

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### 3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Waktu : 15 Juni -15 Oktober 2020.

Tempat : Laboratorium Kimia Fakultas Teknik dan FPPB Universitas Bangka Belitung.

#### 3.2 Alat dan Bahan

**3.3.1 Bahan** : batang pucuk idat, tween 80 teknis, VCO (*Virgin coconut oil*), aseton teknis, etil asetat teknis, *n*-heksana teknis, MeOH teknis, etanol, padatan magnesium, amil alkohol, FeCl<sub>3</sub> 5%, bakteri *Escherichia coli*, bakteri *Staphylococcus aureus*, media agar, *amoxilin*, DMSO (Dimetil Sulfoksida) dan aquades.

**3.3.2 Alat** : blender, toples, refluks, botol, gelas kimia, spatula, spektrometer UV-Vis 1800 Brand Shimadzu, PSA (*Particle Size Analyzer*) HORIBA SZ-100, *rotary evaporatorvacum* IKA RV 20 Basic, *homogenizer* HG-15D-SET/korea, sentrifugasi, *hotplate*, corong pisah, erlenmeyer 250 ml, cawan kaca, gelas ukur, laminar, bunsen, jarum ose, botol duran 500 ml, jangka sorong, dan neraca analitik.

#### 3.3 Prosedur Penelitian

Penelitian ini terdiri dari beberapa tahapan:

##### 3.3.1 Preparasi Batang Pucuk Idat

Batang pucuk idat diperoleh dari Lubuk Besar, Kecamatan Lubuk Besar, Kabupaten Bangka Tengah. Kemudian sampel dikeringkan dibawah sinar matahari. Sampel yang telah kering lalu dihaluskan menggunakan alat penghalus kayu hingga menjadi serbuk kering. Selanjutnya diayak dan dimaserasi menggunakan pelarut aseton.

### 3.3.2 Ekstraksi

Serbuk kering batang pucuk idat yang telah dihaluskan diambil 250 mg dimaserasi dengan pelarut aseton sebanyak 2,5 L selama 3 x 24 jam. Setelah itu filtrat yang didapatkan dari hasil maserasi dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator vacum* hingga diperoleh ekstrak aseton kental (Dungir dkk., 2012). Ekstraksi ini dilakukan di Laboratorium MIPA FPPB UBB.

### 3.3.3 Fraksinasi Cair-cair Ekstrak Batang Pucuk Idat

Ekstrak kental pucuk idat yang diperoleh diambil sebanyak 50 gr lalu dilarutkan dengan larutan MeOH : H<sub>2</sub>O (3:2) 100 ml. Selanjutnya, dipartisi berulang menggunakan *n*-heksana 800 ml menggunakan corong pisah. Hasil yang didapatkan berupa fasa *n*-heksana dan fasa MeOH : air. Kemudian fasa MeOH : air dipartisi cair-cair lebih lanjut menggunakan pelarut etil asetat 800 ml menggunakan corong pisah. Hasil masing-masing partisi yang didapatkan dievaporasi menggunakan *rotary evaporator*. Kemudian dilanjutkan dengan ujifitokimia, FT-IR, pembuatan nanoemulsi dan pengujian karakterisasi nanoemulsi fraksi pucuk idat (Wiwit dkk, 2015).

### 3.3.4 Uji Fitokimia

#### 3.3.4.1 Uji Alkaloid

##### a). Pereaksi Mayer

Masing-masing fraksi kental dan ekstrak dimasukan ke dalam tabung reaksi berbeda, kemudian ditambahkan beberapa tetes pereaksi mayer. Uji positif apabila terbentuk endapan putih kekuningan (Pane, 2013).

##### b). Pereaksi Wagner

Masukan masing-masing sampel ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan masing-masing sampel dengan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N dan pereaksi wagner tetes demi tetes. Uji positif apabila terjadi perubahan warna jingga (Pane, 2013).

#### 3.3.4.2 Uji Steroid

Sampel dimasukan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan pereaksi Lieberman-Burchard. Apabila warna larutan menjadi putih menunjukkan hasil uji positif (Pane, 2013).

### 3.3.4.3 Uji Saponin

Sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi setelah ditambahkan air panas. Uji positif apabila terbentuk busa dan tidak hilang jika ditambahkan HCl 2 N (Pane, 2013).

### 3.3.4.4 Uji Flavonoid

Sampel ekstrak dan fraksi kental yang telah dilarutkan dengan masing-masing pelarut dimasukan kedalam tabung reaksi, lalu ditambahkan magnesium 0,1 mg dan 0,4 mg amil alkohol (campuran HCl 37% dan etanol 95%). Selanjutnya ditambahkan alkohol sebanyak 4 ml. Jika terbentuk warna merah, kuning, atau jingga pada campuran menunjukkan uji positif (Pane, 2013).

### 3.3.4.5 Uji Fenolik

Ekstrak kental dan masing-masing dari fraksi dimasukan kedalam tabung reaksi lalu ditambah tetes demi tetes  $\text{FeCl}_3$  5 %. Hasil uji positif ditandai dengan warna larutan menjadi hijau tua (Pane, 2013).

### 3.3.5 Karakterisasi Menggunakan FT-IR

Untuk melihat keberadaan gugus fungsi pada senyawa yang terkandung pada ekstrak kental dan fraksi dianalisis menggunakan alat spektroskopi IR.

### 3.3.6 Pembuatan Nanoemulsi Fraksi Pucuk Idat

Masing-masing Fraksi pucuk idat seberat 0,01 mg disuspensikan dengan *Virgin coconut oil* (2,5 ml),  $\text{H}_2\text{O}$  (37,5 ml) dan tween 80 (10 ml). Selanjutnya, dilakukan pengadukan menggunakan homogenizer dengan kecepatan 8000 rpm selama 30 menit. Kemudian dilanjutkan dengan karakteristik nanoemulsi (Budiputra dkk, 2014 ).

### 3.3.7 Karakteristik Nanoemulsi Fraksi Pucuk Idat

#### 3.3.7.1 Pengujian Persen Transmitan

Sebanyak 1 ml sampel dilarutkan menggunakan labu takar 100 ml dengan menambahkan aquades digunakan sebagai larutan blanko (Pratiwi dkk, 2016). Persen transmitan larutan tersebut diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 650 nm.

### 3.3.7.2 Uji Stabilitas Fisik

Uji stabilitas fisik nanoemulsi dilakukan dengan menggunakan uji sentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 15 menit. Kemudian dilakukan pengamatan. Nanoemulsi yang stabil dapat diamati dengan tidak terjadinya pemisahan pada kedua fasa (Budiputra dkk., 2014). Selanjutnya dilakukan Uji pH, Uji massa jenis dan Uji viskositas.

### 3.3.7.3 Pengujian PSA (*Particle Size Analyzer*)

Pengujian PSA (*Particle Size Analyzer*) dilakukan dengan mengirim sample hasil pembuatan nanoemulsi ke Laboratorium karakterisasi material ILRC Universitas Indonesia, Depok, Jawa Barat yang bertujuan untuk mengetahui hasil ukuran droplet nanoemulsi yang telah dilakukan dalam penelitian. *Particle Size Analyzer* dapat mengukur distribusi ukuran dengan kisaran 2-7000 nm. Menurut Utami, (2009) nanoemulsi memiliki ukuran droplet berkisar 100-500 nm.

## 3.3.8 Uji Antibakteri

### 3.3.8.1 Pembuatan Medium

Pengujian antibakteri dilakukan sebanyak 10 gram *Nutrient* dimasukkan dalam erlenmeyer 250 mL dan ditambahkan aquades. Erlenmeyer tersebut kemudian dipanaskan hingga larut. Selanjutnya disterilkan menggunakan *autoklaf* selama 15 menit pada suhu 121°C. Kemudian *nutrient* dimasukkan dalam cawan petri 15-21 mL dan dibiarkan hingga memadat.

### 3.3.8.2 Inokulasi Bakteri Dari Biakan Murni Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.

Diambil dengan jarum ose steril pada uji bakteri, kemudian ditanamkan pada media agar dengan cara menggores. Selanjutnya diinkubasi dalam inkubator selama 24 jam pada suhu 37°C (Dhuha, 2016).

### 3.3.8.3 Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

Pembuatan Suspensi bakteri uji yang telah diinokulasi diambil dengan kawat ose steril, setelah itu dilakukan Pembuatan larutan uji dibuat dengan cara mengambil 1 µL nanoemulsi yang telah di *homogenizer*. Sebagai pembanding dilakukan pembuatan larutan uji dari ekstrak kental dan masing-

masing fraksi batang pucuk idat sebanyak 0,01 gram, kemudian dilarutkan dengan DMSO sebanyak 1  $\mu$ L.

#### **3.3.8.4 Pengujian Aktivitas Antibakteri**

Sebanyak 1  $\mu$ L diambil dari masing-masing larutan uji serta larutan kontrol positif yaitu berupa *Amoxillin* dan untuk kontrol negatifnya adalah DMSO. Kemudian dimasukkan kertas cakram kedalam masing-masing cawan petri yang telah tersedia. Setelah itu, diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Pengukuran dilakukan dengan melihat zona hambat yang terbentuk dengan menggunakan jangka sorong.

