

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian**

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental dengan mengevaluasi skrining fitokimia simplisia daun kangkung pagar melalui pengujian alkaloid, flavonoid, saponin, tanin dan triterpenoid dan uji antibakteri dengan metode difusi cakram.

#### **3.2 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian dilakukan di laboratorium Bahan Alam dan Mikrobiologi Fakultas Farmasi Universitas Buana Perjuangan Karawang. Waktu pelaksanaan penelitian dilakukan mulai bulan Maret 2022 sampai bulan Juli 2022.

#### **3.3 Sampel**

Sampel yang digunakan yaitu ekstrak daun kangkung pagar yang didapat disekitar Kota Karawang, Jawa Barat.

#### **3.4 Alat dan Bahan Penelitian**

##### **3.4.1 Alat Penelitian**

Alat yang digunakan dalam penelitian yaitu ada seperangkat alat destilasi pelarut, rotary evaporator ( EYELA OSB-2100-CE ), oven ( Gemmyco YCO-NO 1 ), neraca analitik ( CHQ ), autoklaf, lampu UV 245 dan 366 nm ( , plat KLT ( silika gel ), kolom kromatografi, inkubator ( Gemmyco ), jarum ose, pipet tetes, pipa kapiler, mikropipet, paper disk, lampu bunsen, rak tabung reaksi, spektrofotometri UV-Vis ( Thermo Scientific 33-PPPTS2017-L205-0006 ), laminar airflow ( LAF AV – 100 ), penjepit, pinset, water bath, spatula, batang pengaduk, alat-alat gelas, kertas saring, jangka sorong digital ( Vernier Caliper ) , chamber, botol coklat, kompor listrik dan kertas label, Spektrofotometri FT-IR ( Thermo Scientific nicolelet iS-10 ).

### 3.4.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian yaitu ada ekstrak daun kangkung (*Ipomoea carnea* Jacq.), pelarut n-heksan ( $C_6H_{14}$ ) (PT. Bratachem), pelarut etil asetat ( $C_4H_8O_2$ ) (PT. Bratachem), pelarut etanol ( $C_2H_5OH$ ) (PT. Bratachem), aquadest, serbuk magnesium (Mg), ciprofloxacin, DMSO (Dimetil sulfoksida), bakteri *Pseudomonas aeruginosa*, media nutrien agar (NA), amonia ( $NH_3$ ), kloroform, asam klorida (HCl), preaksi mayer, preaksi dragendorff, pereaksi libermann buchard, amil alkohol ( $C_5H_{12}O$ ), gelatin 1%, eter, besi (III) klorida ( $FeCl_3$ ) 1%, Silika gel 60 marck, dan kapas bebas lemak.

## 3.5 Variabel Penelitian

### 3.5.1 Klasifikasi Variabel

#### 3.5.1.1 Variabel Bebas

Variabel bebas yang terikat pada penelitian ini yaitu karakterisasi metabolit sekunder dan uji aktivitas antibakteri dari ekstrak daun kangkung pagar (*Ipomoea carnea* Jacq.) dan bakteri *Pseudomonas eruginosa*

#### 3.5.1.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah skiring fitokimia, kromatografi lapis tipis, kromatografi kolom, uji kemurnian dan uji antimikroba.

### 3.5.2 Definisi Operasional Variabel

Berikut ini adalah tabel dari definisi operasional variabel yang terdapat pada penelitian ini yaitu :

Tabel 3. 1 Definisi Operasional Variabel

No	Variabel	Definisi	Alat Ukur	Skala	Hasil ukur
<b>Variabel Bebas</b>					
1	Karakterisasi metabolit sekunder ekstrak daun kangkung pagar ( <i>Ipomoea carnea Jacq</i> )	Karakterisasi metabolit sekunder ekstrak daun kangkung pagar dengan varian pelarut polar ( etanol), pelarut semi polar ( etil asetat ) dan non polar ( n-heksan ), diambil sampel untuk diuji aktivitas antibakteri terhadap bakteri <i>pseudomonas Aeruginosa</i> .	Pengujian kimia fisika ( meliputi organolepti (warna, bau), homogenitas, pH, viskositas, kadar zat aktif, dan spesifikasi	-	-
<b>Variabel Terikat</b>					
2	Warna	Parameter visual menggunakan penglihatan ( mata ) untuk mengetahui warna ekstrak daun kangkung pagar.	Uji organoleptik	Nominal	1. Warna putih 2. Warna putih agak kekuningan
3	Bau	Parameter secara visual menggunakan indra penciuman ( hidung ) untuk mengetahui aroma ekstrak daun kangkung.	Uji organoleptik	Nominal	1. Bau lemah 2. Bau tengik

4	Bentuk	Parameter secara uji objektif terhadap ekstrak daun kangkung pagar.	Uji organoleptik	Nominal	1. Cair 2. Agak kental 3. Kental
5	Skrining fitokimia	Pengujian untuk mengetahui kandungan senyawa metabolit dari ekstrak daun kangkung pagar dengan melihat perubahan warna atau pun endapan.	Uji skrining fitokimia	Nominal	1. Positif 2. Negatif
6	Rf Retardation faktor )	( Pengujian untuk mengetahui jarak yang ditempuh ekstrak yang dihasilkan dengan simplisia awal.	Uji kromatografi lapis tipis dengan	Rasio	Persen ( % )
7	Daya hambat antibakteri terhadap Pseudomonas aeruginosa	Pengujian untuk mengukur zona hambat di daerah sekitar kertas cakram	Jangka sorong digital	Rasio	Diameter zona hambat (millimeter)

### 3.6 Preparasi Sampel

Determinasi atau pemeriksaan pada tanaman daun kangkung pagar dilakukan di UPT Laboratorium Herbal Materia Medica Batu, Malang. Bertujuan untuk mendapatkan jenis tumbuhan yang digunakan dengan jelas.

Setelah determinasi dilakukan kemudian pengumpulan sampel daun kangkung pagar dengan mencuci, perajangan dan pengeringan dalam temperature ruangan pada suhu 40°C yang dimaksudkan untuk mengurangi kadar air yang terdapat dalam sampel. Sampel yang telah dikeringkan lalu di haluskan menggunakan blender yang dimaksudkan untuk memperluas permukaan sehingga mempercepat proses pelarutan senyawa. Setelah dihaluskan sampel disimpan dalam wadah tertutup baik untuk studi lebih lanjut.

### 3.7 Prosedur Penelitian

#### 3.7.1 Ekstraksi Senyawa Metabolit Sekunder

Prosedur pembuatan ekstrak daun kangkung pagar (*Ipomoea carnea* Jacq. ) dikerjakan menggunakan metode maserasi karena berdasarkan zat aktifnya. Daun kangkung pagar dirajang, lalu ditimbang, kemudian mengekstraksi menggunakan pelarut n-heksana, etil asetat dan etanol dengan metode maserasi secara berurutan.

Pelarut yang pertama digunakan yaitu n-heksana dengan menggunakan metode maserasi, dengan cara merendam pelarut n-heksana setiap hari diaduk dan dilakukan selama tiga hingga lima hari, kemudian hasil maserasi diambil ekstrak cairnya dan dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* kemudian residunya dikeringkan.

Kemudian residu yang sudah kering dilarutkan kembali menggunakan pelarut yang kedua yaitu etil asetat dengan metode maserasi, caranya merendamkan pelarut etil asetat selama tiga hingga lima hari setiap harinya diaduk, kemudian hasil maserasi diambil ekstrak cairnya dan dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* kemudian residunya dikeringkan.

Kemudian residu yang sudah kering dilarutkan kembali dengan menggunakan pelarut yang ketiga yaitu etanol dengan metode maserasi, caranya merendamkan pelarut etanol selama tiga hingga lima hari setiap harinya diaduk, kemudian hasil maserasi diambil ekstrak cairnya dan

dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* kemudian di uji antibakterinya.

$$\text{Rendemen Ekstrak (\%)} = \frac{\text{Berat ekstrak total}}{\text{Berat simplisia}} \times 100$$

### 3.7.2 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan untuk menentukan dan mengidentifikasi senyawa metabolit sekunder yang berada di simplisia daun kangkung pagar (*Ipomoea carnea jacq*). Adapun skiring fitokimia yang harus dilakukan antara lain alkaloid, flavonoid, saponin, tanin dan triterpenoid. Berikut merupakan tahapan-tahapan skiring fitokimia dari simplisia daun kangkung pagar (*Ipomoea carnea jacq*) :

#### 1. Alkaloid

Simplisia daun kangkung pagar sebanyak 50 mg dibasahkan dengan amonia (  $\text{NH}_3$  ) digerus dengan menggunakan mortidr. Tambahkan larutan kloroform gerus kuat. Lapisan kloroform dipipet sambil disaring menggunakan pipet yang sudah disumbat oleh kapas, lalu masukan ketabung reaksi. Tambahkan HCl 2N kocok kuat sampai terbentuk lapisan, ambil lapisan asam kemudian dibagi menjadi 2 bagian. Bagian pertama tambahkan pereaksi mayer lalu liat perubahan terjadi kekeruhan atau endapan putih kalau ada menunjukkan bahwa adanya golongan alkaloid dalam simplisia itu. Bagian kedua tambahkan pereaksi dragendorff bila terjadi endapan jingga coklat berarti menunjukkan adanya golongan alkaloid.

#### 2. Flavonoid

Simplisia daun kangkung pagar sebanyak 50 mg tambahkan air panas didihkan selama 5 menit lalu saring. Filtrat yang dihasilkan ditambahkan sedikit serbuk magnesium ( Mg ) dan larutan HCl 2N. Kemudian tambahkan amil alkohol, lalu kocok kuat dan biarkan sampai memisah. Terbentuknya warna kuning hingga merah atau suatu warna

ekstrak tertentu yang dapat ditarik oleh amil alkohol menunjukkan bahwa terdapat adanya golongan flavonoid.

### 3. Saponin

Simplisia daun kangkung pagar sebanyak 50 mg dimasukkan kedalam tabung reaksi didihkan dalam air selama 15 menit, kemudian dinginkan dan disaring. Lalu kocok selama 10 detik sampai terbentuknya busa atau buih tandanya ada golongan saponin.

### 4. Tanin

Simplisia daun kangkung pagar sebanyak 50 mg dimasukkan kedalam tabung reaksi didihkan dalam air selama 15 menit, kemudian dinginkan dan disaring. Tambahkan gelatin 1% bila terbentuknya endapan putih menunjukkan adanya golongan tanin.

### 5. Triterpenoid dan Steroid

Simplisia daun kangkung pagar sebanyak 50 mg digerus dengan eter, kemudian dipipet yang disumbat dengan kapas. Lalu tuangkan kedalam cawan penguap, kemudian dibiarkan menguap hingga kering. Tambahkan pereaksi libermann bucharad kedalam residu bila terbentuk warna ungu menunjukkan adanya golongan triterpenoid, sedangkan bila terbentuknya warna biru hujau menunjukkan adanya golongan steroid.

#### **3.7.3 Fraksinasi dengan Kromatografi Kolom**

Untuk kromatografi kolom adalah metode pemisahan preparatif. Prinsip dari kromatografi kolom adalah suatu teknik pemisahan yang didasarkan pada peristiwa adsorpsi, sampel yang biasanya berupa larutan pekat yang diletakan pada ujung atas kolom. Pada kromatografi kolom dipakai fasa diam silika gel, sedangkan fasa geraknya yang di pakai fasa gerak yang memberikan pemisahan terbaik dalam KLT. Silika gel 60 Mesh terlebih dahulu dipanaskan pada oven dalam suhu 110°C, lalu ditambahkan sedikit fasa geraknya sampai menjadi bubur. Pelarut ( fasa gerak yang dipakai ) dimasukkan ke dalam kolom sampai hampir penuh dan keadaan

kran tertutup. Kemudian kecepatan aliran kolom diatur dan bubuk silika dimasukkan memakai pipet secara perlahan pada kolom.

Setelah bubuk silika masuk ke dalam kolom, sampel dimasukkan kedalam dinding kolom secara perlahan, kemudian ditambahkan fasa gerak terus-menerus sampai terjadi pemisahan. Hasil kromatografi ditampung menggunakan vial setiap 20 mL, lalu keseluruhan fraksi yang didapatkan dilakukan KLT penggabungan.

### **3.8 Pengujian Bioaktivitas Antibakteri**

#### **3.8.1 Pembuatan Media Nutrien Agar (NA)**

Timbang media nutrien agar, larutkan dengan aquadest dengan cara dipanaskan dalam suhu 80°C sambil diaduk sampai tidak terdapat gumpalan, kemudian disterilisasi media nutrien agar menggunakan autoklaf selama 15 menit, tekanan 1 atm 121°C. Kemudian masukan larutan media nutrien agar kedalam cawan petri lalu di dinginkan pada temperatur ruangan atau dimasukkan kedalam *Laminar Air Flow (LAF)*.

#### **3.8.2 Pembuatan Suspensi Bakteri**

Bakteri uji yang telah diinokulasi diambil dengan kawat ose steril lalu disuspensikan ke dalam tabung yang berisi 2 ml larutan NaCl 0,9% hingga di peroleh kekeruhan yang samadengan standar kekeruhan larutan Mc. Farland.

#### **3.8.3 Pembuatan Larutan Kontrol Negarif dan Larutan Kontrol**

##### **Positif**

Larutan kontrol positif dibuat dari sediaan obat tablet Ciprofloxacin 500 mg, karena ciprofloxacin efektif dalam melawan bakteri gram negatif maupun gram positif. Dengan cara satu tablet Ciprofloxacin digerus menggunakan mortir. Setelah itu ditimbang 65 mg dan dilarutkan dalam 50 mL aquades, selanjutnya diambil 1 mL larutan ciprofloxacin dan ditambahkan aquades hingga 10 mL, kemudian didapatkan konsentrasi larutan Ciprofloxacin 50 µg. Kontrol negatif DMSO 10% dibuat dengan

cara diambil 1 mL DMSO ditimbang, kemudian dimasukkan ke dalam gelas ukur, lalu tambahkan aquadest sampai 10 mL.

#### 3.8.4 Penanaman Bakteri

Bakteri uji diambil dengan jarum ose steril, lalu ditanamkan pada media agar dengan cara menggores. Selanjutnya diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam (Samsudin Dhuha, 2016).

#### 3.8.5 Uji Aktivitas Antibakteri

Pengujian antibakteri ekstrak daun kangkung pagar (*Ipomoea carnea* Jacq) pada pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa* menggunakan metode difusi cakram. Ekstrak kental ditimbang kemudian dilarutkan dengan aquadest kemudian dilakukan pengenceran, yang terdiri dari 3 serial konsentrasi yaitu 8.000 ppm, 7.500 ppm, dan 7.000 ppm. Seri Konsentrasi yang sudah dibuat kemudian di aduk agar ekstrak terlarut dengan baik. Untuk kontrol negatif digunakan DMSO 10% . Kontrol positif digunakan antibiotik ciprofloxacin (Vivit A. Baura, 2021)

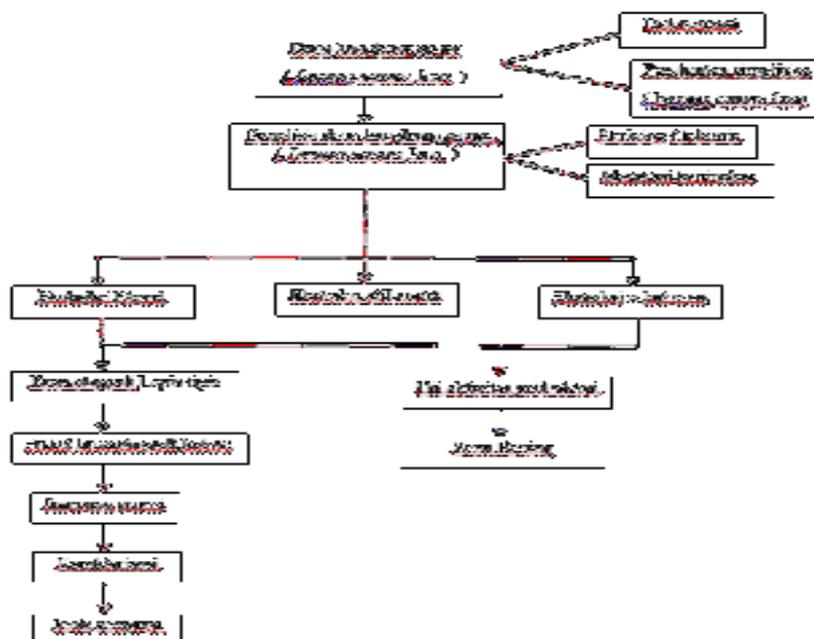
Masukan Media Nutrient Agar ke tiap-tiap cawan petri lalu dibiarkan memadat, setelah itu dimasukkan suspensi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang sudah dicampurkan pada media pembedihan NA Kemudian dikembangkan agar suspensi terserap merata pada media bakteri serta didiamkan selama 10 menit agar suspensi terserap pada media. Cawan petri tersebut diletakan kertas cakram dengan menggunakan pinset steril yang telah direndam dalam DMSO 10% sebagai kontrol negatif serta kertas cakram yang sudah direndam pada konsentrasi uji. Selanjutnya semua media diinkubasi kedalam inkubator, inkubasi dilakukan pada suhu 37°C selama 24 jam. Keesokan harinya diukur diameter zona hambat yang terbentuk dengan menggunakan jangka sorong. Zona hambat yang terbentuk menunjukkan tingkat kepekaan bakteri uji terhadap bahan antibakteri tersebut. Pengujian dilakukan sebanyak 3 kali (Vivit A. Baura, 2021).

### 3.9 Analisis Data

Hasil pengamatan serta pengukuran ditabulasikan dalam tabel pengujian aktivitas antibakteri ekstrak daun kangkung pagar (*Ipomoea carnea* Jacq) terhadap *Pseudomonas aeruginosa*, kemudian dianalisis dengan statistik dengan Anova (*Analysis of Variant*) dengan tingkat kepercayaan 95% dan apabila terdapat perbedaan antar perlakuan maka akan dilanjutkan dengan uji Tuckey.

### 3.10 Diagram Alir

Berikut diagram alir dari penelitian karakterisasi senyawa kumarin dan uji aktivitas antibakteri ekstrak daun kangkung pagar (*Ipomea carnea* Jacq.) terhadap *Pseudomonas aeruginosa* : 



Gambar 3.1 Diagram Alir