

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan selama 5 bulan di Laboratorium Kimia Organik serta UPT Instrumen Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya. Analisis SEM-EDX dilakukan di Laboratorium Sentral Mineral dan Maju Universitas Negeri Malang. Analisis pengujian antibakteri dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas kedokteran Universitas Brawijaya.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Sampel dan bahan penelitian

Sampel bunga pinus yang digunakan dalam penelitian ini yaitu sampel bunga pinus dengan spesies *Pinus merkusii* Jungh & De Vriese. Sedangkan bahan kimia yang digunakan antara lain tembaga(II) sulfat pentahidrat, seng klorida, aquades, dan etanol (Smart-Lab), reagen *Folin-Ciocalteu*, asam galat, media NA (Nutrient Agar) dan biakan murni bakteri *Staphylococcus aureus*.

3.2.2 Alat penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu neraca analitik, *waterbath*, seperangkat alat gelas, kertas saring, *sentrifuge*, tabung *sentrifuge*, tanur (Nabertherm), sonikator, spektrofotometer UV-Vis (1601 SHIMADZU), spektrofotometer FTIR (8400 SHIMADZU) dan SEM-EDX (SEM FEI INSPECT S 50 dan AMETEX X-Ray *Microanalysis*) dan seperangkat alat untuk pengujian bakteri.

3.3 Tahapan Penelitian

1. Preparasi sampel bunga *Pinus merkusii* Jungh. & De Vriese
2. Ekstraksi bunga *Pinus merkusii* Jungh. & De Vriese
3. Uji Fenolik dan kandungan fenol total ekstrak bunga pinus serta karakterisasinya
4. Sintesis nanopartikel tembaga(II) oksida dan karakterisasinya
5. Sintesis nanopartikel seng(II) oksida dan karakterisasinya
6. Uji aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi cakram

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Preparasi sampel bunga pinus

Bunga pinus (*Pinus merkusii*) yang diperoleh dari Hutan Pinus di Coban Rais Kota Batu. Sampel yang diperoleh dicuci hingga bersih untuk menghilangkan kotoran, kemudian bunga pinus dikeringkan dengan cara diangin-anginkan. Sampel dipotong kecil-kecil kemudian di giling hingga menjadi serbuk untuk proses ekstraksi.

3.4.2 Ekstraksi bunga Pinus

Prosedur ekstraksi bunga pinus dikerjakan mengikuti Chudarkodi dkk dengan modifikasi [65]. Sebanyak 100 gram bunga pinus yang sudah kering dicampur dengan 500 mL air. Kemudian diekstraksi dengan cara maserasi selama 2 jam pada suhu 70 °C. Campuran yang diperoleh selanjutnya disaring menggunakan kertas saring Whatman No.1 untuk memisahkan ampas bunga pinus dan filtrat. Filtrat ini sebagai ekstrak bunga pinus, dan disimpan didalam lemari es pada suhu 4 °C sebelum digunakan untuk sintesis nanopartikel tembaga(II) oksida dan seng(II) oksida.

3.4.3 Karakterisasi hasil ekstraksi bunga pinus

Sebagian ekstrak bunga pinus dipekatkan dengan rotary evaporator untuk mendapatkan ekstrak pekat. Disamping itu, sebagian ekstrak pekat ini juga dikeringkan dengan dalam oven pada suhu 100 °C. Kedua sampel selanjutnya dianalisis lebih lanjut dengan spektrofotometer UV-Vis dan FTIR. Karakterisasi dengan spektrofotometer UV-Vis dilakukan menggunakan pelarut etanol. Sedangkan karakterisasi dengan FTIR untuk kedua sampel menggunakan pellet potassium bromide dan dianalisis pada bilangan gelombang 4000 hingga 400 cm^{-1} .

3.4.4 Uji fitokimia senyawa fenolik ekstrak bunga pinus

Uji fitokimia senyawa fenolik dilakukan mengikuti prosedur Masruri dkk [66]. Larutan ekstrak bunga pinus ditimbang sebanyak 50 mg kemudian ditambahkan FeCl_3 1% (b/v). Adanya senyawa fenolik ditandai dengan perubahan warna larutan ekstrak menjadi hijau kehitaman.

3.4.5 Analisis kuantitatif kandungan fenol total dengan metode Folin-Ciocalteu

Pembuatan kurva kalibrasi asam galat

Pembuatan kurva standar larutan asam galat dikerjakan mengikuti prosedur Marjoni et al [67]. Pertama-tama dibuat larutan stok asam galat dengan konsentrasi 1 mg/mL dengan menimbang 50 mg asam galat dan ditambahkan 1 mL etanol 96%. Campuran ini diencerkan dengan aquades hingga volume akhir 50 mL. Dari larutan standar dibuat konsentrasi 100, 125, 150 dan 175 $\mu\text{g/mL}$ dengan mengambil secara berturut-turut 1 mL; 1,25 mL; 1,5 mL; dan 1,75 mL larutan stok dan kemudian masing-masing diencerkan dengan aquades hingga volume akhir 10 mL. Dari masing-masing konsentrasi asam galat ini, dipipet 0,2 mL dan ditambah 15,8 mL aquades dan 1 mL reagen *Folin-Ciocalteu* dan dikocok hingga homogen. Larutan ini didiamkan selama 8 menit, kemudian ditambahkan 3 mL larutan natrium karbonat 10% dan dikocok hingga homogen. Kemudian campuran larutan ini didiamkan selama 2 jam pada suhu 29 °C. Larutan ini selanjutnya diukur pada panjang gelombang dengan maksimum 765 nm. Dari hasil pengukuran, dibuat kurva standar kalibrasi hubungan antara konsentrasi asam galat ($\mu\text{g/mL}$) dengan nilai serapan.

Penetapan kandungan fenol total

Penetapan kandungan fenol total dari sampel dihitung dengan melakukan ekstrapolasi hasil analisis sampel ekstrak kedalam kurva standar kalibrasi. Dibuat larutan dengan konsentrasi 10 mg/mL dengan menimbang 100 mg ekstrak bunga pinus, dan dilarutkan hingga volume 10 mL dengan aquades. Kemudian diambil 0,2 mL larutan ekstrak ini dan ditambah dengan 15,8 mL aquades dan 1 mL reagen Folin. Kemudian campuran larutan ini didiamkan selama 8 menit, dan ditambah dengan 3 mL larutan natrium karbonat 10% dan didiamkan selama 2 jam pada suhu 29 °C. Larutan ini kemudian diukur nilai serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum 765 nm. Nilai serapan diekstrapolasikan ke kurva standar kalibrasi untuk mendapatkan konsentrasi fenol total per mg ekstrak yang ekuivalen dengan asam galat dengan satuan GAE/mg atau *gallic acid equivalent per milligram*.

3.4.6 Sintesis nanopartikel tembaga(II) oksida menggunakan ekstrak bunga pinus

Prosedur Sintesis nanopartikel CuO dikerjakan mengikuti Bhosale dan Bhanage dengan modifikasi [68]. Sebanyak 10 mL CuSO₄ 1,0 M ditambahkan ke dalam 100 mL ekstrak bunga pinus. Kemudian campuran disonikasi selama 60 menit. Kemajuan reaksi dapat diamati dengan perubahan warna dari campuran tersebut. Setelah reaksi selesai, campuran disaring menggunakan kertas saring untuk memisahkan endapan dan filtrat.

Filtrat yang dihasilkan merupakan campuran ekstrak bunga pinus dan nanopartikel tembaga oksida. Endapan yang diperoleh dicuci dengan air distilasi dan etanol absolut beberapa kali. Kemudian dikeringkan didalam oven untuk menghilangkan pelarut berlebih. Setelah itu dilakukan proses kalsinasi menggunakan tanur pada suhu 450 °C selama 3 jam untuk menghilangkan senyawa organik. Lalu produk dianalisis menggunakan FTIR, UV-Vis, dan SEM- EDX.

Dengan prosedur yang sama, dilakukan sintesis nanopartikel tembaga (II) Oksida menggunakan variasi waktu sonikasi yakni selama 60 menit dan 180 menit.

3.4.7 Sintesis nanopartikel seng(II) oksida menggunakan ekstrak bunga pinus

Prosedur Sintesis nanopartikel ZnO dikerjakan mengikuti Bhosale dan Bhanage dengan modifikasi [68]. Sebanyak 10 mL ZnCl₂ 1,0 M ditambahkan ke dalam 100 mL ekstrak bunga pinus. Kemudian campuran disonikasi selama 60 menit. Kemajuan reaksi dapat diamati dengan perubahan warna dari campuran tersebut. Setelah reaksi selesai, campuran disaring menggunakan kertas saring untuk memisahkan endapan dan filtrat.

Filtrat yang dihasilkan merupakan campuran ekstrak bunga pinus dan nanopartikel tembaga oksida. Endapan yang diperoleh dicuci dengan air distilasi dan etanol absolut beberapa kali. Kemudian dikeringkan didalam oven untuk menghilangkan pelarut berlebih. Setelah itu dilakukan proses kalsinasi menggunakan tanur pada suhu 450 °C selama 3 jam untuk menghilangkan senyawa organik. Lalu produk dianalisis menggunakan FTIR, UV-Vis, dan SEM- EDX.

Dengan prosedur yang sama, dilakukan sintesis nanopartikel tembaga (II) Oksida menggunakan variasi waktu sonikasi yakni selama 60 menit dan 180 menit.

3.4.8 Pengujian Aktivitas Antibakteri

Pengujian aktivitas antibakteri mengikuti prosedur Saravanan dkk yang dimodifikasi [69]. Aktivitas antibakteri ditentukan dengan metode difusi cakram. Untuk mengukur zona aktivitas penghambatan ekstrak bunga pinus, nanopartikel tembaga(II) oksida dan seng(II) oksida disiapkan dalam berbagai konsentrasi konsentrasi yaitu 3,125%, 6,25%, 12,5%, 25%, 50% dan 100%. Setiap 1 lempeng agar memiliki 1 konsentrasi. Diameter dengan ukuran 6 mm dibuat penggerak gabus steril dalam lempeng agar (NA) yang mengandung pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Berbagai konsentrasi dari nanopartikel tembaga dan seng oksida serta ekstrak yang bercampur dengan nanopartikel tembaga dan seng oksida dimasukkan ke dalam lempeng. Lempeng diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah itu, diameter zona penghambatan diukur dalam mm.

3.4.9 Analisis Data

No	Metode	Analisis
1	Ekstraksi Bunga Pinus (<i>Pinus merkusii</i>)	Karakterisasi dengan UV-Vis dan FTIR
2	Penetapan kandungan Fenol total	Karakterisasi Spektrofotometer UV-Vis
3	a. Nanopartikel CuO b. Nanopartikel ZnO	Karakterisasi dengan FTIR dan SEM-EDX
4	Uji aktivitas antibakteri nanopartikel tembaga dan seng oksida serta ekstrak yang bercampur nanopartikel tembaga dan seng oksida.	Uji aktivitas antibakteri dan uji statistik standar deviasi