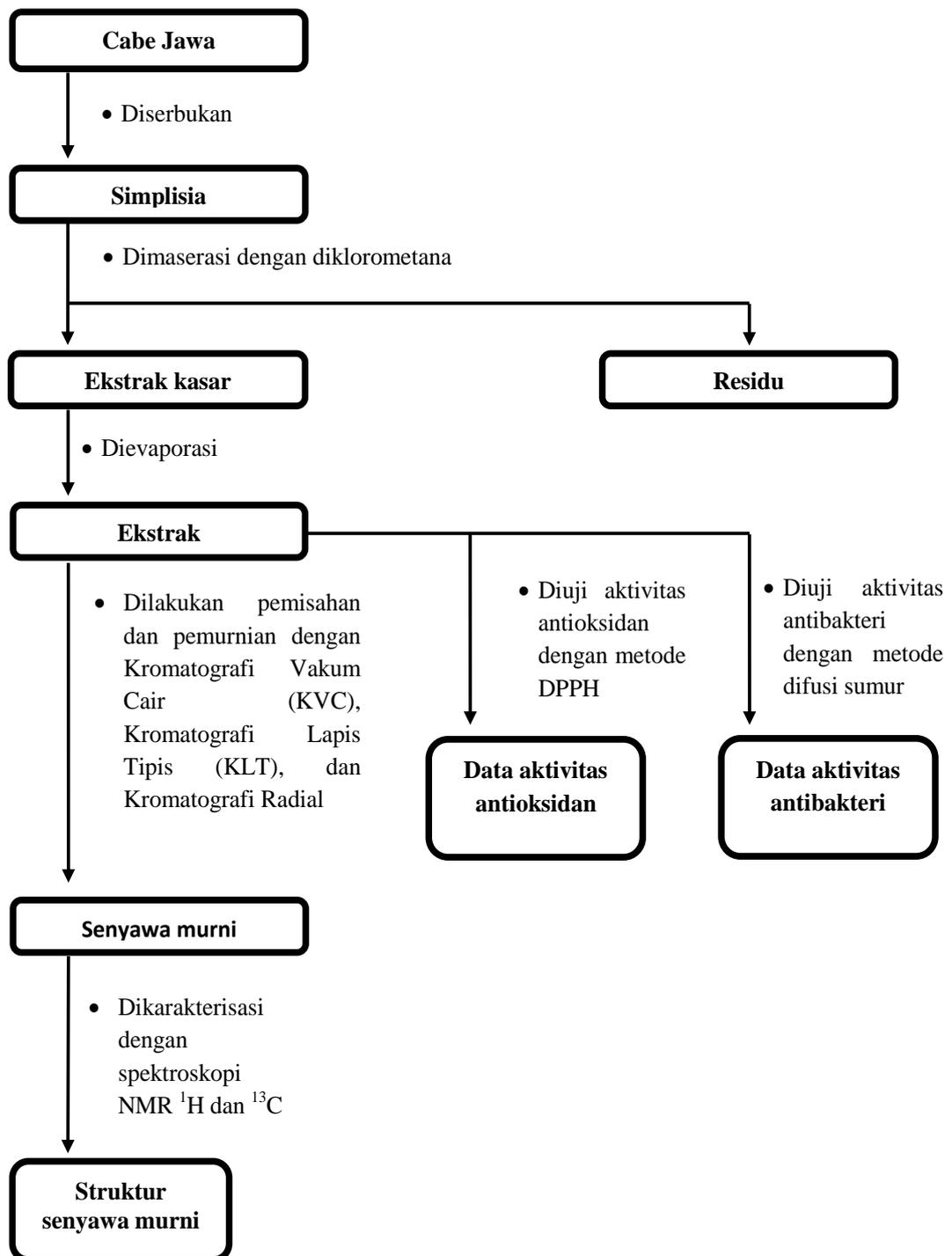
Dalam penelitian ini digunakan beberapa peralatan yaitu alat-alat gelas, labu ukur, pipet volume, mikro pipet, botol vial, cawan petri, kaca pembesar, neraca analitik, set peralatan destilasi, corong *buchner*, *vacuum rotary evaporator*, set peralatan KLT, lampu UV 254 nm, set peralatan KVC dengan kolom berdiameter 7 cm dan 3 cm, set instrumen NMR AGILENT 500 MHz (^1H NMR), NMR 125 MHz (^{13}C NMR), dan set instrumen UV-Vis.

3.2.2. Bahan

Bahan utama yang digunakan pada penelitian ini adalah buah Cabe Jawa (*P. retrofractum*) yang diperoleh dari Kebun Percobaan Manoko, Lembang, Jawa Barat yang diperoleh pada bulan Januari 2017. Bahan kimia yang digunakan antara lain berbagai pelarut organik meliputi diklorometana, metanol, aseton, n-heksana, dan etil asetat dalam grade teknis yang kemudian didestilasi, pelarut metanol, aseton, etil asetat dalam grade pro analisis (p.a), aquades, dan kertas saring. Pada proses pemisahan dan pemurnian digunakan berbagai jenis silika gel, antara lain silika gel Merck 60 (70-230 mesh) untuk kromatografi kolom dan untuk kromatografi lapis tipis digunakan plat KLT silika gel 60 GF254 dengan ketebalan 0,25 mm. Untuk uji aktivitas antioksidan digunakan 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) dan antioksidan sintetik (asam askorbat) sebagai kontrol positif. Selain itu, untuk uji aktivitas antibakteri digunakan media *Mueller Hinton Agar* (MHA), *Mueller-Hinton Broth* (MHB), bakteri *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Pseudomonas aeruginosa*, dan *Escherichia coli*.

3.3. Prosedur penelitian

Pada penelitian ini dilakukan beberapa tahapan yaitu preparasi sampel, ekstraksi sampel, uji aktivitas antioksidan dan antibakteri ekstrak sampel, pemisahan dan pemurnian senyawa, serta karakterisasi senyawa dengan metode spektroskopi. Tahapan penelitian ditunjukkan menggunakan bagan alir, seperti ditunjukkan pada gambar 3.1.



Gambar 3.1. Bagan Alir Penelitian

3.3.1. Preparasi sampel

Sampel tanaman Cabe Jawa yang digunakan adalah bagian buahnya yang diperoleh dari Kebun Percobaan Manoko, Lembang (Jawa Barat) dalam bentuk sudah kering. Sampel ditimbang terlebih dahulu untuk mengetahui massa awalnya, kemudian dihaluskan menggunakan mesin penggiling (blender) sehingga dihasilkan serbuk simplisia buah Cabe Jawa.

3.3.2. Ekstraksi sampel

Serbuk buah Cabe Jawa diekstraksi menggunakan pelarut diklorometana. Teknik ekstraksi yang digunakan yaitu ekstraksi padat-cair dengan metode maserasi. Maserasi dilakukan 1x24 jam pada suhu ruang berulang selama 3 hari dengan penggantian pelarut setiap harinya. Ekstrak hasil maserasi kemudian disaring menggunakan corong *bunchner*, lalu filtrat dipekatkan menggunakan *vacuum rotary evaporator*.

3.3.3. Uji aktivitas antioksidan

Uji aktivitas antioksidan ekstrak diklorometana buah Cabe Jawa dilakukan menggunakan metode DPPH dengan asam askorbat sebagai kontrol positif. Prosedur diambil dari metode yang digunakan oleh Brand Williams dkk pada tahun 1995 dan Djamil Ratna, Anelia dkk pada tahun 2009 dengan modifikasi. Pengukuran aktivitas antioksidan dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 517 nm. Pengujian dimulai dengan cara membuat larutan asam askorbat dengan berbagai konsentrasi yaitu (1, 3, 5, 7, dan 9) ppm. Masing-masing larutan dipipet sebanyak 2 ml ke dalam botol vial, kemudian ditambahkan larutan DPPH 40 ppm dalam metanol sebanyak 1 ml. Campuran dikocok sampai homogen dan diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit, kemudian absorbansi diukur pada panjang gelombang 517 nm.

Pada pengujian ekstrak diklorometana buah Cabe Jawa diperlakukan sama seperti asam askorbat, dengan cara membuat larutan ekstrak dengan berbagai konsentrasi yaitu (200, 400, 600, 800, dan 1000) ppm dan memipetnya masing-

Fissa Viantina Fauzan Azima, 2017

UJI AKTIVITAS BIOLOGI DARI EKSTRAK DIKLOROMETANA BUAH CABE JAWA (*Piper retrofractum*) ASAL JAWA BARAT DAN ANALISIS METABOLIT SEKUNDERNYA

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

masing sebanyak 4 ml ke dalam botol vial, kemudian menambahkan larutan DPPH 50 ppm dalam metanol sebanyak 1 ml. Kontrol yang digunakan yaitu DPPH sebanyak 1 ml dan metanol sebanyak 4 ml. Pengukuran absorbansi sampel pada penelitian ini dilakukan sebanyak tiga kali pengukuran (triplo) yang selanjutnya digunakan untuk menghitung persen inhibisi aktivitas radikal bebas (Q). Persen inhibisi dihitung menggunakan persamaan sebagai berikut :

$$Q = 100 \left(\frac{A_o - A_c}{A_o} \right) \times 100\%$$

Keterangan: Q = Persen inhibisi aktivitas radikal bebas
 A_o = Absorbansi kontrol (pelarut + DPPH)
 A_c = Absorbansi sampel (sampel+DPPH)

Kemudian untuk menentukan nilai IC₅₀ sampel dilakukan dengan cara memplot persen inhibisi aktivitas radikal bebas terhadap konsentrasi sampel sehingga diperoleh suatu persamaan regresi sebagai berikut :

$$Y = mx + c$$

Keterangan: Y = persen inhibisi
 m = *slope*
 x = *intercept* (IC₅₀)
 c = konsentrasi sampel

Nilai IC₅₀ diperoleh dengan memasukkan nilai Y=50 serta nilai m dan c yang diperoleh dari persamaan garis, sehingga nilai x sebagai IC₅₀ dapat dihitung dengan menggunakan persamaan sebagai berikut :

$$IC_{50} = \frac{50 - c}{m}$$

3.3.4. Uji aktivitas antibakteri

Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan beberapa tahapan meliputi persiapan media padat *Mueller Hinton Agar* (MHA), media cair *Mueller-Hinton Broth* (MHB), persiapan suspensi bakteri, dan uji aktivitas antibakteri dengan berbagai konsentrasi dan pengukuran zona hambat. Bakteri yang digunakan

adalah *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Pseudomonas aeruginosa*, dan *Escherichia coli*. Pengujian aktivitas antibakteri ini dilakukan dengan metode difusi sumur.

3.3.4.1. Preparasi media *Mueller-Hinton Agar* dan media *Mueller Hinton Broth*

Pembuatan media *Mueller-Hinton Agar* (MHA) dan *Mueller-Hinton Broth* (MHB) dilakukan dengan cara melarutkan 38 gram media MHA bubuk dan 21 gram media MHB bubuk ke dalam 1 liter aquades kemudian dipanaskan sambil diaduk hingga mendidih untuk melarutkan media secara optimum. Larutan media dimasukkan ke dalam botol penampung yang ditutup dengan kapas dan aluminium foil. Setelah dipanaskan media MHA disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

3.3.4.2. Preparasi larutan ekstrak Cabe Jawa berbagai konsentrasi

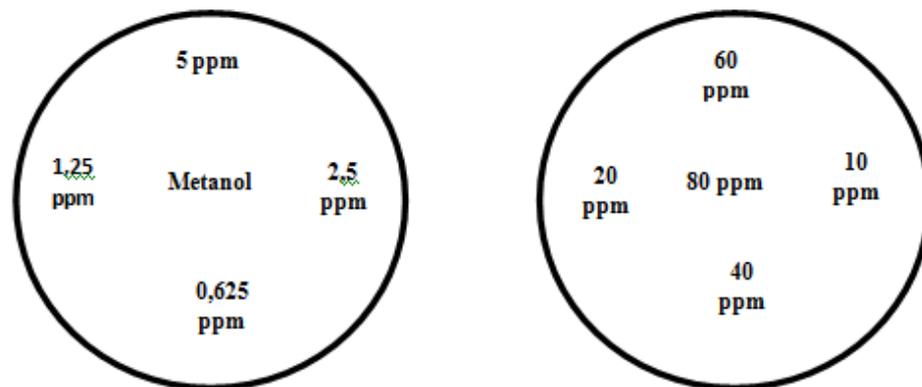
Pembuatan ekstrak Cabe Jawa dilakukan dengan cara melarutkan ekstrak Cabe Jawa sebanyak 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10; 20; 40; 60; dan 80 gram masing-masing dalam 1 ml metanol sehingga menghasilkan berbagai konsentrasi larutan ekstrak 0,625%; 1,25%; 2,5%; 5%; 10%; 20%; 40%; 60%; dan 80%.

3.3.4.3. Preparasi suspensi bakteri (inokulum)

Penyiapan inokulum bakteri uji yaitu *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Pseudomonas aeruginosa*, dan *Escherichia coli* yaitu bakteri uji diinokulasi pada media MHA dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah proses inkubasi, biakan bakteri dalam media MHA dibilas dengan kurang lebih 20 ml media MHB. Transmittan bakteri diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 620 nm hingga menghasilkan absorbansi 0,08-0,12. Suspensi yang telah diukur absorbansinya diencerkan menggunakan media MHA dengan perbandingan 1:20. Suspensi inilah yang kemudian digunakan sebagai inokula.

3.3.4.4. Uji aktivitas antibakteri

Media MHA cair sebanyak 20 μL dimasukkan ke dalam cawan petri steril yang berisi 100 μL suspensi bakteri yang telah diukur absorbansinya antara 0,08-0,12 pada panjang gelombang 620 nm, kemudian dihomogenkan agar bakteri tersebar secara merata. Media agar tersebut didiamkan pada suhu ruang sampai agar memadat. Setelah agar memadat, kemudian dilakukan pembuatan sumur pada media agar dengan diameter 6 mm. Pola pembuatan sumur pada media agar ditunjukkan pada gambar 3.2.



Gambar 3.2. Pola Sumur dalam Media Agar

Ekstrak Cabe Jawa tersebut dimasukkan ke dalam sumur sebanyak 50 μL dan ke dalam sumur juga dimasukkan metanol sebanyak 50 μL sebagai kontrol negatif. Setelah seluruh ekstrak Cabe Jawa dimasukkan dalam sumur kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 20-24 jam. Pengukuran aktivitas antibakteri dilakukan sebanyak dua kali pengulangan (duplo). Aktivitas antibakteri dapat dilihat dengan mengamati zona hambat berupa zona bening yang terbentuk di sekeliling sumur.

3.3.5. Pemisahan dan pemurnian senyawa

Sebelum dilakukan pemisahan, maka dilakukan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) terlebih dahulu untuk mencari eluen yang tepat yang akan digunakan dalam tahap pemisahan senyawa-senyawa dalam ekstrak menggunakan Kromatografi Vakum Cair (KVC). Pelarut yang digunakan yaitu n-heksana dan

Fissa Viantina Fauzan Azima, 2017

UJI AKTIVITAS BIOLOGI DARI EKSTRAK DIKLOROMETANA BUAH CABE JAWA (*Piper retrofractum*) ASAL JAWA BARAT DAN ANALISIS METABOLIT SEKUNDERNYA

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

etil asetat dengan beberapa komposisi perbandingan volume yaitu : n-heksana 100%, campuran n-heksana dan etil asetat 95:5; 90:10; 85:15; 80:20; 75:25; 70:30; 65:35; 60:40; 55:45; 50:50, dengan volume eluen 10 ml setiap kali elusi, sehingga didapat komposisi eluen optimum yang dapat dilihat profil pemisahannya melalui noda pada plat KLT.

Setelah didapatkan komposisi eluen yang tepat selanjutnya dilakukan proses impregnasi ekstrak yang dilarutkan dalam aseton sebanyak 100 mL ke dalam silika gel yang kemudian akan digunakan untuk pemisahan menggunakan KVC. Eluen yang digunakan yaitu n-heksana dan etil asetat dengan beberapa komposisi perbandingan volume yaitu : n-heksana 100% (3 kali elusi), campuran n-heksana dan etil asetat 90:10 (3 kali elusi), 80:20 (4 kali elusi), 70:30 (2 kali elusi), 50:50 (2 kali elusi), dan etil asetat 100% (1 kali elusi) dengan volume 100 ml setiap kali elusi. Hasil fraksinasi menggunakan KVC tersebut diperoleh 15 fraksi.

Fraksi n-heksana dan etil asetat yang telah didapat kemudian di KLT untuk mengetahui profil senyawa yang terdapat dalam setiap fraksi berdasarkan pola noda pada plat KLT. Fraksi-fraksi yang memiliki noda yang mirip kemudian digabungkan sehingga dihasilkan empat fraksi gabungan yaitu fraksi I, II, III, dan IV yang kemudian dipekatkan untuk diketahui massanya dan dilakukan KLT pada setiap fraksi tersebut. Pada fraksi I kemudian dilakukan pemurnian menggunakan Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP) kemudian KLT kembali pada senyawa yang berhasil diisolasi untuk mengetahui senyawa yang diperoleh sudah murni atau belum dengan melihat profil noda pada plat KLT.

3.3.6. Karakterisasi senyawa

Penentuan rumus struktur senyawa murni yang diperoleh dikarakterisasi menggunakan teknik spektroskopi yaitu NMR proton (^1H). Pengukuran dengan NMR proton ini bertujuan untuk mendapatkan informasi mengenai berbagai jenis atom hidrogen yang ada pada senyawa hasil isolasi. Spektrum NMR ^1H memberikan informasi mengenai gambaran jumlah atom hidrogen, jenis atom

hidrogen, dan struktur gugus yang berdekatan dengan setiap atom hidrogen berdasarkan lingkungan kimianya.