

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kimia Universitas Katolik Widya Mandira Kupang selama lima bulan (Mei-September 2019).

3.2 Tempat Pengambilan Sampel

Sampel dari penelitian ini berupa daun kecubung yang diambil dari Desa Pakubaun, Kecamatan Amarasi Timur, Kabupaten Kupang.

3.3 Alat dan Bahan

3.3.1 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah blender, erlenmeyer, tabung reaksi, labu ukur, gelas kimia, oven, autoklaf, cawan petri, jarum ose, pipettetes, mikropipet, hot plate, pinset, kapas steril, lemari pendingin, mikro pipet, inkubator, jangka sorong, neraca analitik, spatula, aluminium foil, kertas label, tisu, mistar, evaporator dan spektrofotometer UV-Vis.

3.3.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan adalah daun kecubung, metanol, etanol, aquades, etil asetat, kloroform, pereaksi mayer (HgCl_2 , KI), pereaksi dragendorff (iodin dan kalium iodida), pereaksi wagner (BiNO_3 , HCl pekat, KI), HCl, H_2SO_4 , FeCl_3 1%, bakteri *staphylococcus aureus*, NA, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH).

3.4 Prosedur Kerja

3.4.1 Pengumpulan dan Pengolahan Sampel

Sampel berupa daun kecubung yang segar diambil dari pohonnya. Sampel kemudian dikumpulkan, dicuci hingga bersih dan dikeringkan di dalam suhu ruangan, kemudian diblender hingga halus.

3.4.2 Pembuatan Ekstrak Metanol, Etanol dan Etil Asetat

Sebanyak 531 g sampel berupa serbuk halus daun kecubung dipisahkan ke dalam 3 labu, dengan masing-masing labu sebanyak 177 g. Sampel kemudian dimaserasi dengan 3 pelarut berbeda yaitu metanol, etanol dan etil asetat sebanyak 1 liter lalu didiamkan selama 24 jam, kemudian disaring diperoleh filtrat dan residu. Selanjutnya residu yang diperoleh dimaserasi kembali menggunakan pelarut yang baru kemudian diulang lagi sampai larutan ekstrak bening. Kemudian, filtrat pertama sampai filtrat terakhir digabungkan untuk dirotav menggunakan rotavapor pada suhu 40°C sehingga menghasilkan ekstrak kental metanol, etanol dan etil asetat. Setelah itu, ditimbang dan dihitung rendemennya.

3.4.3 Skrining Fitokimia

Identifikasi kandungan kimia ekstrak daun kecubung dilakukan terhadap senyawa-senyawa (Harbone, 1987) :

a) Uji Alkaloid

Sampel sebanyak 0,1 g dilarutkan dalam 10 mL kloroform dan ditambah beberapa tetes NH_4OH kemudian disaring kedalam tabung reaksi tertutup. Fraksi kloroform diasamkan dengan 10 tetes H_2SO_4 2 M dikocok kuat kemudian lapisan

atasnya dipindahkan dan dibagi ke dalam 3 tabung reaksi yang lain. Lapisan atas ini diteteskan pada plat tetes dan ditambahkan pereaksi Meyer, Wagner, dan Dragendorff. Uji positif apabila terbentuk endapan dengan warna berturut-turut putih, coklat dan merah/jingga.

b) Uji Flavonoid

Sampel sebanyak 0,1 g dilarutkan dalam 10 mL metanol p.a, lalu dipanaskan pada suhu 50°C . Hasilnya dibagi ke dalam tiga tabung reaksi. Tabung pertama dibuat kontrol, tabung kedua ditambahkan H₂SO₄ pekat, tabung ketiga ditambahkan 1 mL NaOH. Bandingkan dengan kontrol. Bila terjadi perubahan warna menjadi hijau kehitaman maka filtrat mengandung flavonoid dan warna hijau kecoklatan mengandung fenolik.

c) Uji Saponin dan Tanin

Sampel sebanyak 0,5 g dilarutkan dengan 10 mL aquades kemudian dididihkan selama 5 menit. Campuran disaring dan filtrat dibagi ke dalam 2 tabung reaksi. Bagian pertama digunakan untuk uji saponin; filtrat didiamkan sampai agak dingin, kemudian dikocok kuat sampai timbul busa. Bila busa stabil dalam 5 menit maka filtrat positif mengandung saponin. Bagian kedua untuk uji tanin; filtrat ditambahkan FeCl₃ 1%. Bila dihasilkan warna hijau, biru, atau hitam maka filtrat positif mengandung tanin.

3.4.4 Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Kecubung (*Datura metel* L.) terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*

Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode Cup-plate technique (Radji, 2011) :

a) Pembuatan Variasi Konsentrasi

Ekstrak daun kecubung segar bebas pelarut dilarutkan dalam aquades, kemudian diencerkan menghasilkan seri-seri sehingga tersedia larutan uji dengan konsentrasi sebagai berikut: 100%, 75%, 50%, 25%, 15%, 10%, 5%, 1%. Larutan stok diencerkan menggunakan aquades.

b) Pembuatan Media Tumbuh Bakteri

Ditimbang 5 gram NA, dipanaskan dan aduk dengan magnet stirer hingga homogen, kemudian disterilisasi dalam autoklaf 121°C selama 15 menit. Kemudian media disterilisasi dengan cara bagian mulut erlenmeyer ditutup dengan kapas dan dengan aluminium foil yang diikat dengan karet gelang, kemudian dimasukkan kedalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C. Tuang media steril kedalam cawan petri steril.

c) Inokulasi Bakteri (Peremajaan)

Isolat bakteri *staphylococcus aureus* dari biakan murninya diambil 1 ose kemudian ditumbuhkan dalam media cair dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

d) Pembuatan Suspensi Bakteri

Membuat larutan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* diambil 1 ose bakteri, dimasukkan kedalam tabung reaksi yang berisi 10 mL larutan NaCl fisiologi 0,9%, dengan biakan murni *Staphylococcus aureus* didalam tabung reaksi dikocok sampai homogen.

e) Pengujian Ekstrak Daun Kecubung Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*

Penentuan aktifitas antibakteri *Staphylococcus aureus* dilakukan dengan menggunakan metode sumur difusi.

Prosedurnya yaitu:

1. Sebanyak 5 μ L bakteri hasil biakan dimasukkan ke dalam cawan petri.
2. Dituangkan media padat ke dalam cawan petri yang berisi bakteri dan dihomogenkan.
3. Media ditunggu hingga memadat, dibuat sumur pada media dengan menggunakan pipet tetes.
4. Diberi label pada masing-masing konsentrasi serta kontrol negatif dan positif yang telah dibuat sumur.
5. Masukkan larutan ekstrak ke dalam masing-masing sumur dari konsentrasi terendah, yaitu: 1%, 5%, 10%, 15%, 25%, 50%, 100%, serta kontrol negatif dan kontrol positif. Perlakuan ini diulang sebanyak 3 kali.
6. Cawan ditutup rapat dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.
7. Diinkubasi, zona bening yang terbentuk di sekitar sumur difusi diukur dengan jangka sorong.

3.4.5 Uji Antioksidan Ekstrak Daun Kecubung (*Datura metel* L.) dengan Metode DPPH

a) Pembuatan larutan DPPH 0,4 mM

Serbuk DPPH sebanyak 0,0079 g (BM 394,32) dilarutkan dalam etanol p.a 15 mL kemudian dimasukkan dalam labu 50 mL volume dicukupkan dengan menggunakan etanol p.a sampai tanda batas.

b) Penentuan panjang gelombang maksimum blanko

Larutan DPPH 0,4 mM sebanyak 1 mL dimasukan kedalam tabung reaksi kemudian ditambahkan dengan pelarut etanol p.a 4 mL dan diinkubasi selama 30 menit. Larutan kemudian dituang kedalam kuvet dan diukur panjang gelombang maksimumnya pada kisaran 400-800 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

c) Uji antioksidan pembanding

1. Pembuatan larutan induk konsentrasi 1000 ppm

Ditimbang sebanyak 0.1 g vitamin C dan dilarutkan dengan sedikit etanol p.a kemudian dimasukkan kedalam labu terukur 100 mL kemudian dicukupkan volumenya hingga tanda batas menggunakan etanol p.a.

2. Pembuatan larutan pembanding dengan seri konsentrasi 0.5, 1, 2.5, dan 5 ppm

3. Pengukuran serapan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis

Sebanyak 4 mL larutan pembanding (vitamin C) masing-masing konsentrasi dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditambahkan

dengan larutan DPPH 0,4 mM sebanyak 1 mL. Campuran ini kemudian diinkubasi selama 30 menit dalam ruang gelap. Diukur serapannya pada panjang gelombangnya yang optimum.

d) Uji antioksidan ekstrak sampel

1. Pembuatan larutan induk 1000 dan 2000 ppm

a. Larutan induk 1000 ppm

Ekstrak daun Kecubung (*Datura metel* L.) ditimbang 0,1 g dan dilarutkan dengan sedikit etanol p.a, kemudian dimasukkan dalam labu terukur 100 mL kemudian ditambahkan etanol p.a hingga tanda batas.

b. Larutan induk 2000 ppm

Ekstrak daun Kecubung (*Datura metel* L.) ditimbang 0,2 g dan dilarutkan dengan sedikit etanol p.a, kemudian dimasukkan dalam labu terukur 100 mL kemudian ditambahkan etanol p.a hingga tanda batas.

2. Pembuatan larutan seri konsentrasi 25, 50, 100, 250 dan 500 ppm

3. Pengukuran serapan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis

Sebanyak 4 mL larutan uji ekstrak masing-masing konsentrasi dimasukkan dalam tabung reaksi ditambahkan dengan larutan DPPH 0,4 mM sebanyak 1 mL dan diinkubasi selama 30 menit dalam ruang

gelap kemudian diukur serapannya pada panjang gelombangnya yang optimum.

e) Penentuan persen inhibisi

Aktivitas penangkal radikal diekspresikan sebagai persen inhibisi yang dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ inhibisi radikal DPPH} = \frac{\text{absorbansi blanko} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorban blanko}} \times 100\%$$

f) Penentuan nilai IC₅₀

Konsentrasi sampel dan persen inhibisi masing-masing pada sumbu X dan Y pada persamaan regresi linear. Persamaan tersebut digunakan untuk menentukan nilai IC₅₀ dari masing-masing nilai dinyatakan nilai Y sebesar 50 dan nilai X yang akan diperoleh sebesar IC₅₀. Dengan persamaan: $y = ax + b$