BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Waktu pelaksanaan penelitian ini adalah pada bulan Juli sampai Oktober 2013. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Teknik Pengolahan Sawit dan Mikrobiologi Politeknik Kampar.

B. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah seperangkat alak ekstraksi refluks, *oven, rotari evaporator, inkubator, autoclafe*, timbangan analitis, blender/ penggiling, ayakan ukuran 100 mesh, tabung reaksi, kawat ose, spatula, kertas saring, cawan petri dan lampu bunsen.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah jamur *Trichophyton mentagrophytes*, daun ketepeng cina, etanol 70%, n-heksana, akuades, KOH 30 %, HgCl, KI, asam asetat, asam sulfat, $FeCl_3$, sebuk Mg, H_2O_2, amoniak, HCl, ketokonazol 2%, PDA dan batu es.

C. Prosedur Penelitian

1. Pengambilan dan Pengolahan Sampel

Daun ketepeng cina segar diambil sebanyak 4 kg. Kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 50 °C selama 3-4 hari. Dilakukan penimbangan dengan menggunakan timbangan teknis hingga berat konstan.

sampel kering diblender sampai halus dan diayak dengan ayakan dengan ukuran 100 mesh. Hasil pengayakan yang berupa serbuk simplisia disimpan dalam erlenmeyer.[1]

2. Pembuatan Larutan Pereaksi

2.1 Larutan Pereaksi Meyer

Pereaksi Meyer terdiri dari: larutan pertama (1,358 g $HgCL_2$ + 60 ml akuades) dan larutan kedua (5 g KI + 10 ml akuades). Tuangkan larutan yang pertama kedalam larutan yang kedua, diencerkan dengan menggunakan aquades sampai batas 100 ml. Pereaksi ini merupakan pereaksi untuk hampir semua alkaloida dengan membentuk endapan putih dalam suasana sedikit asam.[2]

2.2 Larutan Pereaksi Liebermann-Burchard

Pereaksi Liebermann-Burchard terdiri dari anhidrida asam asetat (p.a) dan asam sulfat (p.a) dengan perbandingan 3:1.[3]

2.3 Pereaksi Besi (III) Klorida 1%

1 g $FeCl_3$ dilarutkan dalam akuades hingga volume 100 ml, larutan dipindahkan kedalam erlenmeyer.

3. Skrining Fitokimia Ekstrak Daun Ketepeng Cina

Skrining fitokimia dilakukan untuk mengetahui jenis senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam daun ketepeng cina.

---

[1] Sintong Parsaroan Sihombing , *Studi Pemanfaatan Ekstrak Kulit Jengkol (Pithecellobium jiringa) Sebagai Antioksidan Alami* , Skripsi, UNIMED, Medan, 2005, Hlm. 23

[2] Mulyono HAM, *Membuat Reagen Kimia Di Laboratorium,* (Jakarta: Bumi Aksara, 2009), Hlm. 71

[3] Siadi, "Ekstrak Bungkil biji Jarak Pagar (*Jatropha Curcas*)Sebagai Biopestisida Yang Efektif Dengan Penambahan Larutan NaCl", April 2012, Hlm. 78

3.1 Flavonoid

Sebanyak 1 g serbuk simplisia ditambahkan dengan etanol 95% sampai semua sampel terendam dan dipanaskan. Lapisan atas dipipet dan ditambahkan dengan HCl pekat 2 N dan serbuk Mg. Jika terbentuk endapan warna merah, maka sampel positif mengandung flavonoid.

3.2 Alkaloid

Sebanayak 4 g sampel kering ditambahkan kloroform secukupnya, kemudian ditambahkan 10 ml amoniak dan 10 ml kloroform. Larutan disaring kedalam tabung reaksi dan filtratnya ditambahkan 10 tetes H_2SO_4 2 N. Campuran dikocok dengan teratur dan dibiarkan beberapa menit sampai terbentuk 2 lapisan. Lapisan atas dipipet sebanyak 1 ml dan dimasukkan kedalam tabung reaksi dan di tambahkan beberapa tetes pereaksi Meyer. Apabila terbentuk endapan putih, maka sampel positif mengandung alkaloid.[4]

3.3 Steroid, Triterpenoid dan Saponin

Sebanyak 10 g sampel diekstraksi dengan metanol panas, disaring dan dipekatkan. Ekstrak metanol diekstraksi dengan dietil eter. Ekstrak yang larut diuji dengan reagen Libermann-Burchard. Warna biru menunjukkan positif steroid dan warna merah positif triterpenoid. Ekstrak yang tidak larut kemudian dilarutkan dalam air

[4] Mulyono HAM, Op. Cit., Hlm. 31

dan dikocok. Apabila terdapat busa yang stabil selama ± 30 menit, ini menunjukkan positif saponin.[5]

3.4 Antrakuinon

Sebanyak 1 g ekstrak ditambah 10 ml KOH 0,5 M dan 1 ml hidrogen peroksida 5% dipanaskan selama 10 menit, kemudian disaring, diasamkan dengan asam asetat, dan diekstraksi dengan 5 ml benzena. Lapisan benzena dipisahkan dan ditambahkan amoniak. Hasil positif ditunjukkan jika pada lapisan amoniak terbentuk warna merah dan lapisan benzena tidak berwarna.[6]

3.5 Tanin

Sampel sebanyak 20 mg ditambahkan dengan etanol sampai semua sampel terendam. Kemudian ditambahkan 2-3 tetes larutan $FeCl_3$ 1%. Jika terbentuk warna hitam kebiruan atau hijau menunjukkan sampel positif mengandung tanin.[7]

---

[5] Frida Oesman , *dkk*,” Antifungal Activity Of Alkaloid From Bark Of Cerbera Odollam” Vol. 10, 2010, Hlm. 19

[6] Wibowo Mangunwardoyo , *dkk*, “Ekstraksi dan Identifikasi Senyawa Antimikroba Herba Meniran (Phyllanthus niruri L.)”, Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia, 2009, Hlm. 3

[7] Mira Marlinda, Meiske S. Sangi, Audy D. Wuntu, Analisis Senyawa Metabolit Sekunder dan Uji Toksisitas Ekstrak Etanol Biji Buah Alpukat (percea americana Mill), UNSRAT, 2012, Hlm. 25

Tabel III. 1 Contoh Tabel Hasil Skrining Fitokimia

No	Golongan senyawa	Hasil	Karakteristik
1	Flavonoid		
2	Alkaloid		
3	Steroid		
4	Triterpenoid		
5	Sponin		
6	Antrakuinon		
7	Tanin		

4. Pembuatan Media PDA

Sebanyak 3,9 gram PDA bubuk dilarutkan dalam 100 ml akuades. diaduk dan kemudian dimasukkan ke dalam *autoclafe* dan di panaskan pada suhu 121°C selama 15 menit. Kemudian PDA yang telah larut dituangkan ke dalam 3 cawan petri yang telah di sediakan pada *laminar flow*. Tuangkan PDA cair dan didinginkan serta di sterilisasi dalam *laminar flow* dengan menggunakan lampu UV.

5. Ekstraksi Refluks

Sebanyak 50 g serbuk simplisia dibungkus dengan kertas saring dan diikat. Kemudian simplisia dimasukkan kedalam labu alas bulat dan ditambahkan 1 liter etanol. Atur suhu sesuai titik didih etanol (78 °C) dan jalankan proses ekstraksi refluks selama 2 jam. Lakukan penggantian pelarut sebanyak 2 kali setiap 2 jam. Ekstrak yang didapatkan dipekatkan

dengan *rotari evaporator*. Langkah ini dilakukan untuk jenis pelarut n-heksana (titik didih 69 °C) dan akuades (titik didih 100 °C).

6. Penentuan Pengaruh Jenis Pelarut Terhadap Jumlah Ekstrak Daun Ketepeng Cina

Penentuan pengaruh jenis pelarut terhadap jumlah ekstrak dilakukan dengan cara membandingkan berat awal simplisia dengan berat kering ekstrak yang didapat dengan rumus:

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{bobot\ ekstrak\ (g)}{bobot\ serbuk\ yang\ diekstrak\ (g)} \times 100\%$$

Pelarut dengan % rendemen terbesar merupakan pelarut yang paling baik untuk ekstraksi daun ketepeng cina.

7. Penentuan Pengaruh Jenis Pelarut Terhadap Daya Antifungi Ekstrak Daun Ketepeng Cina

Penentuan pengaruh jenis pelarut terhadap daya antifungi dilakukan dengan metode difusi agar. Metode difusi pada lempeng agar digunakan untuk melihat adanya aktivitas antifungi dari hasil ekstraksi daun ketepeng cina. Ekstrak etanol, n-heksana, aquades, kontrol positif (ketokonazol 2%) dan kontrol negatif (etanol, n-heksana dan aquades tanpa ekstrak) sebanyak 0,1 ml di pipet dan di teteskan kedalam sumuran yang telah dibuat dengan diameter 7 mm pada permukaan media PDA yang mengandung inokulum jamur, kemudian diinkubasi selama 48 jam pada suhu 30 °C. Daerah hambatan diukur berdasarkan zona bening yang

terbentuk dengan penggaris berskala. Pengulangan dilakukan sebanyak 3 kali.[8]

Diameter zona hambat = $\frac{D1+D2+D3}{3}$

Dimana : D_1, D_2, D_3 adalah areal bening (mm)

Tabel III. 2 Tabel Diameter Daya Antifungi Ekstrak Daun Ketepeng Cina

No	**Jenis Ekstrak**	**Banyak Pengulangan**			**Rata-rata (mm)**
		1 (mm)	**2 (mm)**	**3 (mm)**	
1	Ekstrak akuades				
2	Ekstrak etanol				
3	Ekstrak n-heksana				
4	Akuades				
5	Etanol 70%				
6	n-heksana				
7	Ketokonazol 2%				

[8] Wibowo Mangunwardoyo, dkk, "Ekstraksi dan Identifikasi Senyawa Antimikroba Herba Meniran (*Phyllanthus niruri* L.)", Hlm. 3