

BAB III

TATA KERJA

3.1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah neraca analitik (Ohaus), *beaker glass* (Pyrex), gelas ukur (Pyrex), erlenmeyer (Schott), sentrifugasi (PLC Series), vortex (Thermolyne 37600 Mixer Barssted), tabung reaksi (Pyrex), pipet tetes, cawan penguap, penangas air, mortir, stamper, penjepit tabung, cawan petri, autoklaf (GEA), kawat ose, jangka sorong (XP teel), inkubator (Memmert) *Laminar Air Flow* (LAF), pipa kapiler, dan *chamber*.

3.2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sediaan *edible film* ekstrak pecut kuda, etanol, larutan ammonia 10%, kloroform, asam klorida 2 N, pereaksi *Mayer*, pereaksi *Dragendorf*, magnesium, *aquadest*, pereaksi besi (III) klorida, larutan 1% gelatin-NaOH, eter, larutan vanillin 10%, larutan KOH 5%, larutan asam klorida, pereaksi *Lieberman-Burchard*, bakteri *Staphylococcus aureus*, media *Nutrient Agar* (NA) (Oxoid), NaCL 0,9%, dan plat silika gel GF 254 (Merck).

3.3. Metode Penelitian

3.3.1. Preparasi sampel sediaan *edible film* ekstrak pecut kuda

Satu gram sediaan *edible film* ditambahkan 10 mL etanol 96%. Campuran tersebut dikocok dengan vortex selama 5 menit. Larutan sediaan *edible film* disentrifugasi dengan 300 rpm selama 30 menit sampai terlihat adanya pemisahan fase (Priani *et al.*, 2013). Pada fase etanol diambil selanjutnya diuapkan pada suhu ruangan.

3.3.2. Skrining sediaan *edible film* ekstrak pecut kuda

Untuk mengetahui kandungan golongan metabolit sekunder yang terdapat dalam *edible film* ekstrak pecut kuda dilakukan skrining pada sediaan sebagai berikut:

A. Alkaloid

Crude ekstrak pecut kuda dibasakan dengan larutan ammonia 10%, ditambahkan kloroform, kemudian dikocok. Pada lapisan kloroform dipipet dan ditambahkan

larutan asam klorida 2 N. Campuran dikocok kuat hingga terdapat dua lapisan. Lapisan asam (bagian atas) dipipet, kemudian dibagi menjadi tiga bagian.

Bagian 1 : Ditambahkan pereaksi *Mayer*, jika terjadi kekeruhan atau endapan berwarna putih, menunjukkan sampel uji mengandung alkaloid.

Bagian 2 : Ditambahkan pereaksi *Dragendorf*, jika terjadi kekeruhan atau endapan berwarna jingga coklat, menunjukkan sampel uji mengandung alkaloid.

Bagian 3 : Digunakan sebagai pembanding (Tiwari *et al.*, 2011).

B. Flavonoid

Sampel uji berupa *crude* ekstrak pecut kuda dimasukkan ke dalam tabung reaksi uji kemudian ditambahkan serbuk magnesium dan asam klorida 2 N. Sampel uji dipanaskan di tangas air selama 30 menit, ditambahkan amil alkohol dikocok kuat-kuat. Terbentuknya warna kuning hingga merah pada lapisan amil alkohol menunjukkan sampel uji mengandung flavonoid (Tiwari *et al.*, 2011).

C. Polifenol

Sampel uji berupa *crude* ekstrak pecut kuda dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan sedikit air, kemudian dipanaskan. Ditambahkan larutan pereaksi besi (III) klorida. Terbentuknya warna biru kehitaman menunjukkan sampel uji mengandung polifenol (Tiwari *et al.*, 2011).

D. Tanin

Sejumlah sampel uji berupa *crude* ekstrak pecut kuda ditambahkan larutan 1% gelatin-NaOH. Jika terbentuknya endapan putih menunjukkan sampel uji mengandung tanin (Tiwari *et al.*, 2011).

E. Monoterpen dan Sesquiterpen

Sampel uji berupa *crude* ekstrak pecut kuda digerus dengan eter, diambil pada lapisan eter dan disimpan pada cawan penguap, disimpan hingga eter menguap. Hasil penguapan ditambahkan larutan vanillin 10% dalam asam sulfat pekat. Jika terbentuk warna-warna menunjukkan sampel uji mengandung monoterpen dan sesquiterpen (Tiwari *et al.*, 2011).

F. Kuinon

Sampel uji berupa *crude* ekstrak pecut kuda dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian dipanaskan pada penangas air dan ditambahkan larutan KOH 5%. Jika

terbentuknya warna kuning hingga merah menunjukkan sampel uji mengandung kuinon (Tiwari *et al.*, 2011).

G. Saponin

Sampel uji berupa *crude* ekstrak pecut kuda dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan *aquadest* dan dipanaskan beberapa saat. Setelah dingin dikocok kuat-kuat selama lebih kurang 30 detik. Jika terbentuknya busa minimal 1 cm dan tetap selama beberapa menit serta tidak hilang dengan penambahan 1 tetes larutan asam klorida encer sampel uji mengandung saponin (Tiwari *et al.*, 2011).

H. Steroid dan triterpenoid

Sampel uji berupa *crude* ekstrak pecut kuda ditambahkan dengan eter kemudian digerus, diambil pada lapisan eter dan disimpan pada cawan penguap, eter dibiarkan untuk menguap. Hasil penguapan ditambahkan pereaksi *Lieberman-Burchard*. Jika terbentuk warna ungu menunjukkan adanya senyawa triterpenoid dan warna biru menunjukkan adanya senyawa steroid yang terkandung dalam sampel uji (Tiwari *et al.*, 2011).

3.3.3. Kromatografi lapis tipis (KLT)

Sampel uji berupa *crude* ekstrak pecut kuda ditetesi etanol 96% hingga larut. Sampel uji ditotolkan pada plat silika gel GF 254 sebagai fase diam dengan menggunakan pipa kapiler. Plat dimasukkan ke dalam *chamber* jenuh oleh fase gerak. Fase gerak yang digunakan n-heksan : etil asetat (9:1) (Yuniarni, 2013).

3.3.4. Uji aktivitas antibakteri sediaan *edible film* ekstrak pecut kuda

Pengujian aktivitas antibakteri dari sediaan *edible film* menggunakan metode difusi agar. Sampel uji berupa sediaan *edible film* berdasarkan atas konsentrasi HMPC K100M dibentuk lingkaran dengan diameter 6 mm. Satu-empat ose bakteri *Staphylococcus aureus* diencerkan dengan larutan NaCl 0,9% steril hingga homogen, kemudian bakteri diinokulasi dengan cara dituangkan sebanyak 50 µm, selanjutnya ditambahkan media *Nutrient Agar* (NA) pada suhu 45°C sebanyak 20 mL. Lubang dibuat dengan menggunakan pervorator dengan diameter 5 mm. Sampel uji diletakkan pada masing-masing lubang ditambahkan NaCl 0,9% sebanyak 50 µm. Sampel uji diinkubasi di dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam. Parameter yang digunakan adalah terbentuknya zona bening pada media *Nutrient Agar* (NA). Diameter zona hambat diukur dengan menggunakan jangka sorong (Rahman, 2013).