

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### 3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium untuk mengetahui kandungan senyawa metabolit sekunder yang terkandung pada ekstrak n-heksan, etil asetat, metanol dan melakukan pengujian aktivitas antibakteri ekstrak n-heksan, etil asetat, metanol daun kangkung pagar terhadap *Bacillus subtilis*.

#### 3.2 Alat dan Bahan

##### 3.2.1 Alat

Pada penelitian ini, alat-alat yang digunakan adalah timbangan analitik, alat maserasi, tabung reaksi, spatula, corong, pipet tetes, cawan porselen, pipet volume, batang pengaduk, oven, beaker glass, erlenmeyer, kaca arloji, cawan petri, inkubator, *rotary evaporator*, penjepit, mortir, stamper, kompor listrik, bunsen, *waterbath*, lemari pendingin, alat sumuran, jangka sorong, jarum ose, mikropipet, bunsen, laminar air flow (LAF) dan autoclaf.

##### 3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah daun kangkung pagar, aquadest, tryptone soya agar (TSA),  $\text{FeCl}_3$ , HCL, pereaksi mayer, pereaksi dragendrof, amil alkohol, magnesium, etil asetat, n-heksan, metanol, aquadest, kapas, ciprofloxacin 500 mg, DMSO 5%, biakan bakteri *Bacillus subtilis*, aluminium foil, kertas saring.

#### 3.3 Variabel Penelitian

##### 3.3.1 Variabel Independen

Variabel independen atau variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak daun kangkung pagar.

##### 3.3.2 Variabel Dependen

Variabel dependen atau variabel terikat dalam penelitian ini adalah organoleptik, skrining fitokimia, rendemen, rf, dan zona hambat.

### 3.3.3 Definisi Operasional Variabel

Definisi Operasional Variabel dalam penelitian ini dapat dilihat pada tabel berikut :

**Tabel 3. 1** Definisi Operasional Variabel

No	Variabel	Definisi	Hasil ukur	Skala
1	Organoleptik Warna	Pengujian secara visual menentukan ekstrak kangkung pagar.	1. Bening 2. Agak kecoklatan 3. Cokelat 4. Gelap	Ordinal
2	Organoleptik Aroma	Pengujian secara indra penciuman untuk menentukan aroma ekstrak daun kangkung pagar.	1. Khas 2. Tidak khas	Ordinal
3	Organoleptik Bentuk	Pengujian secara objektif pada ekstrak daun kangkung pagar.	1. Cair 2. Sedikit kental 3. Kental	Ordinal
4	Skrining Fitokimia	Memberikan gambaran mengenai kandungan senyawa metabolit sekunder dalam bahan alam yang akan diteliti.	1. Perubahan warna 2. Endapan 3. Berbusa	Ordinal
5	Rendemen	Perbandingan dari ekstrak yang diperoleh dengan simplisia awal.	%	Rasio
6	Rf	Jarak yang akan ditempuh senyawa dibagi dengan jarak yang akan ditempuh	Cm	Rasio

		pelarut		
7	Aktivitas antibakteri	Pengujian dihitung zona beningdengan menggunakan jangka sorong.	mm	Rasio

### 3.4 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Bahan Alam dan Mikrobiologi Farmasi Universitas Buana Perjuangan Karawang, yang dilaksanakan pada bulan maret s/d juli 2021.

### 3.5 Prosedur Penelitian

#### 3.5.1 Persiapan Sampel

Tumbuhan Kangkung Pagar dilakukan determinasi terlebih dahulu untuk memastikan kebenaran dari tanaman yang akan dipakai. Determinasi dilakukan di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI). Daun kangkung pagar dikeringkan untuk mengurangi kadar air yang terkandung didalamnya. Setelah dikeringkan, kemudian dihaluskan menggunakan blender. Sampel yang telah dihaluskan disimpan dalam wadah tertutup rapat.

#### 3.5.2 Ekstraksi Sampel

Pembuatan Ekstrak Daun Kangkung Pagar dilakukan dengan metode maserasi bertingkat, yaitu 1 kg sampel kemudian dilakukan ekstraksi menggunakan pelarut methanol, etil asetat dan n-heksan. Masukkan simplisia kedalam botol coklat kemudian tambahkan pelarut n-heksan dan diamkan selama 24 jam. Kemudian dilakukan remaserasi selama empat hari. Setelah itu, disaring kedalam wadah baru sehingga diperoleh filtrat dan residu. Selanjutnya, residu kembali diekstraksi dengan pelarut metanol dan etil asetat dengan cara yang sama. Hasil penyarian dari ekstrak diuapkan dengan vacum evaporator sehingga diperoleh ekstrak kental.

### 3.5.3 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan untuk melihat kandungan senyawa metabolit sekunder dengan menunjukkan ada tidaknya senyawa yang terkandung dalam suatu tanaman (Harbone, 1996). Uji skrining fitokimia antara lain :

a. Alkaloid

Masing-masing 1 gram ekstrak ( n-heksan, etil asetat, methanol) ditambah 1 mL HCL 2N dan panaskan dalam 2 menit sambil diaduk. Campuran ekstrak daun kangkung pagar dan HCL setelah disaring setelah dingin. Filtrat hasil penyaringan digunakan untuk uji senyawa alkaloid, masukan masing-masing 0,5 mL kedalam 3 tabung reaksi. Pada tabung ke- 1, tambahkan pereaksi mayer sebanyak 2 mL, kemudian terdapat endapan putih atau kuning. Pada tabung ke-2, tambahkan pereaksi dragendorf sebanyak 2 mL terbentuk endapan coklat atau jingga kecoklatan. Pada tabung ke-3, sebagai blanko.

b. Flavonoid

Masing-masing 1 gram ekstrak daun kangkung pagar (n-heksan, etil asetat, methanol) tambahkan 50 mL air panas, panaskan dalam 5 menit lalu disaring. Ambil 5 mL filtrat kemudian ditambahkan dengan 0,1 gram magnesium dan 5 mL HCL 2N. Lalu tambahkan amil alkohol 2 mL, kocok kuat dan biarkan memisah. Terbentuk warna kuning hingga merah (atau suatu warna ekstrak tertentu) yang ditarik dengan amil alkohol menandakan hasil positif flavonoid.

c. Saponin

Masing-masing 50 mg ekstrak daun kangkung pagar (n-heksan, etil asetat, methanol) panaskan dengan 50 mL air dalam 15 menit, kemudian biarkan sampai dingin dan saring. Masukan kedalam tabung reaksi dan dikocok selama 30 detik, amati buih selama 10 detik ditambah 1 tetes HCL 2N. Terbentuknya busa yang persisten kurang lebih selama 10 menit menandakan hasil positif saponin.

d. Tanin dan Polifenol

Masing-masing 50 mg ekstrak daun kangkung pagar (n-heksan, etil asetat, methanol) ditambahkan 20 mL air kemudian panaskan dalam 15

menit, dinginkan dan disaring. Kemudian masukan kedalam tabung reaksi tambahkan  $\text{FeCl}_3$  1%. Terbentuknya warna biru tua positif tanin dan terbentuk warna hitam kehijauan positif polifenol.

e. Steroid dan Triterpenoid

Masing-masing 1 gram ekstrak daun kangkung pagar (n-heksan, etil asetat, methanol) ditambahkan 5 mL eter, kemudian digerus lalu disaring. Filtrat B masukan kedalam cawan penguap dan dibiarkan menguap sampai kering. Dalam residu teteskan 2-3 tetes reagen *Liebermann Buchard*. Terbentuk warna ungu menandakan hasil positif triterpenoid, sedangkan terbentuknya warna biru atau hijau menandakan hasil positif steroid.

### 3.5.4 Pembuatan Media Tryptone Soya Agar (TSA)

Tryptone Soya Agar (TSA) ditimbang sebanyak 12 gram, kemudian masukan kedalam gelas kimia dan dilarutkan dengan 300 mL aquadest. Panaskan larutan media sampai berwarna kuning jernih, kemudian disterilisasi dalam autoklaf pada suhu  $121^\circ\text{C}$  dalam 15 menit. Selanjutnya, larutan media masukan kedalam cawan petri sebanyak 25 ml dan dinginkan pada suhu ruangan atau masukan kedalam Laminar Air Flow (LAF) (Muljono et al,2016).

### 3.5.5 Pembuatan Suspensi Bakteri KARAWANG

Bakteri yang digunakan ialah bakteri *Bacillus subtilis* yang telah diinokulasi kemudian diambil menggunakan kawat ose steril masukan kedalam tabung yang telah berisi larutan NaCl 0,9% sebanyak 2 ml sampai memperoleh kekeruhan yang sesuai dengan kekeruhan larutan Mc. Farland (Muljono et al, 2016).

### 3.5.6 Uji Aktivitas Antibakteri

Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan menggunakan metode difusi sumuran. Disiapkan media tryptone soya agar (TSA) steril sebanyak 25 ml, dituang kedalam cawan petri steril secara aseptik lalu biarkan hingga memadat. Selanjutnya suspensi bakteri digoreskan ke permukaan media agar. Kemudian, media agar dibuat lubang sumuran dan dimasukan ekstrak dengan konsentrasi 40%, 60%, 80% dan 100%. Kontrol positif yang digunakan adalah ciprofloxacin dan DMSO 5% sebagai kontrol negatif. Kemudian diinkubasi pada suhu  $37^\circ\text{C}$  selama 24 jam,ukur diameter zona hambat menggunakan jangka sorong. Proses ini dilakukan berulang sebanyak 3

kali.

### 3.5.7 Analisis Data

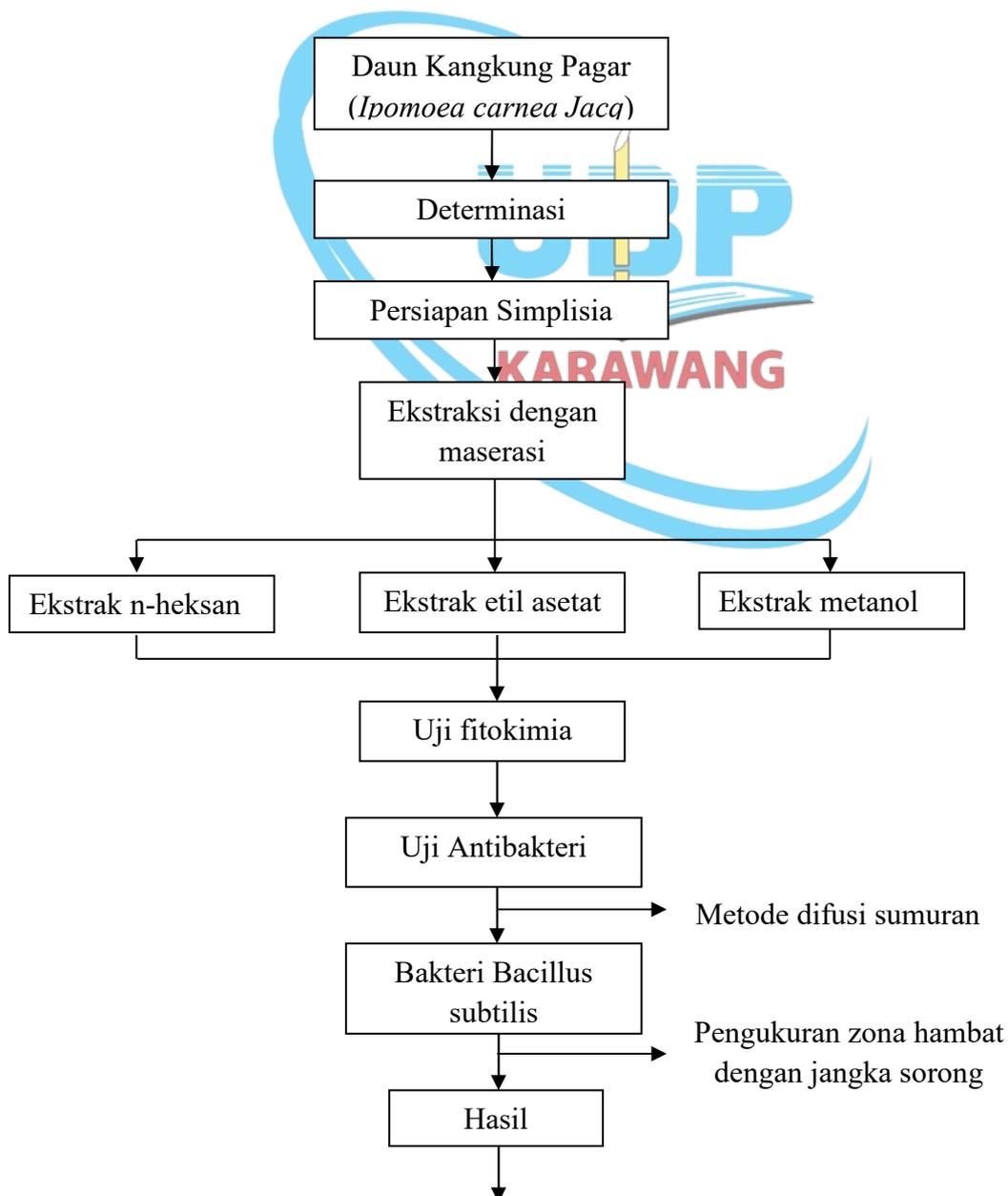
Analisis data aktivitas antibakteri dilakukan dengan analisis statistik menggunakan *Analysis of Variance* (ANOVA) dilanjut uji *Post Hoc Tukey* untuk mengetahui perbedaan rata-rata dari dua atau lebih kelompok perlakuan.

### 3.5.8 Penafsiran dan Penyimpulan Data

H0 : tidak dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Bacillus subtilis*

H1 : dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Bacillus subtilis*

### 3.6 Diagram Alir Penelitian



Analisis data

**Gambar 3. 1** Prosedur Penelitian

