

## **BAB III METODE PENELITIAN**

### **3.1 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilakukan dari bulan Februari-Agustus 2020. Pengambilan sampel dilakukan pada bulan November 2019 di Desa Paya Benua, Kecamatan Mendo Barat, Kabupaten Bangka, Provinsi Bangka Belitung. Tempat penelitian dilakukan di Laboratorium kimia dan mikrobiologi terpadu Fakultas Pertanian Perikanan Biologi Universitas Bangka Belitung.

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

#### **3.2.1 Alat**

Blender, neraca analitik, peralatan gelas (*pyrex*), *auto clave*, *rotary evaporator*, Spektrofotometri UV-Vis (*Simadzu*), *water bath*, pipet tetes, *vortexs*, jangka sorong, jarum ose, mikropipet, batang pengaduk, kertas label, pembakar bunsen, cawan petri, Pengayak *mesh 80*, mikroskop, *cotton bud*, laminar air flow, inkubator, tabung reaksi, toples kaca.

#### **3.2.2 Bahan**

Limbah buah jeruk kunci (*C. x microcarpa* Bunge), metanol, reagen Folin-Ciocalteu, dimetil sulfoksida (DMSO), etanol 96%, klindamisin, nutrisi agar (NA), *nutrient broth* (NB), bakteri *Propionibacterium acnes*, DPPH, pereaksi Mayer, pereaksi Dragendroff, pereaksi Wagner, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, FeCl<sub>3</sub>, Mg, metanol, CH<sub>3</sub>COOH, HCl, *aluminium foil*, kapas, kertas cakram, akuades, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, kertas saring, asam galat, AlCl<sub>3</sub>, NaCH<sub>3</sub>COO.

### **3.3 Prosedur Penelitian**

#### **3.3.1 Preparasi dan Ekstraksi Sampel**

Limbah buah jeruk kunci (*C. x microcarpa* Bunge) berasal dari Desa Paya Benua, Kecamatan Mendo Barat, Kabupaten Bangka, Kepulauan Bangka Belitung. Sampel limbah buah jeruk kunci yang diperoleh kemudian dibersihkan, di potong kecil-kecil lalu dijemur dibawah sinar matahari langsung dan disortir

kering untuk menghasilkan serbuk limbah buah jeruk kunci sampel tersebut di blender lalu diayak dengan pengayak berukuran 80 *mesh*.

Simplisia limbah buah jeruk kunci diekstraksi dengan menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol. 250 gram simplisia dimaserasi menggunakan pelarut etanol 2,5 L selama 3 x 24 jam. Setiap 1 x 24 jam dilakukan pengadukan. Penyaringan dilakukan dengan menggunakan penyaring vakum untuk memisahkan filtrat dengan residu. Untuk memperoleh ekstrak pekat filtrat yang didapat dipekatkan dengan *rotary evaporator vacuum* (Dungir dkk, 2012).

### 3.3.2 Pengujian Fitokimia

#### a. Uji Alkaloid

Ekstrak etanol sampel sebanyak 1 mL dimasukkan kedalam 3 tabung reaksi. Masing-masing tabung ditambahkan  $H_2SO_4$  2 N dikocok kuat. Kemudian ditambahkan pereaksi Dragendroff, Meyer, dan Wegner. Terbentuknya endapan menunjukkan adanya senyawa alkaloid. Hasil positif pereaksi Dragendroff menghasilkan endapan berwarna merah jingga, Wagner menghasilkan endapan berwarna coklat dan Mayer menghasilkan endapan berwarna putih (Mailuhu dkk, 2007).

#### b. Uji Saponin

Saponin dideteksi dengan 5 mL air panas sambil dikocok kuat selama 1 menit. Kemudian ditambahkan 2 tetes HCl 2 N. Sampel positif jika mengandung busa yang banyak dan konsisten selama 10 menit (Mailuhu dkk, 2007).

#### c. Uji Tanin/Fenol hidrokuinon

Sebanyak 1 mL ekstrak etanol sampel dimasukkan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan  $FeCl_3$  1% sebanyak 2-3 tetes. Sampel positif mengandung fenol apabila menghasilkan warna biru kehitaman (Mailuhu dkk, 2007).

#### d. Uji Flavonoid (HCl + Mg)

Ekstrak etanol sampel sebanyak 1 mL dimasukkan kedalam tabung reaksi, kemudian tambahkan 2 tetes HCl pekat sambil dikocok kuat, tambahkan serbuk Mg dan dikocok kuat. Sampel positif flavonoid ditandai dengan adanya buih dengan intensitas yang banyak dan berwarna jingga (Mailuhu dkk, 2007).

e. Uji Terpenoid dan Steroid

Sebanyak 3 tetes ekstrak etanol sampel dimasukkan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan 3 tetes asam asetat glasial, campuran selanjutnya ditambahkan dengan 5 tetes H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat melalui dinding tabung. Sampel mengandung terpenoid ditandai dengan adanya warna larutan merah atau ungu dan hijau atau biru jika mengandung steroid (Rahayu dkk, 2015).

### 3.3.3 Pengujian Total Fenolik

Pengujian kandungan fenolik dilakukan menggunakan metode Folin-Ciocalteu. Ekstrak etanol sampel sebanyak 10 mg/mL dilarutkan dengan metanol. Selanjutnya dipipet 0,5 mL dan dimasukkan kedalam tabung reaksi yang mengandung 2,5 mL larutan Folin-Ciocalteu 10% dan ditambahkan larutan Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 7,5% (2,5 mL) kemudian diinkubasi selama 30 menit. Larutan blanko dibuat 0,5 mL metanol ditambahkan 2,5 mL Folin-Ciocalteu 10% dan 2,5 mL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 7,5%. Diinkubasi dan diukur absorbansi menggunakan spektrofotometri UV-Vis. Asam galat digunakan sebagai kontrol positif dengan variasi konsentrasi 20, 60, 100, 150 dan 200 µg/mL. Total fenolik dihitung menggunakan kurva kalibrasi yang dinyatakan dalam mg ekuivalen asam galat (EAG)/g ekstrak (Roanisca dkk, 2019).

Perhitungan kandungan total fenolik menggunakan rumus berikut:

$$\text{Total Fenolik} = C \frac{v}{m}$$

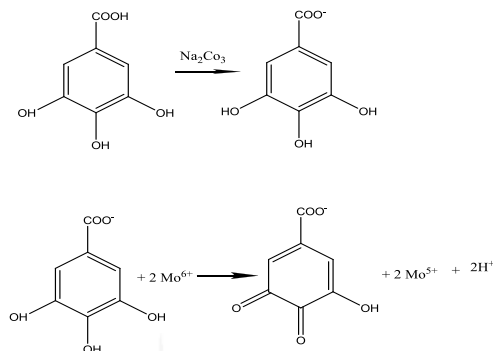
Keterangan:

C=Konsentrasi (mg/mL)

v=Volume ekstrak yang digunakan (mL)

m=Berat sampel yang digunakan (mg)

Adapun mekanisme senyawa fenol dengan pereaksi Folin-Ciocalteu dapat dilihat pada gambar 3.1 dibawah ini :



Gambar 3.1 Reaksi senyawa fenol dengan pereaksi Folin-Ciocalteu (Pereira, 2012).

### 3.3.4 Pengujian Total Flavonoid

Total flavonoid diuji menggunakan spektrofometer UV-Vis dengan menimbang sebanyak 1 mg kuersetin dan dilarutkan dalam 10 mL metanol p.a. Larutan stok dipipet 0,5 mL dan dicukupkan sampai 10 mL dengan metanol p.a untuk 1000 ppm. Dari larutan standar tersebut dibuat variasi konsentrasi 0 ppm, 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm dan 100 ppm, selanjutnya dari masing-masing konsentrasi tersebut ditambahkan 0,1 AlCl<sub>3</sub> 10%, 0,5 mL metanol, 0,1 NaCH<sub>3</sub>COO 1 M dan 2,8 mL akuades. Selanjutnya diinkubasi selama 30 menit dan diukur absorbansinya menggunakan UV-Vis dengan panjang gelombang 420 nm dengan penentuan total flavonoid dinyatakan dalam *Quersetin Equivalent* (QE) (μg/mL). Dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Total Flavonoid QE} = C \frac{v}{m}$$

Keterangan:

C=Konsentrasi total flavonoid dari kurva standar kuersetin (mg/mL)

v=Volume Ekstrak (mL)

m=Berat Ekstrak (mg)

### 3.3.5 Pengujian Aktivitas Antioksidan

Pengujian antioksidan dilakukan secara kuantitatif dan aktivitas antioksidan diukur dengan menggunakan DPPH secara spektrofotometri. Ekstrak etanol sampel dibuat dalam konsentrasi 2; 5; 10; 20 μg/mL. Masing-masing konsentrasi dimasukan ke dalam tabung reaksi sebanyak 1 mL lalu ditambahkan larutan DPPH 100 μg/mL serta 2 mL metanol p.a. Semua campuran diinkubasi dan absorbansi diukur pada serapan 517 nm. Perlakuan yang sama dilakukan untuk

larutan blanko (Tanpa menambahkan sampel). Hasil pengujian sampel diukur dengan menggunakan rumus:

$$\% \text{Inhibisi} = \frac{A_k - A_s}{A_k} \times 100\%$$

<p>A<sub>k</sub>=Absorbansi kontrol A<sub>s</sub>=Absorbansi sampel</p>
---

Nilai IC<sub>50</sub> (*Inhibition Concentration*) merupakan konsentrasi sampel uji yang diperlukan dalam menangkap 50% radikal DPPH dengan memakai persamaan kurva regresi linier  $y = ax + b$  (Lisdawati dkk, 2006).

### 3.3.6 Pengujian Aktivitas Antibakteri

Bakteri *P. acnes* diinokulasikan pada media *Mueller-Hinton agar* (MHA). Kertas cakram ukuran 6 mm diletakan diatas permukaan media Sebanyak 50 µL dipipet dari masing-masing larutan uji dengan variasi konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80% dan 100%. Kontrol positif menggunakan klindamisin serta kontrol negatif menggunakan akuades. Kemudian dimasukkan kedalam variasi konsentrasi yang telah dibuat. Diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C (Jagessar dkk, 2008). Untuk melihat zona hambat yang terbentuk dari pengujian tersebut menggunakan jangka sorong.