

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Waktu dan Lokasi Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan selama 6 bulan (Februari–Juli 2019) di Laboratorium Riset dan Laboratorium Kimia Instrumen Departemen Pendidikan Kimia Universitas Pendidikan Indonesia (UPI). Determinasi tumbuhan dilakukan di Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati Institut Teknologi Bandung (ITB) serta Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan di Laboratorium Riset Mikrobiologi Departemen Pendidikan Biologi UPI.

#### **3.2 Alat dan Bahan**

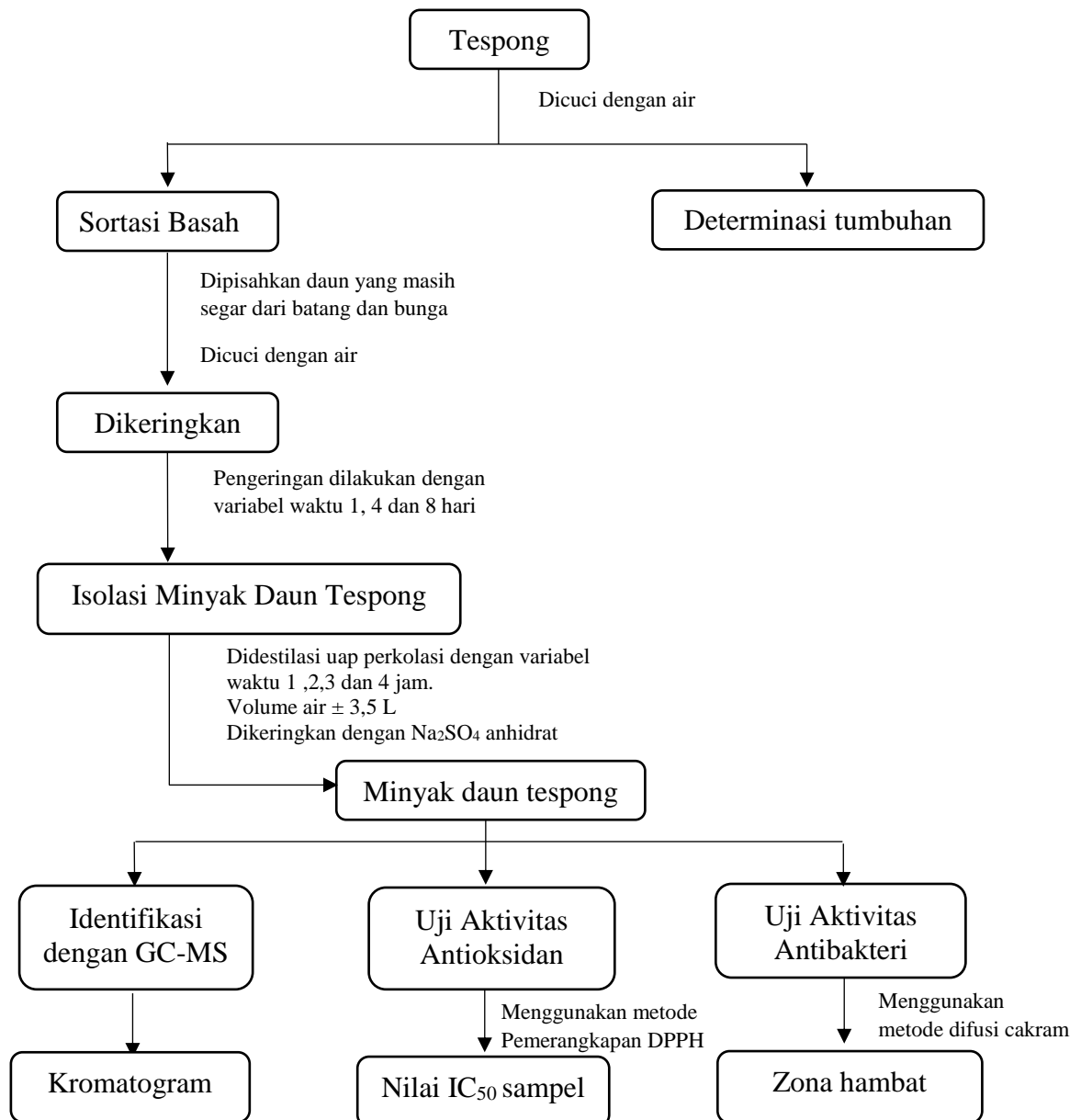
##### **3.2.1 Alat**

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi set alat destilasi uap perkolasi yang terdiri dari tabung destilasi, alat *clevenger*, pendingin Liebig, selang, pompa, kompor gas dan tabung gas, peralatan gelas, botol vial, pipet, cawan petri, pipet volume, *ball filler* aluminium foil, jangka sorong, autoklaf, set alat GC-MS, GC-FID dan Spektrofotometer UV-Vis.

##### **3.2.2 Bahan**

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini aquades, natrium sulfat anhidrat ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), metanol p.a, padatan DPPH (*2,2-diphenyl,1-picrylhidrazyl*), kultur bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*, ampicilin dan etanol 96%. Sampel yang digunakan berupa daun tespong yang diperoleh dari pasar Ciparay, Kabupaten Bandung.

### 3.3 Bagan Alir Penelitian



### **3.4 Tahapan Penelitian**

#### **3.4.1 Determinasi Tumbuhan**

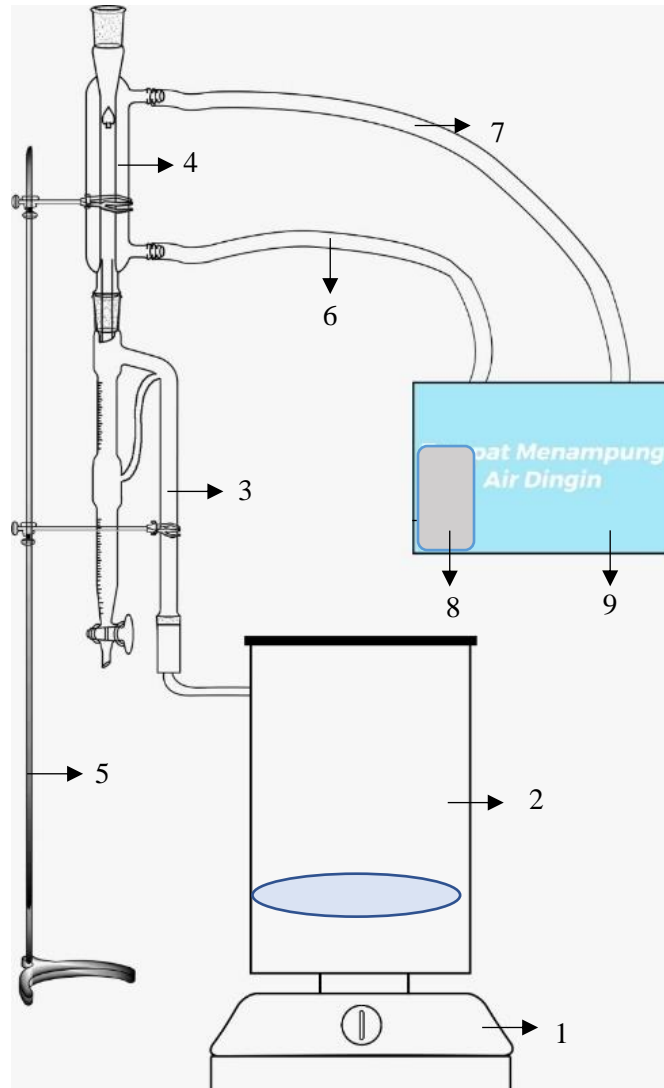
Determinasi tumbuhan tespong dilakukan di Labtek XI Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati ITB, menggunakan tumbuhan tespong dengan ranting sepanjang 30 cm yang lengkap dengan daun dan bunga.

#### **3.4.2 Preparasi Daun Tespong**

Preparasi daun tespong dilakukan dengan cara memisahkan bagian daun dari bagian akar, batang dan bunga. Daun tespong segar dicuci dengan air hingga bersih kemudian ditiriskan. Setelah tiris, daun tespong dikeringkan pada suhu ruang tanpa pemanasan langsung atau secara kering udara.

#### **3.4.3 Isolasi Minyak Daun Tespong**

Isolasi minyak daun tespong dilakukan menggunakan metode destilasi uap dengan modifikasi pada sistem penampung destilat. Pada bagian penampung digunakan alat *Clevenger* yang menerapkan prinsip perkolasi. Oleh karena itu, metode yang digunakan disebut destilasi uap perkolasi. Proses isolasi dilakukan dua optimasi waktu, yaitu waktu destilasi dan waktu pengeringan daun. Skema alat destilasi uap perkolasi ditampilkan pada gambar 6.



Gambar 6. Skema alat destilasi uap perkolasi

Keterangan:

1. Kompor gas
2. Dandang destilasi uap
3. Alat *clevenger*
4. Pendingin Liebig
5. Statif dan Klem
6. Selang air masuk
7. Selang air keluar
8. Pompa air
9. Sumber air pendingin

#### **3.4.3.1 Variabel Waktu Destilasi**

Sebanyak 500 gram daun tespong yang sudah dikeringkan selama 8 hari dimasukkan ke dalam set alat destilasi uap perkolasi. Sampel diisolasi dengan pelarut air sebanyak 3,5 L dengan variabel waktu destilasi 1, 2, 3 dan 4 jam dengan pengamatan selang 30 menit. Minyak yang dihasilkan dikeringkan dengan padatan  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Minyak yang telah dikeringkan disimpan dalam botol kaca berwarna gelap.

#### **3.4.3.2 Variabel Waktu Pengeringan**

Sebanyak 500 gram daun tespong yang sudah dikeringkan dengan variabel pengeringan 1 (basah), 4 (setengah kering) dan 8 hari (kering) dimasukkan ke dalam set alat destilasi uap. Sampel diisolasi dengan pelarut air sebanyak 3,5 L menggunakan waktu destilasi optimal dari variabel yang dilakukan pada 3.3.3.1. Minyak yang dihasilkan dikeringkan dengan padatan natrium sulfat anhidrat ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ). Minyak yang telah dikeringkan disimpan dalam botol kaca berwarna gelap.

#### **3.4.4 Identifikasi Komponen Senyawa Minyak Daun Tespong Menggunakan Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)**

Identifikasi komponen senyawa minyak daun tespong dilakukan secara kualitatif dan kuantitatif menggunakan instrumen GC-MS Shimadzu QP2010 Ultra dengan kolom silika DB5, menggunakan gas pembawa Helium UHP (*Ultra High Purity*) pada tekanan 80,2 kPa dengan laju alir 1,31 mL/menit dan rasio split 200. Suhu injektor di atur pada 230°C dan suhu kolom pada 60°C.

#### **3.4.5 Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode Radikal DPPH (2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl)**

Potensi antioksidan pada minyak daun tespong diuji dengan metode radikal DPPH dan dilakukan pengukuran serapan menggunakan instrumen spektrofotometri UV-Vis, sesuai dengan metode yang digunakan oleh Jabbar (2016) dengan modifikasi.

### 3.4.5.1 Pembuatan Larutan DPPH

Sebanyak 4 mg DPPH ditimbang dan dilarutkan dengan sedikit metanol p.a dalam gelas kimia yang dilapisi aluminium foil. Dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL dan ditambahkan metanol p.a hingga tanda batas.

### 3.4.5.2 Pembuatan Larutan Standar

Larutan standar dibuat dengan melarutkan asam askorbat dalam metanol p.a dengan konsentrasi 1, 3, 5 dan 7 ppm.

### 3.4.5.3 Pembuatan Larutan Uji

Larutan uji dibuat dengan melarutkan minyak daun tespong dalam metanol p.a dengan konsentrasi 5000, 10000, 15000 dan 20000 ppm.

### 3.4.5.4 Pengukuran Absorbansi

Pengukuran dilakukan dengan terlebih dahulu mengukur larutan standar untuk memverifikasi metode yang digunakan. Dilanjutkan dengan pengukuran larutan uji dengan mencampurkan larutan uji dengan larutan DPPH sebanyak 2:1 ke dalam botol vial berlapis aluminium foil, kemudian dihomogenkan dan diinkubasi selama 30 menit dalam ruang gelap, lalu diukur menggunakan instrumen spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 517 nm.

Pengukuran absorbansi pada penelitian ini dilakukan digunakan untuk menghitung persen inhibisi aktivitas antioksidan dengan persamaan sebagai berikut:

$$\%Inhibisi = \left( \frac{A_0 - A_i}{A_0} \right) \times 100\%$$

Keterangan:  $A_0$  = Absorbansi kontrol (DPPH+metanol)

$A_i$  = Absorbansi larutan uji (DPPH+sampel)

Penentuan nilai  $IC_{50}$  sampel dilakukan dengan membuat kurva regresi linear dari persen inhibisi aktivitas antioksidan terhadap konsentrasi larutan uji, sehingga diperoleh persamaan regresi linear sebagai berikut:

$$Y = mx + c$$

Keterangan: Y = persen inhibisi (50)

m = kemiringan (*slope*)

$x = \text{intercept (IC}_{50})$

$c = \text{konsentrasi larutan uji}$

### 3.4.6 Uji Aktivitas Antibakteri Minyak Daun Tespong dengan Metode Difusi Cakram

Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi cakram (*Kirby* dan *Bauer*). Tahap persiapan yang dilakukan terbagi menjadi 3, yakni persiapan alat, persiapan media uji, serta persiapan sampel minyak daun tespong.

Tahap persiapan alat dimulai dengan melakukan proses sterilisasi pada alat-alat yang digunakan dan sterilisasi media tumbuh menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

Tahap persiapan media tumbuh dimulai dengan membuat media tumbuh *Nutrient Broth* (NB) dan *Nutrient Agar* (NA). Sub kultur bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* pada media NA diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Sedangkan kultur cair bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* disiapkan pada media NB dengan cara mengambil bakteri dengan *loop* inokulasi. Tiap kultur yang disiapkan diinkubasi dengan menggunakan *waterbath shaker* pada suhu 37°C selama 24 jam, dan 110 RPM. Setelah selesai inkubasi, bakteri diatur pada konsentrasi  $1 \times 10^5$  CFU/ml. Kemudian disimpan dalam lemari pendingin selama 4 jam, dan kultur bakteri siap dipergunakan.

Tahap terakhir yang dilakukan adalah membuat larutan uji minyak daun tespong dalam pelarut etanol 96%. Larutan uji dibuat dalam beberapa rentang konsentrasi, yaitu 10%, 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100% (murni).