

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Riset ini akan memakai metode eksperimental yang dilakukan di dalam laboratorium dan ditulis dengan jenis penulisan riset kualitatif. Harapannya dari riset ini akan diketahui ekstrak daun bunga telang dan senyawa metabloit sekunder yang ada di dalamnya, serta menguji antibakteri pada ekstrak daun bunga telang pada bakteri *Escherichia coli*.

3.2 Bahan dan Alat yang Digunakan

3.2.1 Bahan

Bahan-bahan yang akan digunakan pada riset ini berupa daun bunga telang, TSA (Tryptone Soya Agar) Aquadest, N-heksan, etil asetat, metanol, perekasi mayer, pereksi Liberman-Burchard, H_2SO_4 2N, $FeCl_3$ 5%, NaOH 1%, HCL 2N, ciprofloxacin, kaps steril, DMSO (Dimetil Sulfoksida), bakteri *Escherichia coli*, plat KLT, pipa kapiler, aluminium foil, dan kertas saring.

3.2.2 Alat

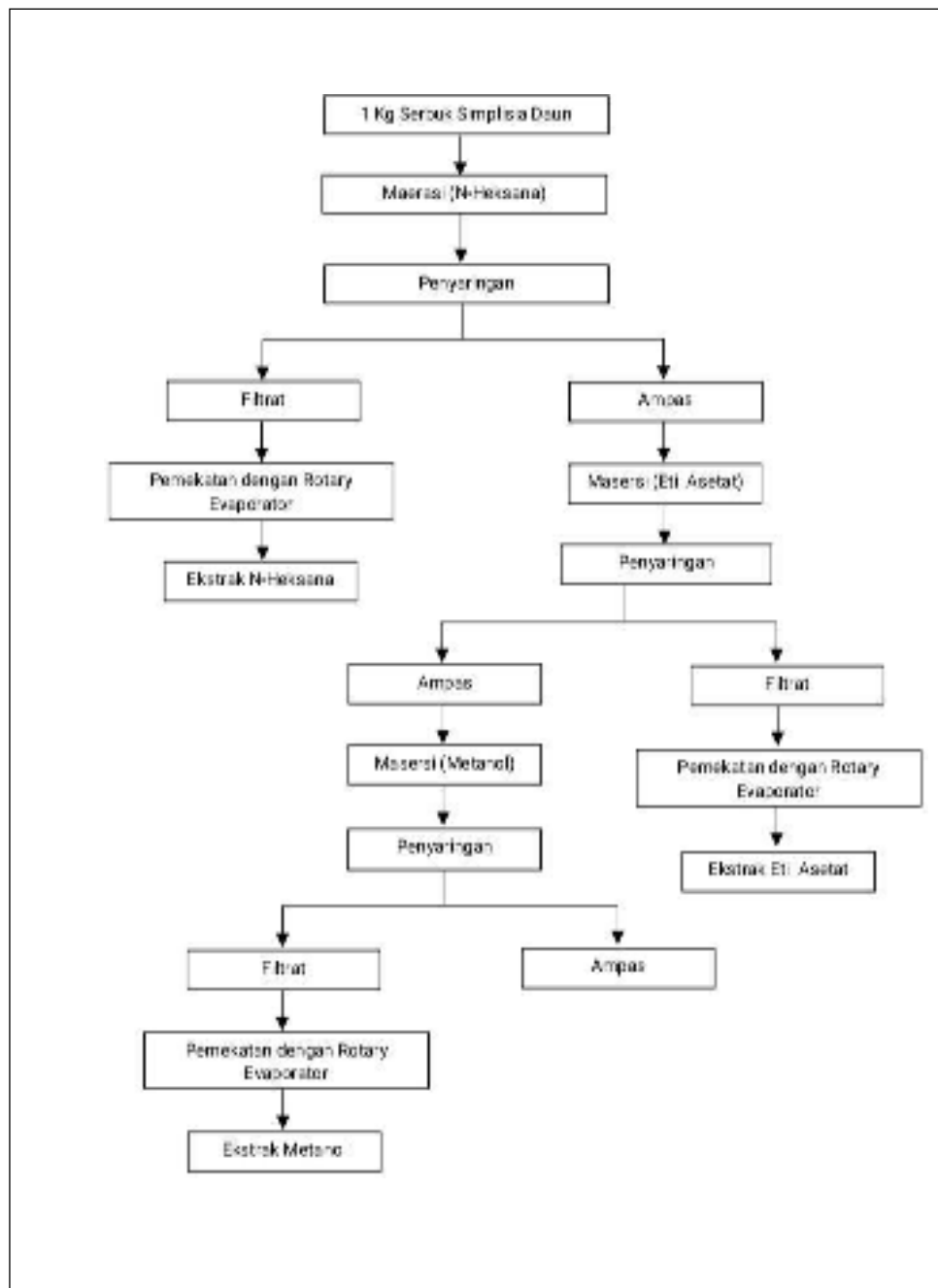
Alat-alat yang akan digunakan pada riset ini berupa alat penghalus atau blender, masker, sarung tangan, alat maserasi dalam bentuk seperangkat, rotary evaporator, neraca analitik, spatula, mortir dan stamper, cawan petri, batang pengaduk, erlenmayer, gelas ukur, sangka sorong, water bath, kompor listrik, beacker glass, tabung reaksi, botol coklat, chamber, lampu UV, autoklaf, inkubator, cawan porselen, kaca arloji, batang sumuran dan mikropipet.

3.3 Waktu dan Tempat Penelitian

Riset ini dilaksanakan di Laboratorium Bahan Alam dan Mikrobiologi Farmasi Universitas Buana Perjuangan Karawang. Riset berlangsung pada bulan Maret - Juli 2021. Sebagai langkah awal, determinasi terhadap kebenaran tanaman yang akan diteliti perlu dilakukan dahulu. Determinasi ini dilakukan di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI).

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Ekstraksi



Gambar 3. Ekstraksi

3.4.2 Pembuatan Reagen Untuk Uji Fitokimia

1. Pereaksi Mayer

Klorida sebanyak 1,5 gram raksa (II) akan dilarutkan bersama 60 mL akuades di dalam suatu gelas piala. Kemudian di dalam gelas piala terpisah yang berbeda, 5 gram kalium iodida juga dilarutkan bersama 10 mL akuades. Kedua larutan tersebut dicampur menjadi satu dan diencerkan hingga 100 mL di dalam labu ukur dengan akuades.

2. Pereaksi Liebermann-Burchard

Anhidrida asetat sebanyak 5 mL digabungkan dengan sulfat pekat sebanyak 5 mL dan diaduk-campurkan pelan-pelan di dalam gelas piala, kemudian hasil campuran tersebut diencerkan hingga 100 mL menggunakan pelarut metanol.

3. Larutan besi (III) klorida 5%

Kristal besi (III) klorida sebanyak 5 gram ditempatkan di dalam gelas piala. Kemudian larutan tersebut dilarutkan menggunakan akuades menjadi 100 mL banyaknya.

4. Larutan asam sulfat 2N

Asam sulfat pekat sebanyak 13,9 mL ditempatkan di dalam gelas piala yang sudah diisi akuades sebanyak 100 mL dengan perlahan melalui dinding gelas, kemudian campuran tersebut diencerkan hingga volumenya menjadi 250 mL.

5. Larutan natrium hidroksida 1 %

Natrium hidroksida sebanyak 1 gram dilarutkan bersama akuades hingga volume mencapai 100 mL dalam gelas piala.

3.4.3 Uji Skrining Fitokimia

1. Flavonoid

Untuk menguji apakah terdapat flavonoid atau tidak, larutan uji yang sudah ada sebanyak ± 1 mL diuapkan hingga kering, kemudian sisa yang telah kering tersebut dibasahkan menggunakan aseton P, lalu jumlah sedikit dari serbuk halus asam borat P dan serbuk halus asam oksalat P ditambahkan, lalu campuran semuanya dipanaskan di atas

tangas air dengan catatan perlu waspada akan pemanasan pada larutan secara berlebih. Eter P kemudian ditambahkan pada campuran sebanyak 10 mL. Larutan campuran kemudian diteliti tepat di bawah sinar UV sebesar 366 nm. Apabila muncul fluoresensi warna kuning dengan intensitas tinggi, maka menunjukkan adanya flavonoid (Depkes RI, 1995).

2. Saponin

Pertama perlu mengekstrak daun dari bunga telang, yang kemudian ekstraksi tersebut menghasilkan ekstrak kental yang sebesar 1 g digunakan pada air yang sudah dihangatkan. Campuran dikocok secara vertikal dalam jangka waktu 10 detik lalu didiamkan 10 detik lamanya. Saponin terlihat apabila muncul busa yang tingginya sebesar 1 hingga 10 cm yang konstan pada jangka waktu dalam 10 menit. Kemudian, busa juga perlu tetap ada setelah diteteskan 1 tetes HCl 2 N (Depkes RI, 1995).

3. Tanin

Untuk melihat adanya tanin atau tidak, warna biru tua atau hitam kehijauan harus terlihat saat larutan uji sebesar 1 mL dicampurkan dengan larutan besi (III) klorida 10% (Robinson, 1991).

4. Triterpenoid dan Steroid

Untuk menguji triterpenoid dan juga steroid, perlu dilaksanakan metode reaksi Liebermann-Buchard dengan cara menguapkan larutan uji sebanyak 2 mL menggunakan cawan porselen. Dari penguapan tersebut akan menghasilkan residu yang kemudian perlu dilarutkan bersama kloroform sebanyak 0,5 mL yang kemudian juga diberi asam asetat anhidrat sebanyak 0,5 mL. Setelah itu, 2 mL asam sulfat pekat diberikan pada dinding tabung hingga tercipta suatu bentuk cincin berwarna coklat atau violet di antara batas larutan. Cincin kecoklatan atau violet ini memberikan tanda unsur triterpenoid, apabila warna cincinnya ialah biru kehijauan, maka steroid ada dalam senyawa yang diuji (Ciulei, 1984).

5. Alkaloid

Untuk menguji alkaloid, 2 mL larutan uji diuapkan menggunakan cawan porselen, yang mana residu hasil penguapan tersebut dilarutkan bersama HCl 2 N sebanyak 5 mL. Campuran dari larutan tersebut dipisahkan ke 3 tabung reaksi yang berbeda, yang mana tabung 1 diberikan 3 tetes HCl 2 N. Tabung 1 ini memiliki peran sebagai blanko. Kemudian tabung 2 diberikan 3 tetes pereaksi Dragendroff agar menghasilkan endapan berwarna kejinggaan. Terakhir, tabung 3 diberikan 3 tetes pereaksi Mayer agar menunjukkan endapan kuning. Endapan berwarna jingga dan kuning ini menandakan alkaloid terdapat pada senyawa yang diuji (Farnsworth, 1966).

3.4.4 Uji Kromatografi Lapis Tipis

Uji ini dilakukan dengan cara melarutkan senyawa yang sudah diproduksi sebelumnya bersama dengan pelarut yang tepat. Hasil larutan terbaru tersebut kemudian diolesi pada plat KLT dan juga elusi menggunakan beberapa perbandingan eluen. Dapat dilihat hasil dari elusi melalui alat pengungkap noda lampu dengan UV λ 254 nm dan λ 365 nm. Walau eluen yang dipakai memiliki kepolaran yang tidak sama, senyawa murni seharusnya menunjukkan bercak noda singular.

3.4.5 Pembuatan Nutrient Agar (NA)

Dalam pembuatan nutrient agar (NA), NA sebesar 2,8 gram perlu dicampurkan dengan akuades sebanyak 100 ml yang kemudian campurannya dipanaskan sehingga menjadi larut menjadi homogen. Bahan ini selanjutnya dipisah-pisah untuk memperbanyak bakteri. Untuk memperbanyak bakteri, larutan sebanyak 5 hingga 10 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi, setelah itu dapat dilakukan sterilisasi di suhu 121°C memakai autoklaf serta tekanan 1 atau setidaknya dalam jangka waktu 15 menit (Vania, 2015).

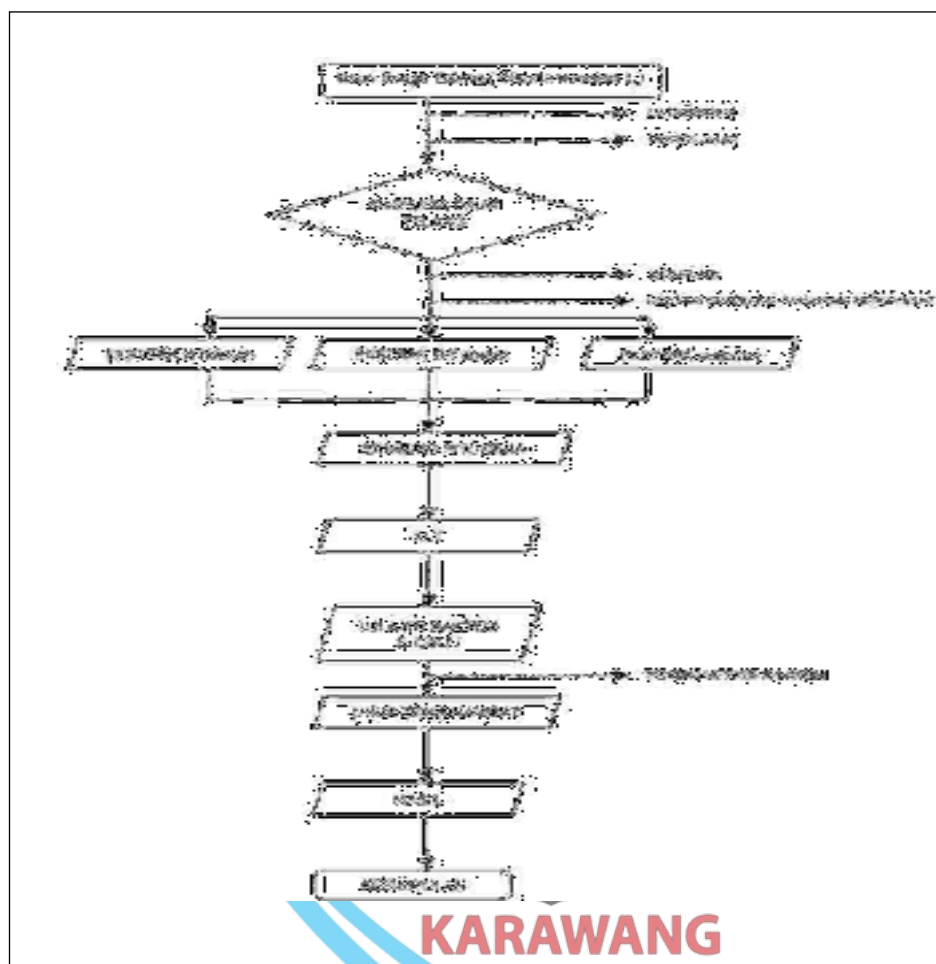
3.4.6 Pembuatan Suspensi Bakteri

Dalam membuat suspensi bakteri, kultur bakteri dalam umur 1x24 jam perlu diremajakan terlebih dahulu di dalam medium NA, kemudian setelah itu dapat disuspensikan bersama NaCl 0,9% atau NaCl fisiologis. Tingkat keruhnya bakteri diukur menggunakan spektrofotometer UVVis dengan tingkat kekeruhan sebesar 25% T. Adapun panjang gelombang yang dipakai adalah 580 nm (Harmita, 2005).

Untuk masuk pada fase skrining aktivitas pada antibakteri, beberapa ekstrak seperti ekstrak methanol sebesar 10 mg, ekstrak tidak larut n-heksan, dan ekstrak larut n-heksan dicampurkan ke dalam 0,2 ml DMSO. Pelarutan memakai mikropipet dan hasilnya dilarutkan bersama 9,8 ml media NA cair yang memiliki konsentrasi 1 mg/ml sehingga volume akhir yang didapatkan sebesar 10 ml. Volume akhir tersebut dimasukkan ke cawan petri dan cawan diayun-ayunkan untuk meratakan isinya lalu didiamkan agar memadat dengan sendirinya. Selanjutnya metode surface plate dilaksanakan untuk menyamaratakan enceran dari biakan mikrobiologi uji. Inkubasi cawan petri paling lama 24 jam dalam 1 hari di suhu 37°C dilakukan sebagai langkah terakhir.

3.5 Diagram Alir

Peneliti menggambarkan diagram alir dengan maksud agar alur riset yang dilakukan dari tahap awal hingga tahap akhir dapat terlihat dengan jelas. Berikut ialah gambaran diagram alir pengerjaan riset.



Gambar 4. Diagram Alir Pengerjaan Penelitian

