

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Januari - Agustus 2017 di Laboratorium Riset dan Laboratorium Kimia Instrumen Departemen Pendidikan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia (FPMIPA UPI). Proses determinasi sampel Cabe Jawa dilakukan di Pusat Konservasi Tanaman Kebun Raya Bogor-LIPI. Uji aktivitas antibakteri dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Sekolah Farmasi ITB dan proses karakterisasi senyawa dengan spektroskopi NMR 1H dilakukan di Institut Teknologi Bandung.

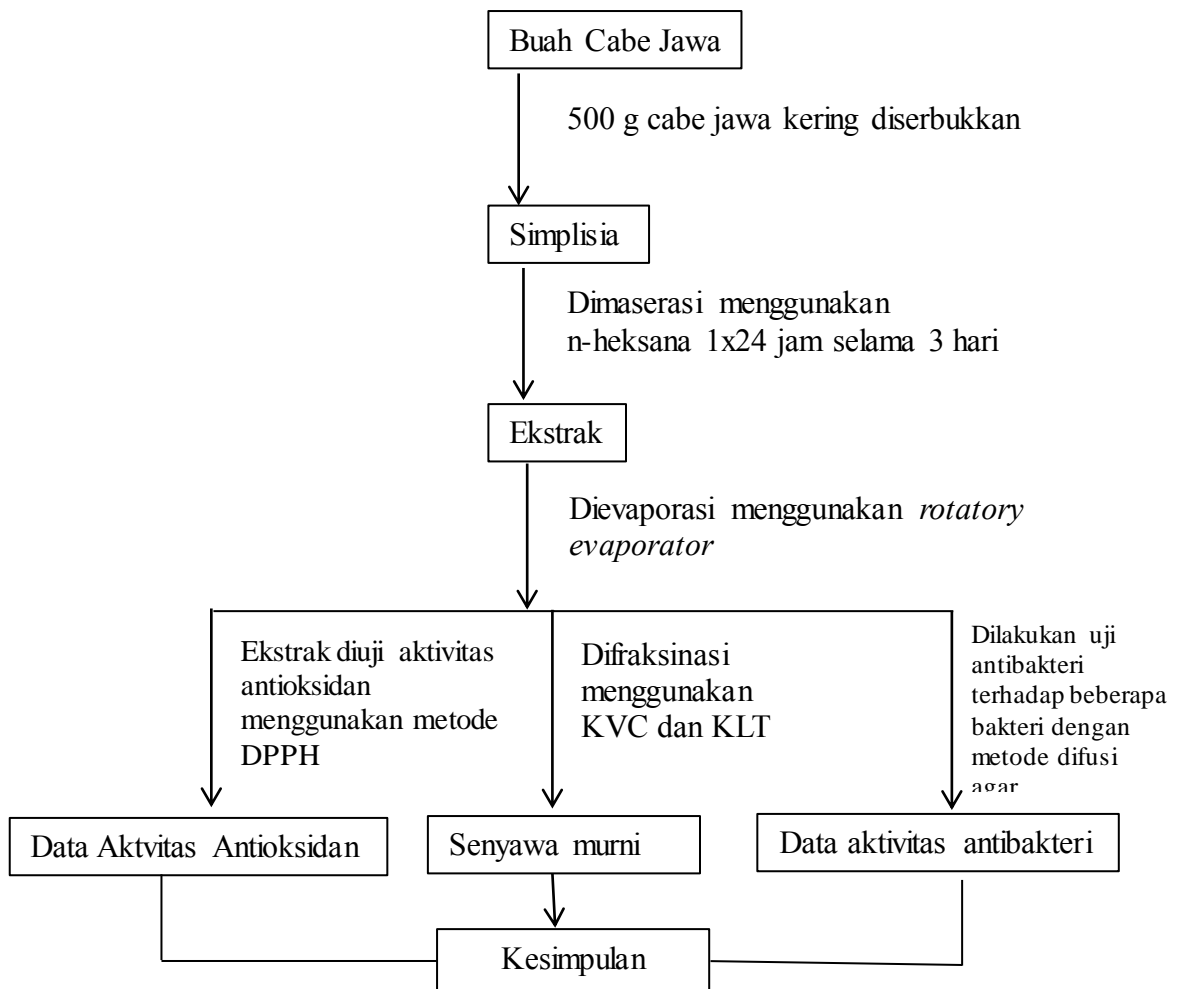
3.2 Alat dan Bahan

Dalam penelitian ini digunakan beberapa peralatan yaitu alat-alat gelas, set peralatan destilasi, corong buchner, *vacuum rotatory evaporator*, set peralatan KVC dengan kolom berdiameter 6,5 cm, set peralatan KLT dan set instrumen NMR AGILENT 500 MHz (NMR 1H).

Sampel yang digunakan berupa tanaman cabe jawa (*Piper retrofractum*) bagian buahnya yang diperoleh dari kebun percobaan Manoko Lembang Jawa Barat. Bahan kimia yang digunakan antara lain berbagai pelarut organik meliputi n-heksana, metanol, diklorometana dan etil asetat yang diperoleh dalam grade teknis (yang kemudian dilakukan destilasi) serta aseton dan kloroform yang diperoleh dalam grade pro analis (p.a), akuades dan kertas saring. Selain itu, digunakan berbagai jenis silika gel, antara lain silika gel Merck 60 (70-230 mesh) untuk kromatografi kolom dan plat KLT silika gel 60 GF254 dengan ketebalan 0,25 mm. Uji aktivitas antioksidan digunakan *2,2-difenil-1-pikrilhidrazil* (DPPH) sebagai oksidan dan asam askorbat sebagai pembanding. Adapun uji aktivitas antibakteri menggunakan Mueller Hinton Agar (MHA) dan Mueller-Hinton Broth (MHB) sebagai media pertumbuhan bakteri. Bakteri yang diujikan terdiri atas *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*., *Pseudomonas aeruginosa* dan *Escherichia coli*.

3.3 Prosedur Penelitian

Penelitian yang dilakukan adalah untuk mengisolasi senyawa metabolit sekunder buah cabe jawa terutama mengisolasi senyawa yang bersifat nonpolar. Tahapan penelitian meliputi ekstraksi, pemisahan dan pemurnian, serta karakterisasi senyawa dengan metode spektroskopi. Tahapan yang dilakukan pada penelitian ini ditunjukkan pada Gambar 3.1.



Gambar 3. 1 Alur Penelitian

3.3.1 Ekstraksi

Sampel yang digunakan pada penelitian ini yaitu buah cabe jawa (*Piper retrofractum* Vahl.) diperoleh dari Kebun Percobaan Manoko-Lembang, yang sudah kering sebanyak 500 gram dan diserbukkan.

Serbuk buah cabe jawa diekstraksi dengan menggunakan pelarut n-heksana. Teknik ekstraksi yang digunakan yaitu ekstraksi padat-cair dengan metode maserasi. Sampel direndam dalam pelarut n-heksana selama 3x24 jam pada suhu ruang dan pelarut diganti setiap 24 jam. Ekstrak hasil maserasi disaring menggunakan corong *buchner*, kemudian dievaporasi menggunakan *vacuum rotary evaporator*. Ekstrak n-heksana hasil evaporasi kemudian diuji aktivitas antioksidan dan antibakteri, serta difraksinasi untuk memisahkan dan mengisolasi senyawa yang akan diambil.

3.3.2 Pemisahan dan Pemurnian

Pada proses pemisahan terlebih dahulu dilakukan pencarian eluen yang cocok dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Setelah diperoleh eluen yang cocok, ekstrak dilarutkan dengan pelarut dan diimpregnasi ke dalam silika untuk dilakukan pemisahan dengan metode Kromatografi Vakum Cair (KVC) yang diameter kolom 6,5 cm. Digunakan berbagai perbandingan eluen sehingga diperoleh beberapa fraksi, selanjutnya dilakukan Kromatografi Lapis Tipis terhadap semua fraksi untuk melihat profil kandungan senyawa yang ada pada fraksi-fraksi tersebut berdasarkan pola noda pada plat KLT. Fraksi-fraksi yang memiliki profil noda yang mirip kemudian digabungkan dan dievaporasi untuk diketahui massanya. Proses pemurnian senyawa digunakan metode kromatografi radial. Kemurnian senyawa yang diperoleh bisa diketahui dengan melihat profil noda pada plat KLT.

3.3.3 Penentuan Struktur Senyawa

Karakterisasi penentuan rumus struktur senyawa murni dilakukan menggunakan spektroskopi NMR ¹H (proton) untuk mengidentifikasi rumus struktur senyawa yang telah berhasil diisolasi.

3.3.4 Uji Aktivitas Antioksidan

Uji aktivitas antioksidan dilakukan untuk mengetahui potensi aktivitas antioksidan dari ekstrak n-heksana buah cabe jawa asal Jawa Barat. Aktivitas antioksidan (aktivitas radikal bebas) ekstrak direaksikan dengan radikal stabil 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) serta vitamin C sebagai standar (kontrol positif). Prosedur diambil dari metode modifikasi yang digunakan oleh (Djamil Ratna *et al.*, 2009).

Sebanyak 2 mg ekstrak n-heksana buah cabe jawa dilarutkan dalam metanol dengan berbagai konsentrasi yaitu 200, 400, 600, 800 dan 1000 µg/mL. Sebanyak 4 mL ekstrak setiap konsentrasi dicampurkan dengan 1 mL larutan DPPH-metanol (50 µg/mL) dan diinkubasi selama 30 menit. Kemudian absorbansi ditentukan pada panjang gelombang 517 nm menggunakan spektrofotometer *UV-Visible*, pengukuran aktivitas antioksidan dilakukan secara triplo dan dari nilai tersebut persentase inhibisi dapat dihitung menggunakan persamaan (Biswas, S. M. *et al.*, 2012).

$$\text{Inhibisi (\%)} = 1 - \frac{\text{Abs}_{\text{sampel}}}{\text{Abs}_{\text{kontrol}}} \times 100$$

Persen inhibisi diplot terhadap konsentrasi dan dari grafik tersebut IC_{50} dapat dihitung menggunakan persamaan :

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

Nilai IC_{50} (*inhibition concentration* 50) adalah konsentrasi antioksidan (µg/mL) yang mampu memberikan persen penangkapan radikal bebas sebanyak 50% dibanding kontrol melalui suatu persamaan garis. Nilai IC_{50} diperoleh dari perpotongan garis antara daya hambatan dan sumbu konsentrasi, kemudian dimasukkan ke dalam persamaan $y = a + bx$, di mana $y = 50$ dan nilai x menunjukkan IC_{50} .

3.3.5 Uji Antibakteri

Uji antibakteri dilakukan menggunakan metode difusi agar, bakteri gram negatif yang digunakan adalah *Escherichia.coli*, *Pseudomonas aeruginosa* dan bakteri gram positifnya yaitu *Staphylococcus aureus* dan *Streptococcus mutans*.

Adapun tahapannya yaitu:

1. Persiapan Inokulum

Inokulum bakteri uji disiapkan (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutan.*, *Pseudomonas aeruginosa* dan *Escherichia coli*), dengan cara sebagai berikut :

- 1). Bakteri uji diinokulasikan pada Mueller Hinton Agar dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam
- 2). Setelah inkubasi, biakan dalam agar dibilas dengan kurang lebih 20 ml media mueller Hinton Broth
- 3). 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 1 : 20 dengan menggunakan media Mueller Hinton Agar.

2. Mueller Hinton Agar

Sebanyak 38 g dilarutkan dengan 1 L akuades. Larutan kemudian dihomogenkan dan disterilasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit.

3. Mueller Hinton Broth

Sebanyak 21 g dilarutkan dengan 1 L akuades. Larutan kemudian dihomogenkan dan disterilasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit.

4. Persiapan Variasi Konsentrasi ekstrak

Variasi konsentrasi ekstrak yang digunakan dalam bentuk persentase diantaranya 80%; 60%; 40%; 20%; 10%; 5%; 2,5%; 1,25% dan 0,625%. Masing-masing konsentrasi dilarutkan dalam 1 ml metanol.

5. Pengujian Aktivitas Antibakteri dengan metode difusi agar

- 1). Inokulum masing masing bakteri diambil menggunakan pipet mikro dimasukkan ke cawan petri
- 2). Masukkan MHA sebanyak 50 ml ke masing masing cawan petri
- 3). Homogenkan dan simpan sampai memadat
- 4). Setelah media padat cetak sumur dengan $d = 5 \text{ mm}$.

- 5). Kemudian pipet 5 μ l variasi ekstrak.
- 6). Disterilisasi pada suhu 37°C selama 24 jam