

## BAB III METODELOGI PENELITIAN

### 3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Farmasi dan Teknologi Bahan alam Universitas Buana Perjuangan Karawang, Penelitian Uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH dan antibakteri Herba tespong (*Oenanthe Javanica (Blume) DC*) diberikan waktu pengerjaanya selama 3 bulan. Terhitung dari mulai bulan April 2020 hingga bulan Juni 2020.

### 3.2 Alat dan Bahan

#### 3.2.1 Alat

Alat – alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu: toples, neraca analitik (ADAM *SCIENTIFIK*), Oven listrik (GEMMYCO Digital # YCO-NO 1), loyang, botol coklat, *rotary Evaporator* (Eyla osb – 2100 – CE), Spektrofotometri UV-Visible (Thermo *Scientific* 33-PPP TS2017-2205-0006), *Laminar Air Flow*, *waterbath* (Memmert), cawan petri, jarum ose, gelas ukur, lampu busen, inkubator, pelobang sumuran, jangka sorong, vial coklat, pinset, tabung reaksi, krus, lampu UV, chamber, piknometer, tanur (*Nabertherm more than heat* 30–3000°C).

#### 3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu: simplisia herba tespong (*Oenanthe Javanica (Blume)DC*), Ekstrak Etanol 70% herba tespong (*Oenanthe Javanica (Blume)DC*), etanol 70% (Brataco), DPPH (p.a), Metanol (p.a), Bakteri *Staphylococcus epidermidis* ATCC 1228, Muller-Hinton Agar (MHA) CM0337 (Oxoid), Larutan NaCl, dan Kapsul kloramfenikol (250mg), Serbuk Mg, HCL, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Kloroform, Amil Alkohol, KOH, vitamin C (p.a), lempeng KLT, aquadest, asam asetat, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Folin-ciocalteu.

### 3.3 Prosedur Kerja

#### 3.3.1 Determinasi tanaman

Dilakukan determinasi tanaman tespong (*Oenanthe javanica (Blume) DC*) utuh di Laboratorium Pusat penelitian biologi di Universitas Lembaga Ilmu Pengetahuan Bogor - Indonesia untuk diidentifikasi kebenaran identitas tanamannya.

#### 3.3.2 Ekstraksi

Sampel diekstraksi dengan pelarut etanol 70% dengan metode maserasi. Maserasi dilakukan selama 3x24 jam dengan 3 kali pengulangan. Hasil ekstraksi berupa ekstrak cair. Ekstrak cair selanjutnya dikentalkan dengan *rotary evaporator* untuk menghilangkan pelarut yang terkandung di dalam ekstrak cair (Kurniasih,2015).

#### 3.3.3 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan untuk mengetahui dan mengidentifikasi senyawa kimia yang terkandung dalam simplisia maupun ekstrak herba tespong, skrining fitokimia yang dilakukan yaitu flavonoid, fenol, terpenoid, steroid, tanin dan kuinon Berikut langkah - langkah skrining fitokimia.

##### A. Flavonoid

###### 1) Simplisia

Sebanyak 2 gram serbuk simplisia ditambahkan serbuk Magnesium sebanyak 0,1 g dan 2 tetes HCL pekat kemudian tambahkan 2 - 3 tetes amil alkohol, tunggu beberapa saat, apabila terbentuk warna kuning, orange atau merah menunjukkan adanya flavonoid (Marpaung, 2017).

###### 2) Ekstrak

Ekstrak etanol sebanyak 1 ml ditambahkan 3 ml etanol 70% dan dikocok, dipanaskan dalam penangas air kemudian disaring, filtrat kemudian ditambahkan serbuk Magnesium sebanyak 0,1 g dan 2 tetes HCl pekat. Uji positif adanya senyawa flavonoid ditandai dengan adanya warna merah (Harbone, 1987 dalam Wardana et al., 2016).

## B. Fenol

1 mg ekstrak dilarutkan dalam etanol dan ditambahkan beberapa tetes  $\text{FeCl}_3$  1%. Hasil positif ditandai dengan warna hijau, merah, ungu, biru, atau hitam (Harborne, 1987 dalam Wardana et al., 2016).

## C. Terpenoid

### 1) Simplisia

Sebanyak 2 ml kloroform ditambahkan dengan 1 ml infusa herba tespong lalu ditambahkan dengan 3 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Lapisan dipermukaan atau antarmuka berwarna coklat kemerahan menunjukkan adanya terpenoid (Riaz et al., 2015).

### 2) Ekstrak

Ambil sebanyak 2 ml sampel, kemudian tambahkan 3 tetes HCl pekat 1 tetes  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat, jika larutan terbentuk warna merah atau ungu maka positif mengandung terpenoid (Ergina, 2014).

## D. Tanin

50 mg serbuk simplisia dalam tabung reaksi dididihkan dalam 50 mL air selama 15 menit, kemudian dinginkan dan saring. Kemudian filtrat ditambahkan larutan gelatin 1 % terbentuk endapan putih menunjukkan adanya tanin.

## E. Steroid

2 ml sampel yang telah diekstraksi ditambahkan 3 tetes HCl pekat dan 1 tetes  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat. Jika terbentuk warna hijau maka positif mengandung steroid (Ergina, 2014).

## F. Kuinon

50 mg serbuk simplisia dalam tabung reaksi dididihkan dalam 50 mL air selama 15 menit, kemudian dinginkan dan saring. Kemudian filtrat ditambahkan larutan KHO 5 % terbentuk warna kuning hingga merah menunjukkan adanya golongan kuinon.

### 3.3.4 Standarisasi Ekstrak Herba Tespong

#### A. Organoleptik

Pengujian organoleptik ekstrak herba tespong dilakukan secara visual untuk mengetahui mengenai bentuk, warna, dan bau dari ekstrak herba tespong (Depkes,2000).

#### B. Rendemen Simplisia Herba Tespong

Rendemen Simplisia herba tespong dapat ditetapkan dengan rumus sebagai berikut (Depkes,2000) :

$$\text{Rendemen Simplisia (\%)} = \frac{\text{Bobot simplisia herba tespong}}{\text{bobot Herba tespong}} \times 100\%$$

#### C. Rendemen Ekstrak Etanol Herba Tespong

Rendemen Ekstrak etanol herba tespong dapat ditetapkan dengan rumus sebagai berikut (Depkes,2000) :

$$\text{Rendemen Ekstrak} = \frac{\text{Berat ekstrak etanol}}{\text{Berat Simplisia}} \times 100$$

#### D. Massa Jenis Ekstrak Herba Tespong

Menimbang piknometer kosong ukuran 25 mL. Kemudian piknometer diisi penuh dengan ekstrak yang telah diencerkan 5% dengan air dan ditimbang ulang dinyatakan sebagai berat (M). Kemudian massa jenis Ekstrak dapat ditetapkan dengan rumus sebagai berikut (Depkes,2000) :

$$\text{Massa Jenis Ekstrak} = \frac{\text{berat ekstrak}}{\text{Volume ekstrak}}$$

#### E. Bobot jenis ekstrak

Menimbang piknometer kemudian kosong diisi penuh dengan ekstrak yang telah diencerkan sebanyak 5% dengan air, lalu ditimbang dengan berat ekstrak yang mempunyai volume 25 mL pada suhu 25 °C, Sehingga dapat ditetapkan kerapatan ekstrak (Depkes RI,2000).

Bobot jenis ekstrak dapat ditetapkan dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Bobot jenis ekstrak} = \frac{\text{kerapatan ekstrak}}{\text{kerapatan air}}$$

#### F. Kadar air secara gravimetri

Menimbang cawan kosong dan dinyatakan sebagai  $W_0$ . Kemudian sejumlah ekstrak dimasukkan kedalam cawan kosong yang telah diketahui bobotnya ditimbang  $W_1$  kemudian dimasukkan kedalam oven dengan suhu  $105^\circ\text{C}$  selama 3 jam, didinginkan dalam desikator selama 15-30 menit, lalu ditimbang dinyatakan sebagai  $W_2$ . Kadar air dapat ditetapkan dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Kadar air (\%)} = \frac{(\text{Berat cawan + ekstrak awal}) - (\text{berat cawan + ekstrak Setelah Pemanasan})}{\text{Berat sampel}} \times 100\%$$

#### G. Kadar abu total

Menimbang sejumlah ekstrak dan masukan kedalam crus silikat yang telah dipijarkan, kemudian masukkan kedalam tanur dan pijarkan pada suhu  $600^\circ\text{C}$  selama 30 menit. Dinginkan dalam desikator selama 15 - 20 menit lalu timbang. Kadar abu total dapat dinyatakan dalam % b/b (Depkes RI,2008). Dan ditetapkan dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Kadar abu (\%)} = \frac{(\text{bobot crush + abu} - \text{bobot crush kosong})}{\text{berat sampel}} \times 100\%$$

#### H. Kadar sari larut air

Menimbang sebanyak 5 gram ekstrak, masukan kedalam labu bersumbat tambahkan 100 mL air jenuh kloroform. Kocok berkali-kali selama 6 jam, kemudian biarkan selama 18 jam. Saring filtrate dan uapkan hingga kering dalam cawan porselin yang telah ditimbang. Residu dipanaskan pada suhu  $105^\circ\text{C}$  hingga bobot tetap, hitung kadar dalam % sari larut air (Depkes RI,2008).

$$\text{Kadar sari larut etanol} = \frac{W_2 - W_0}{W_1} \times Fp \times 100\%$$

Keterangan :  $W_2$  : berat cawan + filtrat setelah pemanasan (gram)

$W_1$  : bobot ekstrak awal (gram)

W0 : bobot cawan kosong (gram)

Fp : Faktor Pengenceran (gram)

### I. Kadar sari larut etanol

Menimbang sebanyak 5 gram ekstrak, masukan kedalam labu bersumbat tambahkan 100 mL etanol P. Kocok berkali-kali selama 6 jam, kemudian biarkan selama 18 jam. Saring filtrat dan uapkan hingga kering dalam cawan porselin yang telah ditimbang. Residu dipanaskan pada suhu 105<sup>0</sup>C hingga bobot tetap, hitung kadar dalam % sari larut etanol (Depkes RI,2008).

$$\text{Kadar sari larut etanol} = \frac{W2 - W0}{W1} \times Fp \times 100\%$$

Keterangan : W2 : berat cawan + filtrat setelah pemanasan (gram)

W1 : bobot ekstrak awal (gram)

W0 : bobot cawan kosong (gram)

Fp : Faktor Pengenceran (gram)

### 3.3.5 Pengujian kualitatif aktivitas antioksidan ekstrak etanol herba tespong menggunakan KLT.

Pengujian kualitatif aktivitas antioksidan ekstrak etanol herba tespong dengan KLT menggunakan eluen Etanol, asam asetat, dan aquaest (2 : 6 : 2 ). Untuk mengetahui bercak mana yang mempunyai aktivitas antioksidan maka digunakan pereaksi semprot penampak bercak Larutan DPPH 0,2%, senyawa yang dinyatakan dapat meredam radikal bebas dapat ditandai dengan menunjukkan bercak berwarna kuning pucat berlatar belakang ungu.

### 3.3.6 Pengujian Aktivitas Antibakteri Ekstrak Herba Tespong.

#### A. Penyiapan Media Agar

Timbang sejumlah media Muller - Hinton Agar (MHA) kemudian larutkan dengan aquades. selanjutnya larutkan dan panaskan sampai larutan berwarna kuning jernih, Lalu disterilisasi Autoklaf pada suhu 121<sup>0</sup>C selama 15 menit. Setelah itu, dimasukan kedalam cawan petri dan dinginkan pada suhu ruangan (Lay, 1994).

## B. Sterilisasi Alat

Cawan petri, tabung reaksi, corong, gelas ukur, serta Muller – Hinton Agar (MHA) yang telah dibuat dibungkus dengan kertas coklat. Setelah itu, dimasukkan kedalam autoklaf. Metode sterilisasi yang digunakan adalah metode panas basah, dimana alat-alat yang disterilisasi tahan terhadap pemanasan serta kelembapan. Disterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit. Alat yang sudah disterilisasi dibungkus kembali dengan kertas coklat kering, lalu diletakkan di lemari *Laminar Air Flow* (LAF) yang sebelumnya telah dibersihkan dengan alkohol 70%.

## C. Peremajaan Bakteri *Staphylococcus epidermidis*.

Bakteri *Staphylococcus epiermidis* yang berasal dari biakan murni, diambil satu ose kemudian diinokulasikan dengan cara digoreskan pada medium Muller – Hinton Agar (MHA) selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Kemudian dibuat suspensi bakteri dengan menggunakan aqua steril sebagai media pertumbuhannya (Siregar,2009).

## D. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Herba Tespong.

Pengujian daya hambat ekstrak dilakukan dengan menggunakan metode difusi sumuran. Disiapkan medium Muller – Hinton Agar (MHA) steril dengan suhu 45-50°C sebanyak 15 ml, selanjutnya dituang secara aseptik kedalam cawan petri steril dan dibiarkan hingga memadat. Selanjutnya suspensi bakteri yang telah disiapkan, di goreskan ke media agar. Selanjutnya, lubang media agar dengan pelubang sumuran dan masing-masing lubang diisi ekstrak dengan konsentrasi yaitu konsentrasi 5%, 10%, 15% dan 20% b/v. Ekstrak disuspensikan dalam aqua steril. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Kontrol positif yang digunakan adalah kloramfenikol dan kontrol negatif yang digunakan adalah Larutan NaCl. Pengukuran pengujian antibakteri dilakukan pada 24 jam dengan 3 kali pengulangan.

### **3.3.7 Penetapan Kadar Fenol Total Ekstrak Herba Tespong dengan metode Folin - Ciocalteu menggunakan Spektro UV-Visible.**

#### **A. Pengukuran Blanko**

Mengambil 0,5 Metanol tambahkan 5 ml Folin – Ciocalteu kemudian tambahkan 4 ml  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1 M ke dalam vial setelah itu inkubasi selama 15 menit kemudian diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometri UV-Visible pada panjang gelombang 765 nm dengan 3 kali pengulangan.

#### **B. Pengukuran larutan standar asam galat**

Dibuat larutan induk 200 ppm sebanyak 50 ml, kemudian diencerkan dengan konsentrasi 45 ppm, 75 ppm, 105 ppm, 150 ppm, 165 ppm dan 180 ppm. Kemudian masing masing konsentrasi diambil sebanyak 0.5 ml ditambahkan 5 ml Follin- ciocateu dan ditambahkan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1 M sebanyak 4 ml kemudian diinkubasi selama 15 menit. Selanjutnya diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometri UV-Visible pada panjang gelombang 765 nm dengan 3 kali pengulangan.

#### **C. Pengukuran Sampel pengujian kadar fenol total**

Sampel uji 100 mg dilarutkan dengan metanol sebanyak 10 ml, kemudian mengambil 0,5 ml ekstrak, tambahkan 5 ml Folin - Ciocalteu dan tambahkan 4 ml  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1 M kemudian diinkubasi selama 15 menit. Srlanjutnya diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometri UV-Visible pada panjang gelombang 765 nm dengan 3 kali pengulangan.

### **3.3.8 Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Herba Tespong Dengan metode DPPH Menggunakan Spektro UV-Visible.**

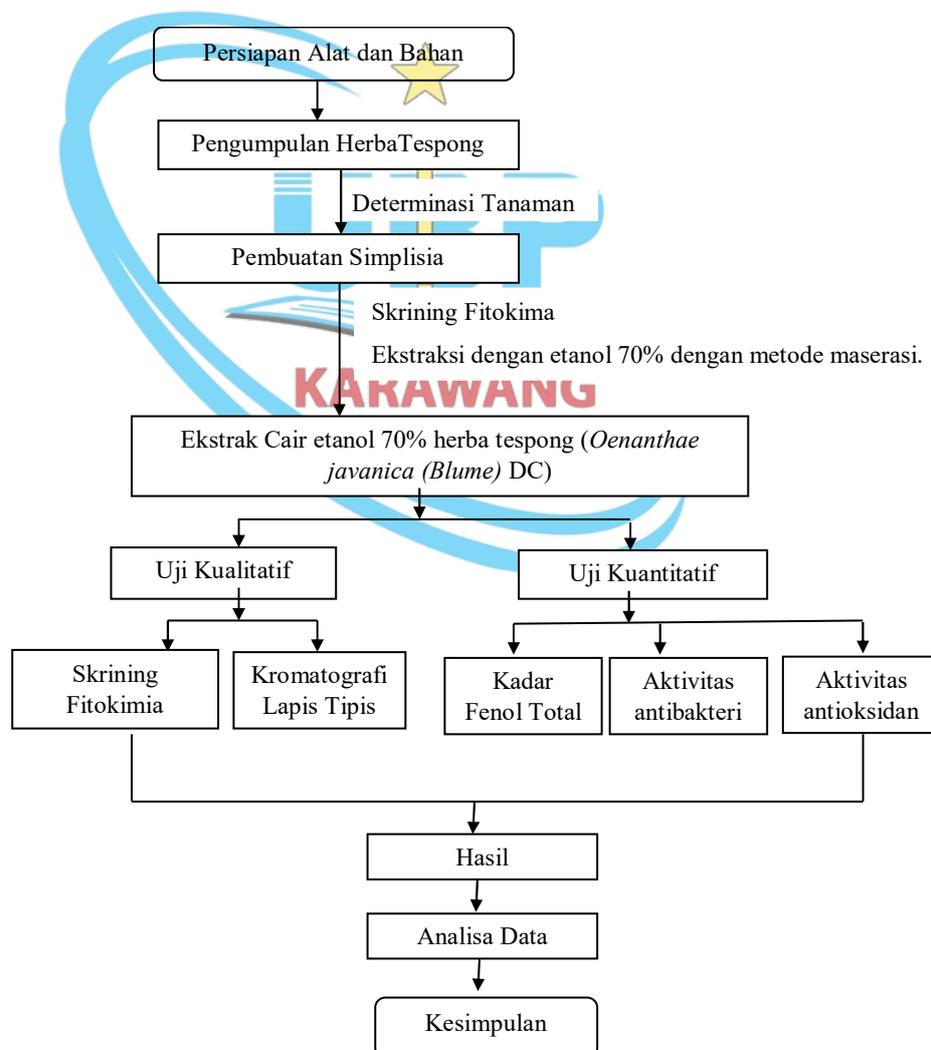
#### **A. Pembuatan reagen dan pengukuran DPPH.**

Menimbang sejumlah DPPH kemudian dilarutkan dalam metanol di dalam labu ukur. Larutan yang dihasilkan disimpan di ruang gelap dan dilindungi dengan aluminium foil. Selanjutnya diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum DPPH menggunakan spektrofotometri UV-Visible (Kurniasih, 2015).

## B. Pengukuran sampel pengujian antioksidan.

Sampel uji diencerkan dengan metanol sesuai dengan masing – masing konsentrasinya. Kemudian mengambil 2 ml sampel masing- masing konsentrasi dicampurkan dengan 2 ml larutan DPPH semua larutan dimasukkan ke dalam vial, lalu diinkubasi pada suhu kamar selama 30 menit yang dihitung sejak penambahan larutan DPPH pada sampel. Kemudian diukur panjang gelombang dan absorbansinya. Nilai absorbansi dari tiap sampel dihitung persentase (%) inhibisinya dan nilai  $IC_{50}$  Pengukuran tiap konsentrasi dilakukan 3 kali pengulangan (Kurniasih, 2015).

### 3.4 Diagram alir Penelitian



**Gambar 3.1** Diagram Alir Penelitian