

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini yaitu penelitian Eksperimental dengan metode pendekatan kualitatif, penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Bahan Alam Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Buana Perjuangan Karawang untuk mengetahui senyawa metabolit sekunder yang terkandung pada ekstrak daun kangkung pagar dan melakukan uji bioaktivitas antifungi pada ekstrak daun kangkung pagar terhadap jamur *candida albicans*.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah maserator, timbangan digital (SKA digital), tabung reaksi (iwaki), spatula, corong (iwaki), pipet tetes (pyrex), pipet volume (pyrex), labu ukur (pyrex), batang pengaduk, beaker glass (pyrex), Erlenmeyer (pyrex), pipa kapiler (gmbh+cokg), chamber, botol coklat, vial 15 ml, maserator, oven, cawan petri, Rotary Evaporator (ika rv), water bath (memmert), plat KLT, Lampu UV, lemari pendingin, LAF (mascotte) jangka sorong (tricle), incubator (memmert), jarum ose, mikropipet, Bunsen, masker (sensi), sarung tangan (safe gloves), autoclave (agm medica).

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Ekstrak Daun Kangkung Pagar (*Ipomoea Carnea Jacq*) (balitro bogor), etil asetat, methanol, n-heksana, (*bratacho*), Jamur *Candida Albicans* (laboratorium UI), Potato Dextrose Agar (*oxoid*), dragendrof, bubuk magnesium, FeCl_3 , HCl 2N, H_2S_4 pekat, aquadest, HCL pekat, KOH

3.3 Variabel Penelitian

3.3.1 Variabel independent

Variabel independent atau variabel bebas pada penelitian ini yaitu, ekstrak daun kangkung pagar.

3.3.2 Variabel dependent

Variabel dependent atau variabel terikat pada penelitian ini yaitu skrining fitokimia, organoleptic dan rendemen Rf, zona hambat.

3.4 Prosedur penelitian

3.4.1 Persiapan Sampel

Tanaman Kangkung Pagar segar yang telah dirajang dan dikeringkan. Tanaman yang telah dikeringkan, kemudian dihaluskan menggunakan blender. Sampel yang telah dihaluskan kemudian disimpan dalam wadah tertutup rapat.

3.4.2 Pembuatan Reagen Untuk Uji Fitokimia

Reagen yang digunakan pada Uji Fitokimia adalah :

1. Pereaksi Mayer

Sebanyak 1,36 gram raksa (II) klorida dilarutkan dengan 60 mL aquadest di dalam *beaker glass*. Kemudian di dalam *beaker glass* terpisah, 1 gram kalium iodida dilarutkan dengan 10 mL aquadest, kedua larutan tersebut dicampurkan dan disaring. Campuran ini diencerkan hingga 100 mL di dalam labu ukur dengan aquadest.

2. Pereaksi Lieberman-Burchard

Sebanyak 5 mL anhidrida asetat dan 5 mL asam sulfat pekat dicampurkan secara perlahan di dalam *beaker glass*, lalu diencerkan hingga 100 mL dengan pelarut etanol.

3. Larutan Besi (III) Klorida 5%

Sebanyak 5 gram kristal besi (III) klorida dimasukkan kedalam *beaker glass*.

Kemudian dilarutkan dengan aquadest hingga 100 mL.

4. Larutan Asam Sulfat 2 N

Sebanyak 13,9 mL asam sulfat pekat dimasukkan kedalam *beaker glass* yang telah berisi 100 mL aquadest secara perlahan melalui dinding gelas, kemudian diencerkan hingga volume 250 mL.

5. Larutan Natrium Hidroksida 1%

Sebanyak 1 gram Natrium Hidroksida dilarutkan dengan aquadest sampai volume 100 mL dalam *beaker glass*.

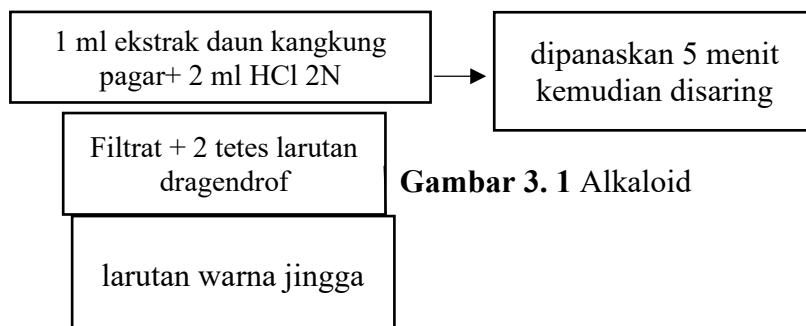
3.4.3 Ekstraksi sampel

Pada tahap ini sampel diekstraksi dengan metode maserasi yaitu dengan cara simplisia Daun kangkung pagar direndam pada maserator sampel daun kangkung pagar terlebih dahulu ditimbang, kemudian sampel direndam menggunakan pelarut etil asetat, n-heksan, methanol yang di tempatkan pada maserat sampai serbuk terendam diaduk. Setelah itu sampel didiamkan selama 4 x 24 jam dengan sesekali diaduk. Selanjutnya sampel di saring, Hingga didapatkan ekstrak cair. Selanjutnya semua Ekstrak cair yang didapat dikumpulkan menjadi satu untuk dievaporasi sampai agak kental. Setelah agak kental, diuapkan di atas waterbath suhu 50°C untuk mendapatkan ekstrak yang lebih kental. Kemudian dihitung rendemen ekstrak yang diperoleh. (Rumayar, 2020)

$$\% \text{ Rendemen Ekstrak} = \frac{\text{berat ekstrak yang didapat (g)}}{\text{berat simplisia yang diekstrak (g)}} \times 100\%$$

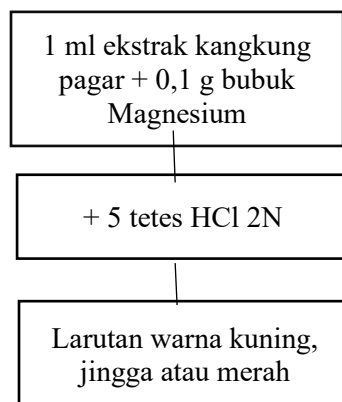
3.4.4 Skrining Fitokimia

1. Alkaloid



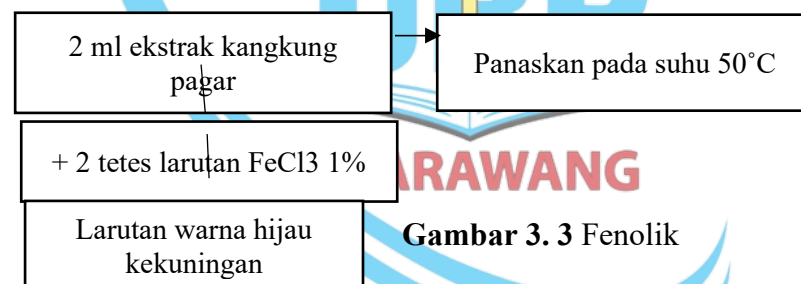
Gambar 3. 1 Alkaloid

2. Flavonoid



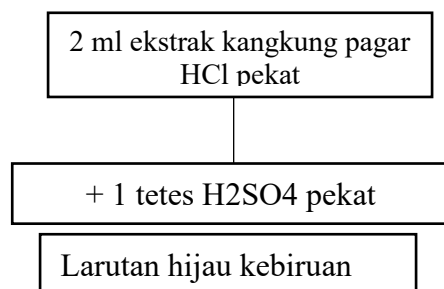
Gambar 3.2 Flavonoid

3. Fenolik



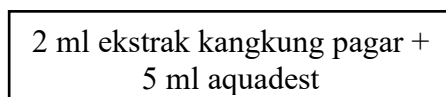
Gambar 3.3 Fenolik

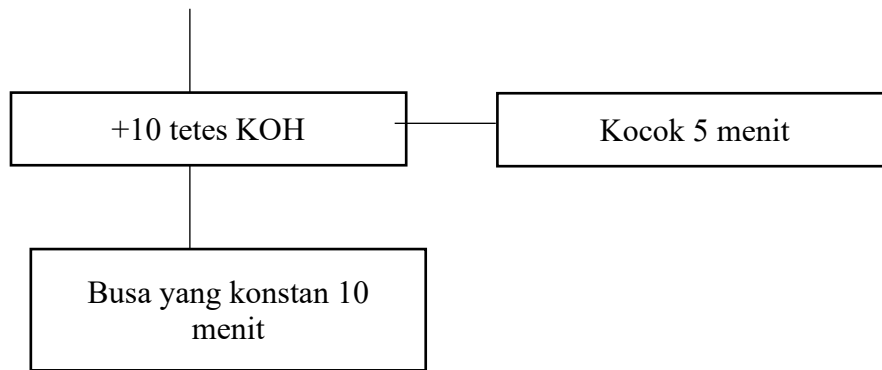
4. Steroid



Gambar 3.4 Steroid

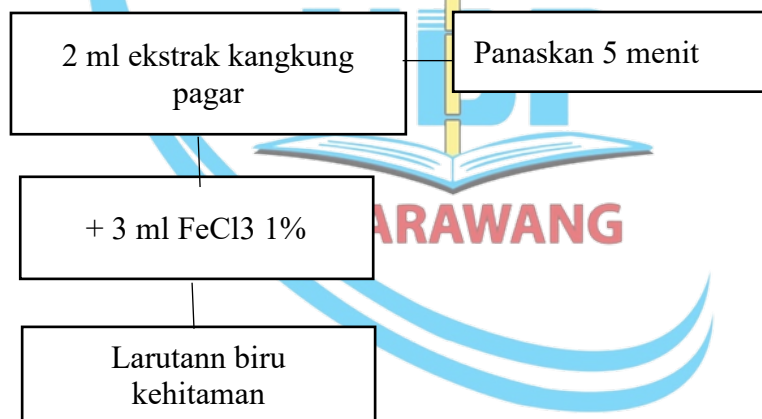
5. Saponin





Gambar 3. 5 Saponin

6. Tanin



Gambar 3. 6 Tanin

3.4.5 Penetapan Kadar Air

Penetapan Kadar Air. Ditimbang seksama 1 g ekstrak dalam krus porselen bertutup yang sebelumnya telah dipanaskan pada suhu 105°C selama 30 menit dan telah ditara. Ratakan dengan menggoyangkan hingga merupakan lapisan setebal (5 mm – 10 mm) dan dikeringkan pada suhu penetapan hingga bobot tetap, buka tutupnya, biarkan krus dalam keadaan tertutup dan mendingin dalam desikator hingga suhu kamar, kemudian dicatat bobot tetap yang diperoleh untuk menghitung persentase susut pengeringannya. (Depkes RI, 1980).

3.4.6 Penentuan Bobot Jenis

Bobot jenis menggunakan piknometer bersih, kering dan telah dikalibrasi dengan menetapkan bobot piknometer dan bobot air yang baru di didihkan pada suhu 25°C, buang kelebihan ekstrak cair dan timbang. Bobot jenis ekstrak cair adalah hasil yang diperoleh dengan membagi bobot ekstrak dengan bobot air, dalam piknometer pada suhu 25°C (Depkes RI, 2000)

3.5 Kromatografi lapis tipis KLT

Uji senyawa metabolit sekunder daun kangkung pagar (*Ipomea Carnea Jacq*) menggunakan pelarut n-heksana, etil asetat dan metanol dengan metode maserasi. Ekstrak dipekatkan menggunakan evaporator pada suhu 35°C. Uji kromatografi lapis tipis (KLT) terhadap ekstrak pekat menggunakan pelarut pengembang (fase gerak) adalah N-Heksan : Etil Asetat (6:4) dan untuk fase diam yang digunakan adalah silika GF₂₅₄, kemudian ditotolkan pada plat KLT dengan menggunakan pipa kapiler. Setelah kering dimasukkan kedalam bejana (*chamber*), bila fase gerak telah mencapai batas, plat diangkat, noda yang terbentuk diamati dengan lampu UV 254nm dan 366nm kemudian dilakukan penyemprotan dengan penampak bercak spesifik, penyemprotan dilakukan untuk mempermudah identifikasi bercak KLT. Untuk mengidentifikasi senyawa alkaloid digunakan pereaksi *Dragendrof*, untuk mengidentifikasi senyawa flavonoid digunakan pereaksi sitoborat, untuk mengidentifikasi senyawa tanin/fenolik digunakan pereaksi FeCl₃ 5% dan untuk mengidentifikasi senyawa terpenoid dan steroid digunakan pereaksi *Lieberman burchard* kemudian hitung R_f nya (Asih I. A., 2009).

3.6 Persiapan Uji Aktivitas Antijamur

3.6.1 Pembuatan Media jamur

Potato Dextrose Agar (PDA) ditimbang dalam 20 ml aquadest pada Erlenmeyer lalu panaskan di atas hot plate sampai larutan berwarna jernih, lalu di sterilisasi di dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah itu, dimasukan kedalam cawan petri dan dinginkan pada suhu ruangan / masukan kedalam Laminar Air Flow (Dolih, G. 2009).

3.6.2 Media Peremajaan Jamur

Sebanyak 1-2 ose Koloni jamur diambil dari biakan murni yang tersedia, dilakukan secara aseptis dengan jarum ose dan digoreskan pada media agar miring kemudian diinkubasikan dalam inkubator. (Rostinawati, 2009).

3.6.3 Pembuatan Larutan Kontrol

Larutan kontrol positif (+) yang digunakan yaitu ketokonazol dan Larutan kontrol (-) digunakan larutan CMC 1% (Dewi, 2010)

3.6.4 Uji Aktivitas Antijamur

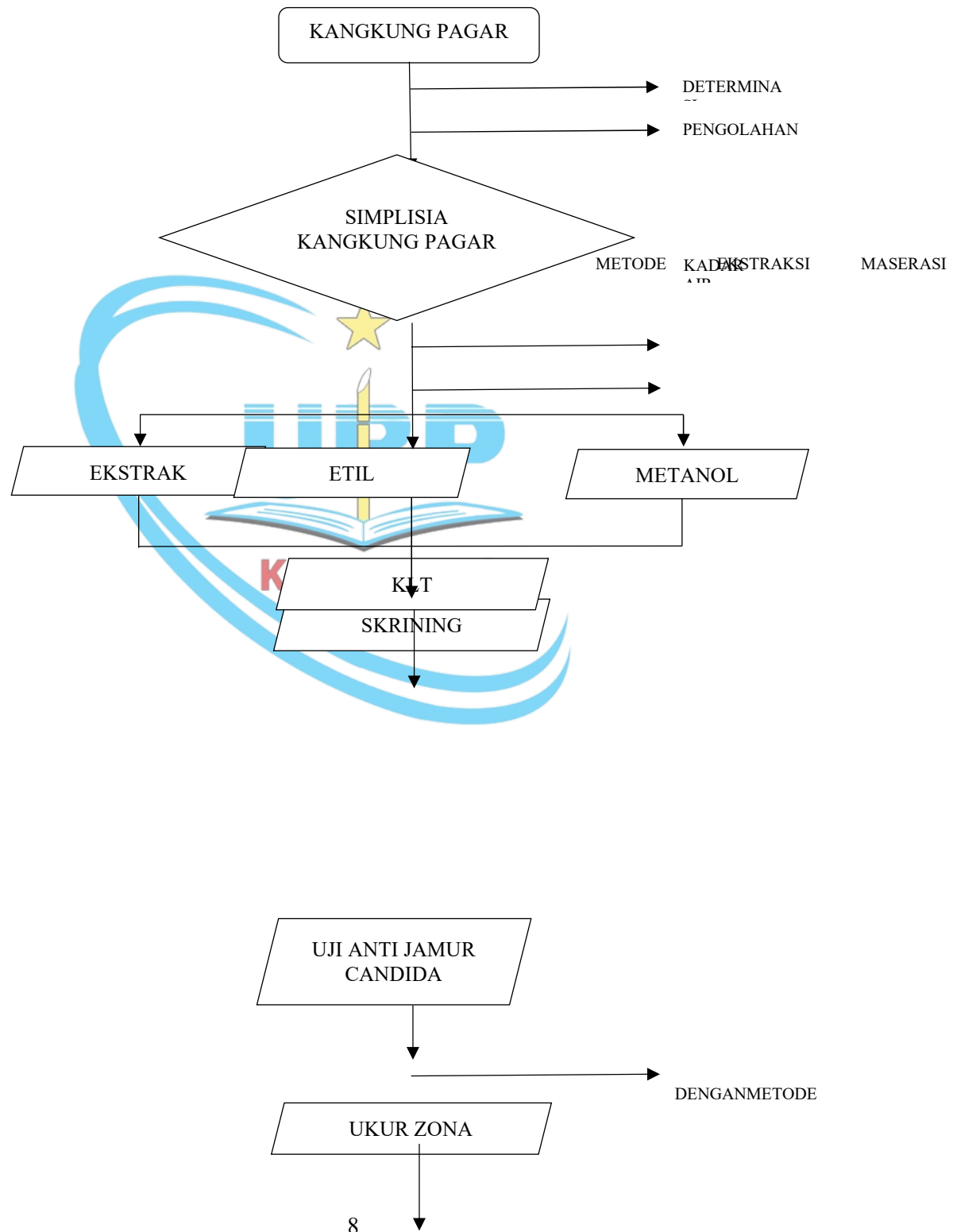
Sebanyak 1 ml suspensi jamur *Candida albicans* diambil menggunakan micropipet kemudian dituang kedalam cawan petri steril selanjutnya sebanyak $\pm$ 10-20 ml media PDA steril dituang kedalam cawan petri steril yang sudah berisi suspensi jamur *Candida albicans*. Setelah media PDA pada cawan petri memadat kemudian dibuat lubang sumuran pada media agar tepat di tengah-tengah cawan petri. Selanjutnya setiap lubang sumuran pada masing-masing cawan petri diberikan ekstrak daun kangkung pagar. Selanjutnya cawan petri dibungkus dan diberi label, dan diinkubasi dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 24-72 jam.

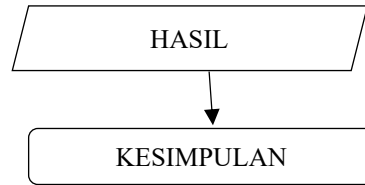
1.7 Analisis Data

Analisis data aktivitas antijamur dilakukan dengan mengukur pada daerah zona hambat menggunakan jangka sorong pada masing-masing konsentrasi, kemudian analisis statistik menggunakan Analysis of Variance (ANOVA) untuk melihat

perbedaan rata-rata dari kelompok penelitian.

1.8 Diagram alir





Gambar 3. 7 Diagram Alir



