

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini yaitu kuasi eksperimental dimana terdapat kelompok pembanding pada penelitian ini, penelitian ini menerapkan rancangan acak lengkap (RAL) dengan faktor 3 x 2 dengan 3x pengulangan pengujian, penelitian ini menggunakan 2 faktor, faktor pertama menggunakan 2 jenis konsentrasi positif, negatif dan faktor kedua menggunakan 3 jenis pelarut yakni (n-heksana, ethanol, etil-asetat) dengan menggunakan pengujian aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* menggunakan metode difusi cakram.

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Bahan Alam dan Mikrobiologi Universitas Buana Perjuangan Karawang. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret 2022 sampai bulan Juli 2022.

3.2 Sampel

Sampel yang digunakan yaitu daun Kangkung pagar, yang didapat kan Di sekitar Kabupaten Karawang, dan Determinasikan di Laboratorium Herbal Materia Medica Bata.

3.3 Alat dan Bahan

3.3.1 Alat penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu berupa corong, kaca arloji, pinset, cawan penguap, spatula, jarum ose, cawan petri, batang pengaduk, *hot plate*, pipet volum, *yellow tip* dan *blue tip*, *laminae air flow (robust)*, *autoclave*,(YX-280B GEA), *rotary evaporator (ika/Buchi)*, *Erlenmeyer (Herma)*, *beker glass (pyrex)*,*waterbath (Mettler)*pipet tetes,incubator, timbangan analitik, tabung reaksi, lampu busen, vial, kapas lidi steril,maserator, kolom kromatografi, *chamber*, standar Mc, Spektrofotometer FTIR (Thermo Scientific nicolet iS-10).

3.3.2 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak kangkung pagar, pelarut n-heksana C_6H_{14} (PT.Bratachem), etil asetat $C_4H_8O_2$ (PT.Bratachem), etanol 96% C_2H_5OH (PT.Bratachem), silika gel 60, *Staphylococcus aureus*, aquades, media Nutrient Agar (Merck), NaCl 0,9% (widratra) DMSO (merck), antibiotik ciprofloxacin, preaksi Dragendorff, preaksi mayer, preaksi *liberman buchard*, besi (III) klorida ($FeCl_3$) 1%, asam klorida HCl, ammonia (NH_3), serbuk Magnesium (Mg), grlatin 1%.

3.4 Variabel Bebas

Variabel Bebas pada Penelitian ini yaitu ekstrak Daun Kangkung Pagar (*Ipomoea carnea* Jacq.) dengan variasi polar (etanol 95%), semi polar (etilasetat) dan non polar (n-heksana).

3.5 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah skrining fitokimia, uji kromatografi lapisan tipis (KLT), Kromatografi Kolom, Karakteristik isolasi secara spektrofotometri UV-vis, dan uji aktivitas bakteri dengan difusi cakram.

3.6 Definisi Operasional Variabel

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

Tabel 3.1 Devinisi Operasional Variabel

No	Variabel	Depinisi	Alat ukur	Skala	Hasil ukur
Variabel bebas					
1	Ekstrak daun kangkung pagar (<i>ipomea carnea</i> Jacq.)	Dengan variasi polar (etanol), semi polar(etil asetat), dan non polar (n-heksana	Pengujian kimia skrining fitokimia, uji pola kromatografi, uji kadar zat aktif organoleptic (warna bau, dan bentuk) dan uji aktivitas	Nominal	1.Etanol 2.Etil asetat 3.N-heksana
			Antibakteri		

Variabel terikat						
2	Warna	Parameter fisik menggunakan indera mata yang pengujian sampel ekstrak daun kangkung pagar	Uji organoleptic	Nominal	1.bening 2.coklat atau aga kecoklatan	
3	Bau	Parameter fisik menggunakan indera penciuman dalam pengujian sampel ekstrak daun kangkung pagar	Uji organoleptic	Nominal	1.khas 2.tidak khas	
4	bentuk	Uji bentuk daun ekstrak menggunakan belender	Uji organoleptic	Nominal	1.cair 2.kental	
5	Skrining fitokimia	Di uji dengan cara uji alkaloid, uji flavonoid, uji samponin, uji tannin	Uji organoleptic	Nominal	Terbentuknya larutan berwarna dan berendap	
6	Rf (retardation faktor)	Pengujian untuk mengetahui jarak yang ditempuh ekstrak yang dihasilkan dengan simplisia.	Uji kromatografi lapis tipis	Rasio	Persen (%)	
7	Uji aktivitas antibakteri	Pengujian untuk mengukur zona hambat di daerah sekir kertas cakram	Jangka sorong	diameter		

Tabel 3.1 Devinisi Operasional Variabel

3.8.1 Persiapan Sampel

Tanaman Daun kangkung pagar dideterminasi untuk mendapatkan jenis tumbuhan yang dapat digunakan dengan jelas untuk pembuatan simplisia. Daun Kangkung pagar di keringkan dengan cara di angin- anginkan pada tempat yang tidak terkena sinar matahari langsung untuk megurangi kadar air yang terkandung didalam sampel. Setelah dikeringkan kemudian sampel dihaluskan untuk memperbesar luas permukaan sehingga interaksi sampel dengan pelarut semakin

besar dan dapat mempercepat proses pelarutan/penyarian. Setelah di haluskan sampel disimpan dalam wadah tertutup baik untuk studi lanjut.

3.8.2 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia bertujuan untuk menguji kandungan senyawa kimia (Susanto, 2019). Uji skrining fitokimia yang dilakukan diantaranya yaitu :

1. Uji Flavonoid

Sampel sebanyak 2 g, lalu ditambahkan NaOH 10%, kemudiandiamati perubahan warna, apabila terjadi warna kuning, orange atau merah maka flavonoid mengandung positif (Marpaung, 2017).

2. Uji Alkaloid

Sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 1,5ml HCl 2 N, setelah itu dipanaskan selama 2 menit, kemudian didinginkan dan disaring ditambahkan 5 tetes presaksi dragendorff. Jika hasil positif mengandung alkaloid maka akan terbentuk endapan orange atau jingga (Pardede *et al.*, 2013).

3. Uji Saponin

Sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian tambah 1 ml aquades kemudian dikocok selama 10 menit. Setelah itu diamati perubahan yang terjadi. Jika Hasil positif mengandung saponin apabila muncul busa stabil selama 10 menit (Meigaria, 2016).

4. Uji Tanin

sempel dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 1 – 2 tetes pereaksi besi (III) klorida 1%. Keberadaan tannin akan ditunjukkan dengan terjadinya perubahan warna filtrat menjadi hijau atau biru kehitaman (Meigaria, 2016).

5. Uji Triterpenoid

Simplisia disari dengan eter, lalu diuapkan dan diteteskan pereaksi Liberman Buchard, terbentuk warna ungu menunjukkan positif triterpenoid, sedangkan warna biru-hijau positif steroid (Harborne, 1987).

3.8.3 Ekstraksi

Pembuatan ekstrak Daun kangkung pagar (*Ipomoea carnea* Jacq.) di lakukan dengan metode maserasi seperti (Indriani *et al.*, 2019). Pengekstrakan dilakukan dengan pelarut n-heksana, etil-asetat, dan etanol dengan berurutan. Pelarut atil asetat dituang secara perlahan kedalam maserator sampai serbuk sampel terendam semua, kemudian dilakukan pengocokan sesekali. Perendaman ini dilakukan selama 3 sampai 5 hari, kemudian disaring ke dalam wadah dan dipekatkan dengan rotary evaporator, sehingga di dapat ekstrak kental. Perlakuan ini dilakukan berulang sampai warna hasil penyaringan dengan pelarut etil asetat berubah signifikan. Perlakuan yang sama ini juga dilakukan terhadap pelarut n-heksana dan etanol.

Persentase rendeman ekstrak yang dihasilkan di hitung dengan rumus di bawah ini;

$$\% \text{ Rendeman ekstrak} = \frac{\text{berat ekstrak yang di dapat (g)}}{\text{berat simplisia yang di ekstrak (g)}} \times 100$$

3.9 Fraksinasi engan kromatografi kolom

Setelah diekstrak, masing-masing ekstrak dilakukan pengujian dengan memakai plat KLT untuk menentukan senyawa target, kemudian di fraksinasi dengan menggunakan kolom kromatografi. silika gel 60 (230-400 mesh) sampai 20gram diaktivasi di oven selama 2 jam pada suhu 110°C, dilanjutkan pendinginan dengan menempatkannya dalam desikator. Kolom pertama diisi dengan glass wool di bagian bawah dan dengan pelarut yang digunakan dalam KLT. Selanjutnya pembuatan slurry, silika gel aktif ditempatkan dalam gelas kimia dan eluen yang sesuai (etil asetat, etanol, n-heksana) tambahkan dengan kromatografi lapis tipis, aduk sampai homogen sampai tidak ada gelembung udara. Sampel (fraksi etil asetat hingga 7,5g) diresapi dengan gel silika lain, kemudian gel silika yang diimpregnasi dimasukkan ke dalam kolom, kran dibuka sedikit dan diperoleh eluat. Kemudian tambahkan lebih banyak eluen ke eluen. tiap 5-10 ml eluen ditampung dalam vial. Setiap vial (eluen) dianalisis dengan kromatografi lapis tipis. Kolom dihentikan bila tidak ada jejak pada pelat KLT. Eluat dengan nilai *R_f* dan skor dikumpulkan dengan

fraksi yang sama kemudian diuapkan. Kemudian hasil diperiksa kemurniannya dengan dilakukannya KLT pelarut yang berbeda, jika pelarut yang berbeda membuat jejak, berarti senyawa murni, jika tidak murni Hasil uji kemurnian ini dapat pakai sebagai cairan untuk kromatografi kolom berikutnya (Kusmiyati.,at al.,2011).

3.10Fraksinasi Kromatografi Lapis Tipis

Fase gerak dilakukan dengan KLT menggunakan rasio kloroform yang berbeda. dari hasil perbandingan volume digunakan pada kromatografi lapis tipis, eluat dipilih dengan perbandingan volume n-heksana:etilasetat = 8:2 Setelah eluat mencapai batas atas (0,5 cm dari ujung atas pelat silika gel), lembaran gel silika dikeluarkan dari wadah dan dikeringkan di udara. Kemudian dideteksi menggunakan lampu UV 254 nm (Kusmiyati, et al., 2011).

3.11 Uji antibakteri

3.11.1 Sterilisasi Alat

Alat yang digunakan terlebih dahulu dicuci bersih lalu dikeringkan. Untuk tabung reaksi, Erlenmeyer, gelas ukur, pipet kemudian ditutup mulutnya dengan kapas yang sudah dibulat dengan kain kasa, lalu dibungkus dengan kertas perkamen, setelah itu disterilkan didalam autoklaf pada suhu 121 °C dan selama 15 menit (Curtis, 1999).

3.11.1 Pembuatan Media Nutrient agar

Sebanyak 28 g nutrient agar ditimbang, kemudia disuspensikan kedalam air sebanyak 1 L, lalu dipanaskan sampai bahan larut dan kemudian di sterilkan di dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit (Oxoid, 1982). Media selanjutnya dituang dalam tabung reaksi sebanyak 7 ml, tabung yang telah berisi nutrient agar diletakan pada kemiringan 30-45°. Di biarkan agar menjadi dingin dan keras.

3.11.2 Pembuatan suspensi bakteri

Pembuatan suspensi dengan cara biakan bakteri kemudian diambil media agar. Dan kemudian bakteri di uji disuspensikan lalu di sterilke dalam tabung reaksi dan di vortex (Gama, Z.P., et al., 2010).

3.11.4 Uji aktivitas antibakteri

Siapkan Nutrient agar kemudian dimasukkan ke dalam cawan petri yang sudah steril, tambahkan suspensi bakteri 3 tetes. Kemudian di homogenkan dengan cara digoyang memutar agar suspensi bakteri tersebar merata dan dibiarkan memadat. Sebagai kontrol negatif menggunakan DMSO dan kontrol positif menggunakan antibiotik Ciprofloxacin (Vivit A. Baura, 2021). Perlakuan ini diulang sebanyak 3 kali. Kemudian dalam media Nutrient agar dan diinkubasi pada *waterbath shaker* 37°C. Dengan kecepatan 1000 rpm selama 24 jam. Uji antibakteri ini dilakukan pengulangan 3 kali dengan konsentrasi 2000 ppm, 2250 ppm, 2500 ppm. Untuk Area bening di sekitar cakram menunjukkan tidak ada pertumbuhan bakteri, kemudian diukur dengan jangka sorong (Greenwood, 1995). Pengujian ini menggunakan metode difusi cakram. Sebanyak 1ml Suspensi bakteri dengan padat, kemudian di masukkan ke dalam cawan petri setril, tambahkan Nutrien agar cair. Setelah media agar memadat cairan ekstrak diletakan dengan masing-masing bagian dan kemudia diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Kemudian diamati pertumbuhan bakteri lalu lihat zona bening disekitar cakram.

3.11.3 Konsentrasi hambat minimum (KHM)

KHM adalah zat antimikroba yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri setelah diinkubasi 24 jam dan tidak tumbuh koloni bakteri yang diketahui dengan cara mengamati banyaknya koloni bakteri yang tumbuh dengan menggunakan metode difusi (Tortora,dkk 2010). Potensi antibakteri diukur dengan diameter zona hambat, yang dikelompokkan menjadi 3 yaitu diameter zona hambat ≤ 5 mm dikategorikan lemah, diameter zona hambat 5-10 mm dikategorikan sedang, diameter zona hambat 10-20 mm dikategorikan kuat dan diameter zona hambat ≥ 20 mm dikategorikan sangat kuat.

3.12 Analisis Data

Hasil pengamatan serta pengukuran ditabulasikan dalam tabel pengujian aktivitas antibakteri ekstrak daun kangkung pagar (*Ipomoea carnea* Jacq.) terhadap bakteri *Stapylococcus aureus*, kemudian dianalisis dengan statistik Anova (*Analysis of Variant*) lanjut dengan uji Kruskal Wallis sebagai pengganti anova satu yang tidak homogen, lalu uji post hock tukey, untuk melihat perbedaan rata-rata dari dua.