

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian kualitatif, dengan metode eksperimental untuk menguji efek antibakteri ekstrak daun kangkung terhadap *Streptococcus mutans*.

3.2 Bahan dan Alat yang Digunakan

3.2.1 Bahan

Bahan yang digunakan adalah daun kangkung (1 kg), aquades, NA (nutrient agar), etil asetat, pereaksi FeCl₃, silika gel, FeCl₃ 5%, n-heksana, methanol, aquadest, kertas Whatcman, kapas steril, Ciprofloxacin, DMSO (dimethyl sulfoxide), *Streptococcus mutans*, plat KLT, pipa kapiler, aluminium foil, kertas saring.

3.2.2 Alat

Alat yang digunakan adalah mixer, alat maserasi, rotary evaporator, timbangan analitik, oven, penjepit, spatula, mortir dan stamper, cawan petri, batang pengaduk, labu ukur, gelas ukur, jangka sorong, penangas air, kompor listrik, laminar air flow (LAF), kapas steril, tusuk gigi, steril, bunsen, mikropipet, gelas kimia, tabung reaksi, batang pengaduk, spatula, botol coklat, timbangan analisis, mikropipet, kolom, gelas ukur, penetes, botol coklat, vial, lampu UV, ultraviolet, autoklaf, inkubator, sarung tangan, masker wajah, gelas porselen, gelas arloji, sumuran, cawan petri, labu ukur.

3.3 Waktu dan Tempat Penelitian

Tempat penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Bahan Alami, Universitas Buana Perjuangan Karawang. Dilakukan dari Maret hingga Juli 2021.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman bertempat di Pusat Transformasi Tanaman LIPI (Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia). Hasil pengukuran menunjukkan bahwa sampel yang digunakan adalah daun kangkung pagar bernomor B237/IV/DI.01/II/2021 Lampiran 1.

3.4.2 Hasil Rendemen

Ekstrak n-heksan daun kangkung pagar memiliki nilai rendemen 1,96%, ekstrak metanol daun kangkung pagar memiliki nilai rendemen 14,74%, dan ekstrak etil asetat daun kangkung pagar memiliki nilai rendemen 12,73%. nilai rendemen berkaitan dengan dengan bioaktif yang terkandung atau yang tersaring dalam tumbuhan tersebut, semakin tinggi nilai rendemen maka semakin tinggi kandungan senyawa yang tertarik pada tanaman tersebut.

3.4.3 Pembuatan Reagen Untuk Uji Fitokimia

a. Reagen Mayer

Larutkan 1,36 gram raksa (II) klorida dalam 60 ml air aquadest dalam gelas kimia. Lalu dalam gelas kimia terpisah larutkan 1 g kalium iodida dalam 10 ml air aquadest, campurkan kedua larutan, dan saring. Encerkan campuran hingga 100 ml dengan air aquadest dalam labu ukur.

b. Lieberman-Burchard

Campurkan total 5 ml anhidrida asetat dan 5 ml asam sulfat pekat dalam gelas kimia, lalu encerkan hingga 100 ml dengan pelarut etanol.

c. Besi (III) klorida 5%

Masukkan 5 gram kristal besi (III) klorida ke dalam gelas kimia. Kemudian gunakan hingga 100 ml air aquadest

d. Asam Sulfat 2 N

Masukkan 13,9 ml asam sulfat pekat secara perlahan melalui dinding kaca ke gelas kimia yang berisi 100 ml air aquadest, kemudian encerkan hingga 250 ml.

e. Natrium Hidroksida 1%

Dalam gelas kimia, gunakan air aquadest untuk melarutkan total 1 g natrium hidroksida dalam volume 100 ml.

3.4.4 Uji Fitokimia

a. Flavonoid

Sampel ekstrak daun kangkung pagar sebanyak 2 ml ditambahkan NaOH 2N, tunggu beberapa saat. Apabila terbentuk warna kuning, menunjukkan adanya senyawa flavonoid (Roghini dan Vijayalakshmi, 2018).

b. Alkaloid

Sebanyak 2 ml sampel ekstrak daun kangkung pagar ditambahkan 2 ml asam klorida pekat. Kemudian tambahkan beberapa tetes reagen Mayer. Jika larutan terbentuk, endapan hijau atau putih menunjukkan bahwa alkaloid positif (Roghini dan Vijayalakshmi, 2018).

c. Saponin

Tambahkan 2 ml sampel air ekstrak daun kangkung pagar dan 2 ml air aquadest bersama-sama dan aduk selama 15 menit. Jika terbentuk lapisan busa sebesar itu menandakan adanya saponin (Roghini dan Vijayalakshmi, 2018).

d. Steroid

Tambahkan 3 tetes HCl pekat kemudian 1 tetes H₂SO₄ pekat ke dalam 2 ml ekstrak daun kangkung. Jika berwarna hijau berarti mengandung steroid (Ergina, 2014).

e. Tannin

Sampel ekstrak daun kangkung pagar sebanyak 1 ml, 2 ml 5% FeCl₃. Terbentuk warna biru tua menunjukkan adanya tannin (Roghini dan Vijayalakshmi, 2018).

f. Terpenoid

2 ml sampel ekstrak daun kangkung pagar, ditambahkan 3 tetes HCl pekat kemudian 1 tetes H₂SO₄ pekat. Hasil berwarna merah atau ungu menunjukkan adanya terpenoid (Ergina, 2014).

3.4.5 Ekstraksi daun kangkung pagar (*Ipomoea carnea Jacq*)

Pelarut yang digunakan yaitu n-heksana, etil asetat, dan metanol digunakan untuk mengekstrak 1 kg sampel daun kangkung. Pertama, masukkan simplisia ke dalam botol berwarna coklat, lalu tambahkan pelarut n-heksana sampai simplisia terendam, diamkan selama 24 jam. Setelah itu, filtratnya dikumpulkan dan residunya dikeringkan. Kemudian gunakan pelarut dan metode yang sama untuk mengekstraksi residu lagi. Residu kemudian diekstraksi menggunakan etil asetat dan metanol dengan proses yang sama seperti pada langkah pertama, hanya saja pelarut yang digunakan pada kedua percobaan tersebut berbeda. Lalu diuapkan dengan vacum evaporator sampai diperoleh hasil ekstrak kental (Indriani et al., 2019).

3.4.6 Sterilisasi Alat

Alat yang digunakan harus dibersihkan dan dikeringkan. Alat tersebut adalah tabung reaksi, labu erlenmeyer, gelas ukur, vial, dan pipet berlapis kapas yang dibungkus kain kasa, kemudian dibungkus dengan kertas perkamen, kemudian diautoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Kemudian disterilkan pinset dan jarum di atas api dengan lampu pijar selama beberapa detik. Laminar Air Flow (LAF) menghilangkan debu, diamkan selama 15 menit, nyalakan lampu ultraviolet selama 5 menit, Semua pekerjaan dilakukan dengan teknik aseptik (Dwidjoseputro, 1987)

3.4.7 Pembuatan Tryptic Soy Agar (TSA)

Larutkan 5 gram trypsin soy agar dan 250 ml aquadest didalam labu erlenmeyer, kemudian dipanaskan di atas hot plate sambil diaduk sekali dengan batang pengaduk sampai terbentuk larutan bening. Larutan tryptic soy agar kemudian disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Selanjutnya, tuangkan larutan tryptic soy agar ke dalam beberapa tabung reaksi, dan letakkan tabung reaksi yang berisi tryptic soy agar pada sudut 30-45 ° hingga dingin dan mengeras (Lay, 1994).

3.4.8 Uji Kromatografi Lapis Tips (KLT)

Ukuran masing-masing papan adalah 1x10 cm². Ekstrak daun kangkung pagar (*Ipomoea carnea* Jacq) ditotol dengan pipa kapiler ± 1 cm dari tepi bawah cawan, kemudian keringkan dan dielusi dengan masing-masing fase gerak. Mengamati noda yang terbentuk dengan menggunakan lampu UV nm 254. Selain itu, Kromatografi Lapis Tips dapat digunakan untuk menentukan pola pewarnaan. Jika pola warna yang muncul pada lampu UV sama, maka digabungkan untuk menyederhanakan derajat pemisahan yang diperoleh (Harbone, 1996).

3.4.9 Pembuatan Larutan Mc Farland

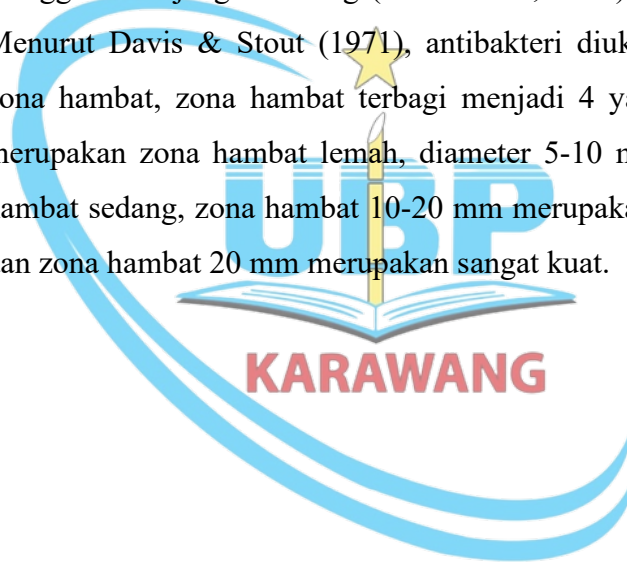
Dalam labu Erlenmeyer, campurkan 99,5 ml larutan H₂SO₄ 0,36 N dan 0,5 ml larutan BaCl₂.2H₂O 1,75%. Lalu kocok hingga terbentuk larutan keruh. Kekeruhan ini sebagai standar untuk menguji kekeruhan suspensi bakteri (Muljono et al., 2016).

3.4.10 Pembuatan Suspensi Bakteri

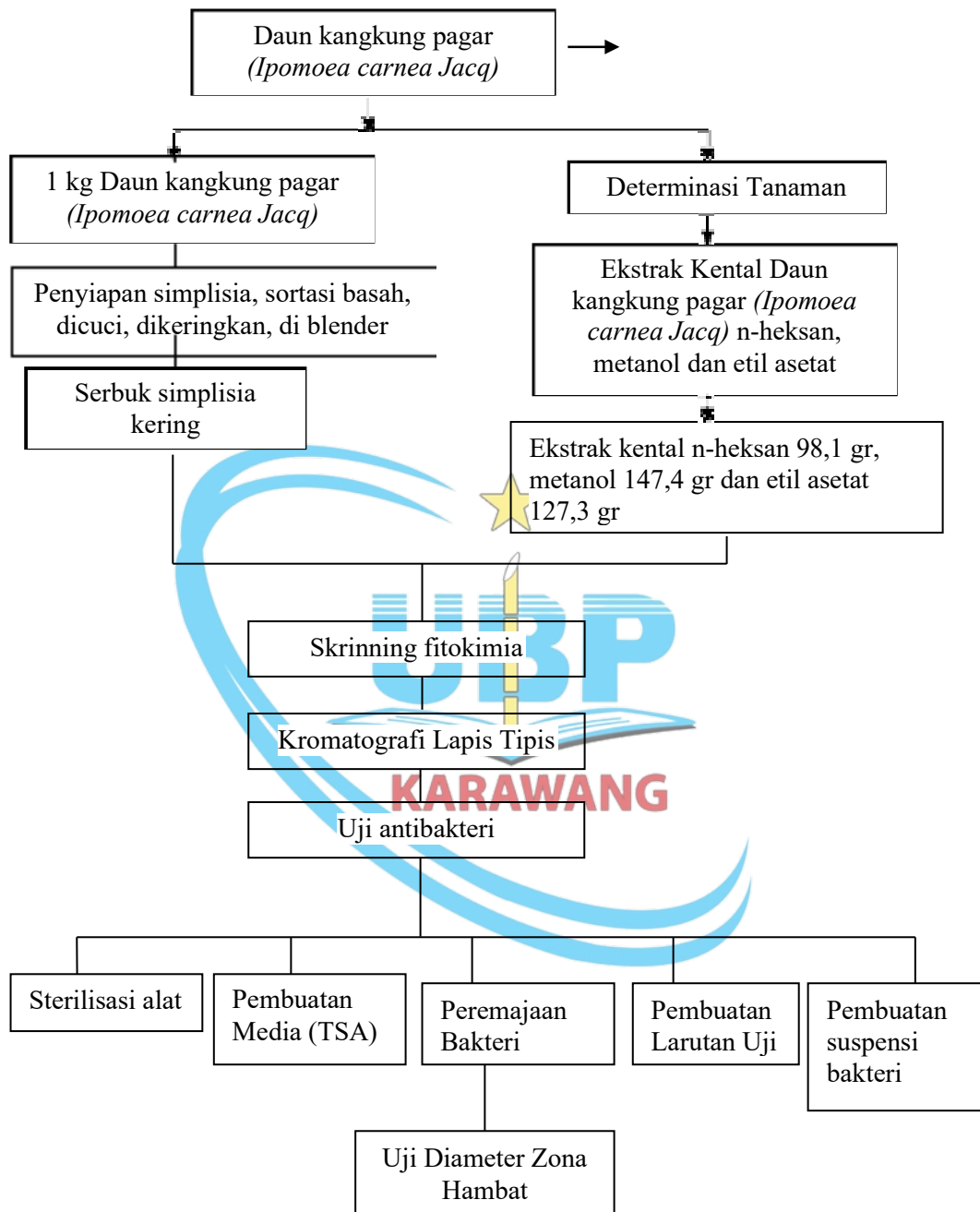
Bakteri setelah 24 jam, gunakan 2 ose koloni untuk mengetahui bakteri dan kemudian suspensikan bakteri yang akan diuji dalam 10 ml natrium klorida 0,9% steril didalam tabung reaksi steril dan vortex. Kekeruhan tersebut dibandingkan dengan menggunakan Mc. Farland (Muljono et al., 2016)

3.4.11 Uji Aktivitas Antibakteri

Masukkan 15 ml Tryptic Soy Agar (TSA) ke dalam cawan Petri steril kemudian tambahkan 3 tetes suspensi bakteri. Selanjutnya dengan pengadukan dan homogenisasi, suspensi bakteri yang akan diuji terdistribusi secara merata dan memadat. 10 l DMSO digunakan sebagai kontrol negatif dan 30 g / ml ciprofloxacin sebagai kontrol positif. Proses ini dilakukan berulang sebanyak 3 kali. Kemudian, inkubasi cawan petri dalam inkubator pada suhu 24-27°C selama 24 jam. Aktivitas antibakteri ditentukan untuk mengukur diameter zona hambat menggunakan jangka sorong (Rusdi et al., 2010). Menurut penelitian Menurut Davis & Stout (1971), antibakteri diukur dengan diameter zona hambat, zona hambat terbagi menjadi 4 yaitu diameter 5 mm merupakan zona hambat lemah, diameter 5-10 mm merupakan zona hambat sedang, zona hambat 10-20 mm merupakan zona hambat kuat dan zona hambat 20 mm merupakan sangat kuat.



3.5 Diagram Alir



Gambar 3.1 Prosedur Penelitian