BAB III

METODELOGI PENELITIAN

3.1.Jenis Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian menggunakan praeksperimental dengan pendekatan *one shot case study* dengan pendekatan rancangan acak lengkap (RAL) dimana perlakuan karakterisasi metabolit sekunder dan uji antibakteri, dilakukan secara skrining fitokimia, kromatografi lapis tipis dan kromatografi kolom dan uji antibakteri menggunakan metode difusi cakram.

3.2.Sampel

Sampel pengujian diambil dari tanaman Kangkung Pagar (*Ipomoea carnea* Jacq.) yaitu pada bagian daun muda, dipanen pada pagi hari, sampel didapat didaerah bogor kemudian di jadikan ekstrak, Ekstrak daun kangkung pagar (*Ipomoea carnea* Jacq.) didapatkan dari Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat (BALITTRO)

3.3.Bahan dan Alat

3.3.1. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak daun kangkung pagar (*Ipomoea carnea* Jacq.), pelarut n-heksana (C_6H_{14}), etil asetat ($C_4H_8O_2$), etanol (C_2H_3OH), *Salmonella typhi*, Media Nutrien Agar (NA) Oxoid, Aquadest, NaCl 0,9%, DMSO (Dimetil Sulfoksida), pereaksi Dragendorff, pereaksi mayer, Pereaksi *Lieberman Buchard*, besi (III) klorida (FeCl3) 1%, besi (III) klorida ($FeCl_3$) 5%, HCl 2N, Natrium Hidroksida (NaOH) 10%, Ammonia (NH_4), Magnesium (Mg), Sitroborat, Gelatin,

Kloroform, ($CHCl_3$), Amil alcohol (1-Pentanol) ($C_5H_{12}O$), Dietil eter $(C_2H_5)_2O$), Ciprofloxacin 500mg.

3.3.2. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah seperangkat alat Maserator, *vacum rotary evaporator (Eyela OSB-2100)*, rangkaian destilasi, timbangan bahan, neraca analitik (Ae Adam), Penjepit, *Oven* (Gemmyco YCO-NO1), kolom kromatografi, Plat KLT (TLC Silica Gel 60 F254 Merck 1.05554.0001) plat tetes, *Mikropipet, Microwave,* Lampu UV 254-366 nm sebagai penampak noda, *Autoclave,* Kawat Ose, *Incubator,* Rak tabung, Tabung reaksi, Pembakar bunsen, *laminar airflow* (LAF AV – 100), Spektrofotometer UV-Vis (*Thermo Scientifiv* 33-PPPTS2017-L205-0006), Standar Mc. Farland No. 5, kapas lidi steril, pinset, gelas beaker, *water bath*, *Paper disk*, cawan penguap, spatula, batang pengaduk, gelas ukur, kompor listrik, *chamber*, Erlenmeyer, botol vial 15ml dan botol coklat.

3.4. Variabel Penelitian

3.4.1. Variabel Bebas

Variabel bebas yang terlibat pada penelitian ini yaitu karakterisasi metabolit sekunder dan uji aktifitas antibakteri dari ekstrak kangkung pagar (*Ipomoea carnea* Jacq.) terhadap bakteri *Salmonella typhi.*

3.4.2. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah Skrining Fitokimia, Kromatografi Lapis Tipis, Kromatografi Kolom, Uji Antimikroba, Uji Kemurnian.

3.5. Definisi operasional variable

Berikut ini adalah tabel definisi operasional variabel :

Tabel 3.5.1. Definisi Operasional Variable

No.	Variabel	Definisi	Alat Ukur	Skala	Hasil ukur
	Variabel Bebas				
	Karakterisasi metabolit sekunder daun kangkung pagar (*Ipomoea carnea* Jacq.)	Karakterisasi metabolit sekunder ekstrak daun kangkung pagar *(Ipomoea carnea* Jacq.*)* dengan 3 macam pelarut polar (etanol), semi polar (etil asetat) dan non polar (n-heksana), diambil sampel untuk diuji aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Salmonella typhi*	Skrining Fitokimia, Uji Organoleptik (Warna, bau), *Retardation factor* (rf) dan Uji Aktivitas Antibakteri	-	-
	Variabeal Terikat				
	Skrining Fitokimia Ekstrak	Mengidentifikasi untuk mengetahui senyawa metabolit sekunder	Uji Skrining Fitokimia	Nominal	+

		1. Alkaloid 2. saponin, 3. flavonoid, 4. tannin, 5. steroid 6. terpenoid) yang terdapat pada daun kangkung pagar dengan terjadinya perubahan warna atau terbentuk endapan jika ditambahkan pereaksi		
Rf (*retardation factor*)	Pengujian untuk mengetahui jarak yang dutempuh ekstrak yang dihasilkan dengan simplisia awal	Uji kromatografi lapis tipis	Rasio	Terdapat spot noda
Daya hambat antibakteri terhadap *Salmonella typhi*	Pengujian untuk mengukur zona hambat di daerah sekitar kertas cakram	Jangka sorong digital	Rasio	Memiliki zona hambat

Fraksinasi	Untuk memisahkan senyawa metabolit sekunder, dengan cara kromatografi kolom	Kromatografi Kolom	Rasio	Mendapat hasil fraksi
Pemurnian Hasil Fraksi	Untuk mendapatkan senyawa yang murni dan sapat di tentukan hasil dari senyawa target	Spektrofotometri UV-Vis, Melting Point, Spektroskopi IR	Rasio	Mendapat 1 senyawa murni

3.6.Prosedur Penelitian

3.6.1. Persiapan Sampel

Determinasi atau pemeriksaan pada tanaman daun kangkung pagar dilakukan di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), bertujuan untuk mendapatkan informasi jenis tumbuhan yang digunakan dengan jelas.

Setelah melakukan determinasi kemudian pengumpulan sampel daun kangkung pagar (*Ipomoea carnea* Jacq. *)* dengan perajangan dan pengeringan dalam suhu ruangan yaitu 20ºC-25ºC, bertujuan untuk mengurangi kadar air yang terdapat dalam sampel. Sampel yang telah dikeringkan lalu di haluskan menggunakan blender, yang bertujuan untuk memperluas permukaan sehingga mempercepat proses pelarutan senyawa. Kemudian sampel disimpan dalam wadah tertutup baik untuk studi lebih lanjut.

3.6.2. Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia adalah salah satu cara yang digunakan untuk mengidentifikasi kandungan senyawa metabolit sekunder suatu bahan alam, berikut adalah skrining fitokimia :

1. Uji Alkaloid

   Serbuk simplisia dibasahi dengan amonia encer, di gerus dalam mortir, ditambahkan beberapa ml $CHCl_3$ sambil terus digerus. kemudian di saring, filtratnya dikocok dengan HCl 2N. Lapisan asam dipisahkan dan dibagi menjadi tiga bagian dalam tabung reaksi, tabung reaksi I sebagai blanko, tabung reaksi II tambahkan pereaksi Mayer, jika terbentuk endapan putih, positif mengandung alkaloid, tabung reaksi III tambahkan pereaksi Dragendorff. reagen, jika terbentuk endapan jingga, positif mengandung alkaloid (Harborne, J.B. 1987).

2. Uji Saponin

   Filtrat setelah pemanasan dengan air suling, ditempatkan dalam tabung reaksi dan dikocok kuat-kuat selama 10-15 detik. Busa 1 cm yang terbentuk dan bertahan selama 1 menit dan tidak hilang setelah ditambah satu tetes HCl encer menunjukkan positif mengandung saponin (Harborne, J.B. 1987).

3. Uji Flavonoid

   Filtrat yang telah dipanaskan dengan air suling, dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan serbuk Mg dan HCl 0,5 ml,

kemudian dikocok kuat-kuat, terbentuk warna merah/oranye/kuning yang menunjukkan positif flavonoid (Harborne, J.B. 1987).

4. Uji Tanin

   Filtrat yang telah dipanaskan dengan air suling, dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan gelatin 1%, membentuk warna kuning jernih, endapan putih menunjukkan positif mengandung tanin (Harborne, 1987).

5. Uji Steroid dan Terpenoid

   Simplisia di sari dengan eter, kemudian diuapkan dan di teteskan dengan pereaksi *Liberman Buchard*, terbentuk warna ungu menunjukkan positif mengandung triterpenoid, sedangkan warna biru positif mengandung steroid (Harborne, J.B. 1987).

3.6.3. Ektraksi

Proses Ekstraksi daun kangkung pagar (*Ipomoea carnea* Jacq.) menggunakan metode maserasi, dilakukannya esktraksi maserasi yaitu karena berdasarkan zat aktif nya, maserasi dilakukan tidak lebih dari suhu 50^0C. Daun kangkung pagar dirajang, kemudian ditimbang, dan di ekstraksi menggunakan tiga pelarut yaitu pelarut polar (Etanol), Semi Polar (Etil), Non Polar (n-heksan) dengan memakai maserator.

Pelarut yang pertama digunakan adalah n-heksan dengan metode maserasi yaitu dengan cara di rendam dengan pelarut non polar (n-heksan) setiap hari di aduk, dilakukan selama 4-5 hari, hasil maserasi di ambil filtratnya dan di pekatkan dengan memakai *rotary evaporator.*

Pelarut kedua yaitu menggunakan etil dengan menggunakan metode maserasi, perlakuannya yaitu di rendam dengan pelarut semi polar (etil) kemudian di aduk, dilakukan selama 4-5 hari, kemudian hasil maserasi di ambil filtratnya dan di pekatkan dengan memakai *rotary evaporator.*

Pelarut ketiga yaitu menggunakan etanol dengan menggunakan metode maserasi, perlakuannya yaitu di rendam dengan pelarut et kemudian di aduk, dilakukan selama 4-5 hari, hasil maserasi di ambil filtratnya dan di pekatkan dengan memakai *rotary evaporator* (Abriyani *et al*, 2021).

3.6.4. Fraksinasi dengan Kromatografi Kolom

Fraksinasi digunakan untuk menghasilkan atau mengisolisasi zat yang lebih sederhana, untuk mendapatkan senyawa target. Konsentrasi senyawa pada fase digunakan untuk fraksinasi ekstrak adalah Kromatografi Kolom, hasil yang di peroleh dari fraksinasi ekstrak adalah fraksi.

Dalam melakukan fraksinasi dengan kromatografi kolom yaitu dengan cara silika gel terlebih dahulu di aktivasi dalam oven pada suhu 110^0, kemudian ditambahkan sedikit fase geraknya sehingga menjadi bubur. Masukan kapas yang telah di celupkan fase gerak kedalam kolom, untuk menyumbat bagian bawah kolom. Pelarut 100% n-heksan (fase gerak) dimasukkan ke dalam kolom sampai hampir penuh dan keadaan kran kolom tertutup. Setelah itu kecepatan aliran kolom diatur dan bubur dimasukkan sedikit demi sedikit ke dalam kolom sampai semua bubur masuk ke dalam kolom. Setelah bubur masuk, fase diam ini dielusi sampai homogen selama tiga hari. Sementara itu sampel dilarutkan dalam pelarut, kemudian sampel

dimasukkan dengan hati-hati melalui dinding kolom dan aliran fase gerak diatur.Begitu sampel masuk ke dalam fase diam, fase gerak ditambahkan secara berulang sampai terjadinya pemisahan. Fraksi ditampung menggunakan botol vial 20 mL, kemudian keseluruhan fraksi yang dihasilkan dilakukan KLT penggabungan (Alfreds at al, 2018).

Masing masing fraksi ditampung kedalam botol sampel dan dilanjutkan dengan penentuan serapan maksimum spektrofotometer UV-Vis (Silaa *et al*, 2019).

3.6.5. Pengujian Bioaktivitas Antibakteri

1. Pembuatan Larutan Kontrol Positif dan Kontrol Negatif

   Kontrol positif menggunakan Ciprofloxacin dibuat dengan cara mnghaluskan tablet Ciprofloxacin (digerus halus) 500mg, timbang sebanyak 50 mg kemudian dilarutkan dalam 50 mL aquadest steril, kemudian pipet 1 mL dalam 10 mL aquadest steril. Kontrol negatif DMSO 10% dibuat dengan cara pipet 1 mL DMSO masukan ke dalam labu ukur 10ml, kemudian ditambahkan akuades hingga volumenya 10 mL.

2. Pembuatan Nutrien Agar

   Pembuatan Media nutrient agar tujuannya sebagai media kultur isolat bakteri. Sebelum pembuatan media nutrient agar, sterilisasi petry disk menggunakan autoclave selama 15 menit dengan suhu 121ºC. Setelah itu, menimbang 0,56 gr media nutrient agar, kemudian masukan kedalam erlenmeyer tambahkan aquadest sampai 20 mL, diaduk menggunakan magnetic steerer. Setelah bahan teraduk secara sempurna, erlenmeyer

ditutup menggunakan kapas yang di bungkus menggunakan kasa dan disterilkan menggunakan autoclave dengan suhu 121ºC selama 15 menit.

Media yang sudah steril kemudian dituang secara aseptik ke dalam petry disk steril hingga permukaan petry disk tertutup dengan media agar. Selanjutnya, media agar didiamkan hingga mengeras dan ditutup menggunakan Cling Wrap agar tidak terkontaminasi. Media agar digunakan sebagai media tumbuh dan isolasi bakteri.

3. Penanaman Bateri Uji

Mengambil bakteri satu jarum ose dari bakteri *Salmonella typhi* yang akan digunakan kemudian goreskan dengan cara zigzag pada media agar dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C sampai terjadi penanam (Moh *et al*, 2017).

4. Pengujian Antibakteri Metode Difusi Cakram

Pengujian antibakteri ekstrak daun kangkung pagar (*Ipomoea carnea* Jacq.) pada pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi* menggunakan metode difusi cakram. Ekstrak kental ditimbang kemudian dilarutkan dengan DMSO kemudian dilakukan pengenceran, yang terdiri dari 3 serial konsentrasi yaitu 2500ppm, 2000ppm, 1500ppm. Seri Konsentrasi yang sudah dibuat kemudian di aduk agar ekstrak terlarut dengan baik. Untuk kontrol negatif digunakan DMSO 10%. Kontrol positif digunakan antibiotik Ciprofloxacin 500mg (Vivit, 2021)

Metode difusi cakram merupakan metode yang banyak digunakan, cara kerja difusi cakram yaitu sampel yang akan diuji diserap kertas cakram dan ditempelkan pada media agar yang telah dihomogenkan dengan bakteri kemudian diinkubasi selama 24jam dengan temperature 37°C sampai terlihat zona hambat didaerah sekitar cakram (Willia Novita. 2016).

Aktivitas antibakteri terbesar ditunjukkan oleh luas diameter zona bening terbesar yang terbentuk dari konsentrasi tersebut (Moh Mulyadi *et al*, 2017). Kemudian di ukur diameternya sebagai diameter daya hambat (DDH) menggunakan jangka sorong (Rachmatiah *et al*, 2020). Konsentrasi terkecil dari sampel yang mampu menghambat bakteri yang diinokulasikan dengan terbentuknya zona bening merupakan nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dari sampel tersebut (Moh Mulyadi *et al*, 2017).

Setelah selesai di inkubasi, kekeruhan media yang menunjukann kepadatan pertumbuhan bakteri uji di amati dan di beri tanda (+) untuk media yang tampak keruh dan tanda (-) untuk media yang tidak terdapat kekeruhan (Rachmatiah *et al*, 2020).

3.6.6. Analisis Data

Hasil pengamatan serta pengukuran ditabulasikan dalam tabel pengujian aktivitas antibakteri ekstrak daun kangkung pagar *(Ipomoea carnea* Jacq. *)* terhadap bakteri *Salmonella typhi*, kemudian dianalisismenggunakan SPSS dengan Anova *(Analysis of Variant)* dengan

tingkat kepercayaan 95% dan apabila terdapat perbedaan antar perlakuan maka akan dilanjutkan dengan uji Tuckey.

3.7.Diagram Alir

Berikut ini diagram alir cara kerja penelitian Karakterisai Metabolit Sekunder dan Uji Aktifitas Ekstrak Daun Kangkung Pagar (*Ipomoea carnea* Jacq. *)* Terhadap *Salmonella typhi* :

Gambar. 3.1.1 Diagram Alir

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Determinasi Tanaman

Determinasi dilakukan untuk mengetahui jenis dari tumbuhan yang akan diteliti agar tidak terjadi kesalahan pengumpulan bahan yang akan di teliti. Determinasi tanaman kangkung pagar (*Ipomoea carnea* Jacq.) dilakukan di UPT Laboratorium Herbal Materia Medica Batu, Jawa Timur. Diperoleh hasil determinasi Nomor. 074/291/102.20-A/ 2022. Hasil determinasi Daun Kangkung Pagar dapat dilihat pada **Lampiran 14** menunjukan bahwa sampel yang akan digunakan adalah tanaman kangkung pagar pada bagian daun dengan nama latin (*Ipomoea carnea* Jacq.).

4.2 Hasil Ekstraksi

Ekstraksi dilakukan menggunakan metode maserasi, maserasi adalah proses ekstraksi dengan cara perendaman simplisia menggunakan pelarut yang sesuai dengan suhu 27^0C (Sarah *et al*. 2019), ekstraksi menggunakan tiga pelarut dengan cara bertingkat, ekstraksi dimulai dari pelarut non polar (n-heksan), semi polar (Etil Asetat), pelarut polar (Etanol). Adapun data yang diperoleh dapat di lihat pada **Tabel 4.2.1.**

Tabel 4.2.1 Hasil Ekstraksi

No	Pelarut	Berat Ekstrak (gr)	Rendemen (%)
1	n-heksan	30.7	2.05
2	Etil asetat	38.4	2.56
3	Etanol	98.9	6.59

UBP
KARAWANG