

## **BAB III METODOLOGI PENELITIAN**

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

Penelitian ini dilakukan selama 5 bulan (Maret 2023 - Juli 2023) di Laboratorium Dasar, Fakultas Pertanian dan Biologi, Universitas Bangka Belitung. Pengujian LC-MS/MS dilakukan Di Universitas YARSI, Jakarta.

### **3.2 Alat dan Bahan**

#### **3.2.1 Alat**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah blender Philips HR 2115, toples, pipet tetes, gelas beaker Pyrex 50, 100, dan 500 mL, gelas ukur Pyrex 5, 10, dan 100 mL, kertas cakram oxid, corong biasa, tabung reaksi Iwaki, cawan petri, botol vial 20 mL, aluminium foil, batang pengaduk, neraca analitik Pioneer™, bunsen, *rotary evaporator* Ika rv 10 digital v-germany, laf (*laminar airflow*), kaki tiga, kawat ose, inkubator Mikroba Memmert inb 500.

#### **3.2.2 Bahan**

Bahan-bahan yang digunakan adalah simplisia daun *Phoebe excelsa* Nees, aseton teknis, etanol 96 %, *n*-heksana, aquades, HCl, NaOH, reagen Dragendorff, reagen Mayer, reagen Wagner, reagen Liebermann-Burchard, serbuk logam Mg, FeCl<sub>3</sub> 1%, agar MHA, *Novobiocin*, *Eritromicin*, *Dimethyl Sulfoxide* (DMSO), bakteri *Escherichia coli*, dan bakteri *Staphylococcus aureus*.

### **3.3 Prosedur Penelitian**

#### **3.3.1 Persiapan Sampel**

Daun Medang Sang (*Phoebe excelsa* Nees) dari Desa Kerantai, Kecamatan Sungai selan, Kabupaten Bangka Tengah sebagai sampel pada penelitian ini. Kemudian sampel tersebut dikeringkan dengan cara dianginkan tanpa kontak langsung dengan cahaya matahari, setelah itu dihaluskan menggunakan *blender* sehingga diperoleh serbuk halus dan diayak dengan menggunakan ayakan 100 mesh.

### 3.3.2 Ekstraksi Sampel Maserasi Bertingkat

Serbuk daun medang sang (*Phoebe excelsa Nees*) kemudian diekstraksi dengan metode maserasi bertingkat. Serbuk daun medang sang yang telah diayak sebanyak 100 gram dimaserasi dengan pelarut *n*-heksana selama 1×24 jam dengan 1 kali pengulangan dalam suhu ruang. Lalu diganti dengan pelarut aseton selama 1×24 jam dengan 1 kali pengulangan pada suhu ruang, selanjutnya ganti pelarut dengan etanol selama 1×24 jam dengan 1 kali pengulangan pada suhu ruang (Dungir *et al*, 2012). Selanjutnya proses penyaringan dengan menggunakan metode filtrasi vakum sehingga didapatkan filtrat/ekstrak cair *n*-heksana, aseton dan etanol serta residunya. Filtrat yang didapatkan akan dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak pekat *n*-heksana, aseton, dan etanol dari daun medang sang (Nurohma, 2021). Ekstraksi ini dilakukan di laboratorium MIPA FPPB UBB.

### 3.3.3 Uji Fitokimia

#### 3.3.3.1 Uji Alkaloid

Ekstrak *n*-heksana, aseton dan etanol daun medang sang masing-masing sebanyak 5 tetes dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berbeda, lalu tambahkan beberapa tetes pereaksi Mayer dan tunggu selama beberapa menit. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya endapan putih (Kristanti *et al*, 2008).

Ekstrak *n*-heksana, aseton, dan etanol daun medang sang masing-masing sebanyak 5 tetes Dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berbeda, lalu tambahkan beberapa tetes pereaksi Wagner dan tunggu selama beberapa menit. Hasil positif ditunjukkan jika terbentuknya endapan berwarna coklat kemerahan (Kristanti *et al*, 2008).

Ekstrak *n*-heksana, aseton dan etanol daun medang sang masing-masing sebanyak 5 tetes dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berbeda, lalu tambahkan beberapa tetes pereaksi Dragendorff dan tunggu selama beberapa menit. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya endapan jingga (Kristanti *et al*, 2008).

#### 3.3.3.2 Uji Flavonoid

Ekstrak *n*-heksana, aseton dan etanol daun medang sang masing-masing 5 tetes Dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berbeda, lalu tambahkan 2-4 tetes

asam klorida dan 2-3 potong kecil logam magnesium. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna kuning hingga jingga (Achmad, 1986).

### **3.3.3.3 Uji Fenol/Tanin**

Ekstrak *n*-heksana, aseton dan etanol daun medang sang masing-masing 5 tetes Dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berbeda, lalu menambahkan 2-3 tetes  $\text{FeCl}_3$  5%. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya warna hijau gelap atau biru gelap (Harborne, 1987).

### **3.3.3.4 Uji Terpenoid dan Steroid**

Ekstrak *n*-heksana, aseton dan etanol daun medang sang masing-masing 5 tetes Dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berbeda, lalu menambahkan 2 mL asam asetat glasial dan 3 tetes  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat ke dalam tabung reaksi. Hasil pengamatan terpenoid positif ditandai dengan perubahan warna merah kecoklatan sampai ungu. positif pada steroid ditunjukkan dengan adanya warna merah lalu berubah menjadi hijau dan biru (Hidayah *et al*, 2021).

### **3.3.3.5 Uji Saponin**

Ekstrak *n*-heksana, aseton dan etanol daun medang sang masing-masing 5 tetes Dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berbeda lalu ditambahkan 5 mL aquades kemudian dipanaskan selama 5 menit dan dikocok selama 15 menit. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya busa dan tidak hilang selama 15 menit (Simanjuntak *et al*, 2020).

## **3.3.4 Uji Antibakteri**

### **3.3.4.1 Pembuatan Media, Sterilisasi Alat dan Bahan**

Sebanyak 38 gram MHA dilarutkan dengan akuades sebanyak 1 liter. Lalu dipanaskan hingga mendidih dan larut kemudian didiamkan. Cawan petri dilapisi menggunakan kertas dan masukkan didalam plastik tahan panas. Selanjutnya disterilkan menggunakan *autoclave* dengan suhu  $121^\circ\text{C}$  selama 25 menit (Lukman SR, 2013).

### **3.3.4.2 Peremajaan Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escheria Coli***

Sebanyak 5 mL media agar yang sudah steril dimasukkan dalam cawan petri

sampai tertutupi dasar cawan lalu tunggu hingga memadat. Setelah memadat, mengambil satu jarum ose bakteri dan menggoreskannya di media secara *zig-zag*. Selanjutnya inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dalam inkubator (Ramadhani, 2015).

Larutan uji dibuat dengan variasi konsentrasi ekstrak *n*-heksana, aseton, dan etanol daun medang yaitu 250 ppm, 500 ppm, 750 ppm, dan 1000 ppm dilarutkan dalam 1 mL DMSO.

#### **3.3.4.3 Pengujian Antibakteri**

Larutan uji dibuat dengan variasi konsentrasi ekstrak *n*-heksana, aseton, dan etanol daun medang yaitu 250 ppm, 500 ppm, 750 ppm, dan 1000 ppm dilarutkan dalam 1 mL DMSO. Larutan DMSO sebagai kontrol negatif dan *novobiocin* sebagai kontrol positif. Selanjutnya kertas cakram berukuran 6 mm dimasukkan ke dalam larutan uji selama 15 menit. Kemudian kertas cakram pada larutan uji dimasukkan dalam media yang telah dioleskan bakteri hasil inokulasi. Lalu inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Pengukuran aktivitas antibakteri dapat dilakukan dengan menggunakan jangka sorong untuk melihat zona bening yang terbentuk terhadap pertumbuhan bakteri (Ramadhani, 2015).

#### **3.3.5 Analisis LC-MS**

LC-MS (*Liquid Chromatography Mass Spectrometry*) pada analisis datanya akan diperoleh kromatogram dengan bentuk alur tinggi *peak* serta mendapatkan berat molekul dari senyawa yang terdapat dalam ekstrak daun medang sang sehingga dapat diketahui jenis senyawa yang ada dalam sampel daun medang sang (Mangurana *et al*, 2019).

#### **3.3.6 Analisis Data**

##### **3.3.6.1 Rendemen Ekstrak**

Rumus penentuan nilai rendemen ekstrak sebagai berikut:

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat simplisia}} \times 100\% \text{ (Yoga et al., 2015)}$$

### 3.3.6.2 Uji Aktivitas Antibakteri

Pengukuran zona hambat sampel terhadap bakteri dihitung dengan rumus sebagai berikut (Rastina *et al.*, 2015):

Zona Hambat = Diameter zona bening (mm) – Diameter kertas cakram (mm)

