

BAB III

BAHAN DAN METODA PENELITIAN

3.1. Tempat dan waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biokimia dan Laboratorium Kimia Organik Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Riau.

3.2 Alat dan Bahan yang digunakan

3.2.1. Bahan

Buah tanaman takokak diambil dari KOMPOS FMIPA UNRI, asam galat, aseton, AlCl_3 (Merk Schuchard, Hohenbrunn Germany No.85662), chatechin, CH_3COOH , $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, DPPH 1,1-difenil-2-pikril hidrazil hidrat (Sigma-Aldrich, Steinheim Germany No.49/7329/970), FeCl_3 , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, HCl , metanol p.a, NaNO_2 , Nutrient Broth, Nutrien Agar, reagen Folin Cioucalteau, reagen FRAP, sodium karbonat, TPTZ 2,4,6-tripyridyl-S-triazine (Sigma-Aldrich, Switzerland No.07329/970), dan bahan-bahan kimia lain yang diperlukan sesuai dengan prosedur kerja. reagen FRAP.

3.2.2. Alat

Autoklaf, Spektronik Genesis II (Milton Roy Company, USA No.4001/4), cawan petri diameter 120 mm, desikator, inkubator, pH meter (Produksi No. Cat), Rotary evaporator Heidolph VV 2000, Sentrifuga SED 5 (United Kingdom), dan alat-alat di laboratorium yang sesuai prosedur kerja.

3.2.3. Mikroorganisme yang digunakan

Bakteri yang digunakan adalah bakteri *Staphylococcus aureus*, *Escheria coli* dan *Pseudomonas aeruginosa* yang diperoleh dari koleksi Laboratorium Mikrobiologi ITB.

3.3. Tahapan Penelitian

Penelitian ini terdiri dari persiapan ekstrak metanol dari sampel segar dan sampel kering buah takokak. Parameter kimia yang akan diuji terhadap ekstrak metanol buah takokak segar dan kering terdiri dari kandungan total fenol, kandungan total flavonoid,

aktivitas antioksidan penangkap radikal bebas (DPPH) dan aktivitas antioksidan pereduksi radikal bebas (FRAP) serta penentuan aktivitas antibakteri ekstrak metanol dari sampel kering buah takokak. Setiap analisis parameter dilakukan lima kali pengulangan.

3.4. Prosedur Penelitian

3.4.1. Penanganan Sampel

Buah takokak yang diambil dari Kompos FMIPA UNRI, dipetik, dicuci bersih dan sebagian dikeringkan pada suhu 40°C. Sampel segar dan kering buah takokak ini kemudian dipersiapkan untuk pembuatan ekstrak metanol buah takokak.

3.4.2. Persiapan ekstrak metanol buah takokak

Ekstrak dipersiapkan untuk penentuan kandungan total fenol, total flavonoid, aktivitas antioksidan dan antibakteri. Sampel segar buah takokak (100 gram), diekstrak menggunakan metanol p.a 80 % (300 ml) disentrifugasi selama 10 menit pada 5000 rpm. Supernatan yang diperoleh siap dianalisa. Penentuan kandungan total fenol, total flavonoid, dan aktivitas antioksidan pada sampel kering dilakukan dengan cara yang samanamun sampel kering dihaluskan terlebih dahulu hingga menjadi bubuk .

Pada pembuatan ekstrak metanol untuk uji antibakteri, sampel kering buah takokak (500 gram) direndam dalam metanol p.a 80 % (1,5 L) kemudian disimpan selama 24 jam. Maserat yang diperoleh ditampung dan kemudian pelarut diuapkan dengan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental metanol.

3.4.3. Pengukuran kadar air

Buah takokak yang telah dipetik dan dibersihkan sebanyak 2 gram (dipotong tipis), dimasukkan kedalam wadah yang sudah ditimbang sebelumnya, kemudian dikeringkan di dalam oven pada temperatur 105°C selama 3 jam. Setelah kering buah takokak didinginkan di dalam desikator dan ditimbang beratnya. Keringkan kembali di dalam oven selama 30 menit kemudian masukkan ke dalam desikator lalu ditimbang. Pengeringan dilakukan lagi sampai didapatkan berat konstan.

Untuk menghitung kadar air buah takokak digunakan rumus sebagai berikut (Suin, 1997):

$$\text{KA buah takokak} : \quad \frac{\text{BB buah takokak} - \text{BK buah takokak} \times 100\%}{\text{BB buah takokak}}$$

Dimana : KA = kadar air

BB = berat basah

BK = berat kering

3.5. Analisis Parameter

3.5.1. Uji Aktivitas Antioksidan

a. Metoda DPPH

Kandungan total aktivitas antioksidan penangkap radikal bebas diukur dengan uji DPPH (Gil dkk, 2000). Kristal DPPH (2,4 mg) dilarutkan dalam 100 mL metanol 80%, kemudian diambil 3 mL larutan DPPH tersebut dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Supernatan 1ml dari ekstrak metanol sampel, ditambahkan ke dalam tabung reaksi. Campuran divorteks dan dibiarkan bereaksi selama 15 menit pada temperatur ruang dan di tempat gelap. Absorbansi sampel diukur pada panjang gelombang 515 nm menggunakan spektrophotometer dan hasilnya dihitung dalam asam askorbat ekivalen (AAE mg/g) menggunakan kurva standar asam askorbat (0, 5, 10, 15, 20 dan 25 mM). Aktivitas hambatan (%), dikalkulasikan menggunakan rumus:

$$\% \text{ DPPH hambatan} : [(A_{\text{Kontrol}} - A_{\text{Ekstrak}}) / A_{\text{kontrol}}] \times 100$$

b. Metoda FRAP

Kandungan total aktivitas antioksidan diukur menggunakan uji FRAP dengan $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ sebagai standar (Vichitphan dkk, 2007). Reagen FRAP terdiri dari 3 campuran larutan induk yaitu 1). Larutan induk buffer asetat 0,1 M (2,72 g $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ dan 1,55 mL $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ dilarutkan dengan 100 mL aquadest, dari larutan tersebut diambil 3,7 mL $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ dan 46,3 mL $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ lalu dimasukkan ke dalam labu takar 100 mL dan ditambahkan aquadest sampai tanda batas) pH 3.6. 2). Larutan induk TPTZ (2, 4, 6-tripydydyl-s-triazine) 10 mM dalam HCl 40 mM. 3). Larutan induk $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mM. Ketiga larutan induk tersebut (buffer asetat, TPTZ, dan

$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) dicampur dengan perbandingan (10:1:1) untuk membuat reagen FRAP. Reagen FRAP (3 mL) dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 100 μL ekstrak dan 300 μL akuades. Campuran dibiarkan bereaksi selama 8 menit pada temperatur ruang di tempat gelap. Absorbansi sampel diukur pada panjang gelombang 593 nm menggunakan spektrophotometer dan hasilnya dihitung dalam Fe^{+2} ekivalen (Fe^{+2} mg/g) menggunakan kurva standar $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0, 200, 400, 600, 800, dan 1000 $\mu\text{M/L}$).

3.5.2. Analisis Total Fenol

Kandungan total fenol diukur dengan metoda Folin-Ciocalteau (Sun dkk, 2007) menggunakan asam galat sebagai standar. Dibuat larutan induk asam galat dengan 1000 ppm. Dari larutan induk ini, disiapkan larutan standar asam galat dengan konsentrasi (20, 40, 60, 80, 100 ppm / 10 ml aquadest). Ekstrak metanol sampel (0,4 mL) dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 3 mL reagen Folin-Ciocalteau 2,5 N yang sudah diencerkan 10x dengan aquadest. Campuran dibiarkan bereaksi selama 5 menit pada temperatur ruang dan di tempat gelap, kemudian ditambahkan 3 mL Na_2CO_3 6%. Campuran divorteks dan diinkubasi selama 90 menit di tempat gelap, lalu disaring menggunakan kertas saring. Absorbansi sampel diukur pada panjang gelombang 750 nm menggunakan spektrofotometer dan hasilnya dihitung dalam asam galat ekivalen (AGE mg/g) menggunakan kurva standar asam galat (20, 40, 60, 80 dan 100 ppm).

$$Y = ax + b$$

Y : absorban dari sampel

X : konsentrasi total fenol (ppm)

3.5.3. Analisis kadar total flavonoid

Kandungan total flavonoid diukur menggunakan metoda kalorimetrik (Chang & Xu, 2007). Supernatan (0,5 mL) dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 2,5 mL aquadest dan 0,15 mL NaNO_2 5%. Campuran dibiarkan bereaksi selama 6 menit pada temperatur ruang di tempat gelap. Sebanyak 0,3 mL $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 10% ditambahkan kedalam campuran dan diinkubasi selama 5 menit pada temperatur

ruang di tempat gelap, lalu disaring menggunakan kertas saring. Absorbansi sampel diukur pada panjang gelombang 510 nm menggunakan spektrophotometer dan hasilnya dihitung dalam katekin ekivalen (KE mg/g) menggunakan kurva standar katekin (20ppm, 40ppm, 60ppm, 80ppm, 100ppm). Dibuat larutan standar katekin 1000 ppm. Dari larutan induk ini, disiapkan larutan standar dengan konsentrasi masing-masing (20 ppm, 40ppm, 60ppm, 80ppm, 100ppm / 10 ml aquadest).

3.5.4. Peremajaan bakteri

Peremajaan bakteri bertujuan untuk mengaktifkan kembali dan mengembangkan bakteri. Pertama-tama dipersiapkan media *nutrient agar* dituang ke dalam cawan petri, dibiarkan beberapa saat sampai memadat, lalu digoreskan jarum inokulasi dari agar miring berisi biakan bakteri murni ke media yang baru dibuat. Media baru berisi biakan bakteri ini diinkubasi selama 24 jam. Setelah 24 jam dipersiapkan media *nutrient broth* sesuai prosedur kemasan, lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi masing-masing sebanyak 9 ml dan ditutup dengan kapas kemudian disterilkan dalam autoklaf. Jarum ose yang telah disterilkan digoreskan pada *nutrient agar* yang berisi biakan bakteri. Jarum ose selanjutnya dicelupkan ke dalam tabung reaksi berisi media *nutrient broth*. Tabung ditutup dengan kapas dan kemudian diinkubasi pada suhu 35-37°C selama 24 jam. Semua perlakuan dikerjakan secara aseptik (Collins dkk, 2004).

3.5.5. Uji Aktivitas antibakteri dengan metode Difusi (Seeley Dkk, 2007)

Biakan bakteri dalam agar miring diinokulasi dalam larutan NB (Nutrient Broth) yang telah disiapkan dalam keadaan steril, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

Ke dalam cawan petri yang sudah disterilisasi, masukkan 1 mL larutan NB yang berisi biakan bakteri, kemudian tambahkan 15 mL NA (Nutrient Agar) digoyang-goyang agar bakteri tersuspensi merata. Media NA dibiarkan memadat, kemudian diletakkan kertas cakram (diameter 6 mm) yang telah dicelupkan ke dalam sampel yang akan diuji dengan konsentrasi sampel 1%, 2%, 3%, 4% dan telah dilarutkan dalam etanol absolut. Sebagai kontrol negatif adalah etanol absolut sedangkan kontrol positif digunakan antibiotik *streptomisin*. Selanjutnya diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C dengan membalikkan cawan petri. Diameter daerah bening disekitar kartas cakram menunjukkan

uji positif diukur, diameter daerah bening yang diperoleh diukur setelah diinkubasi selama 24 jam dan dibandingkan dengan senyawa standar streptomisin.

Uji ini dilakukan pada ketiga bakteri dengan tiga kali pengulangan. Pengujian ini dilakukan secara aseptik. Dari pengujian ini, akan diketahui ekstrak mana yang memiliki aktifitas antibakteri.

3.6. Analisis Data

Analisis data dilakukan secara statistik menggunakan metoda *Analysis Variance* (ANOVA) dan *Duncan's News Multyple Range Test* (DNMRT) pada taraf 5%. Analisis antibakteri dilakukan dengan mengukur zona hambatan yang dihasilkan dan kemudian menentukan konsentrasi terkecil yang didapatkan untuk menghambat pertumbuhan bakteri (MIC).