

## BAB III METODE PENELITIAN

### 3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian mengenai uji antioksidan Ekstrak Bunga Kangkung Pagar (*Ipomoea carnea Jacq.*) menggunakan metode ABTS serta uji aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Salmonella Typhimurium* ini merupakan jenis penelitian eksperimental yang dilakukan di Laboratorium Farmasi Universitas Buana Perjuangan Karawang untuk mengetahui seberapa besar aktivitas antioksidan dari Ekstrak Bunga Kangkung Pagar (*Ipomoea carnea Jacq.*) dan aktivitas antibakterinya terhadap bakteri *Salmonella Typhimurium* menggunakan metode difusi cakram.

### 3.2 Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak Bunga Kangkung Pagar yang didapat dari Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat (BALITRO), Kota Bogor, Provinsi Jawa Barat.

### 3.3 Bahan dan Alat Yang Digunakan

#### 3.3.1 Bahan

Bahan yang digunakan selama penelitian adalah ekstrak bunga kangkung pagar (*Ipomoea carnea Jacq.*) (1kg), pelarut etanol, etil asetat ( $C_4H_8O_2$ ), n-heksana ( $C_6H_{14}$ ), bakteri *Salmonella typhi*, media Nutrien Agar (NA), Aquadest, NaCl 0,9 %, DMSO (Dimetil Sulfoksida), antibiotik amoxycillin, ABTS, Kalium Persulfat ( $K_2S_2O_8$ ) dan Vitamin C serta etanol *p.a.*

#### 3.3.2 Alat

Alat yang akan digunakan selama penelitian adalah corong, kaca arloji, botol coklat, pinset, cawan penguap, labu ukur, gelas ukur, spatula, jarum ose, cawan petri, batang pengaduk, *hot plate*, pipet volume, autoclave, *vacum rotary evaporator*, erlenmeyer, beaker glass, waterbath, pipet tetes, inkubator, timbangan analitik, tabung reaksi, lampu bunsen, vial, rak tabung reaksi, kapas lidi steril, maserator, mikropipet, *laminar airflow* (LAF AV – 100), aluminium foil, tissue,

spektrofotometer UV-Vis (Thermo Scientific 33-PPPTS 2017-L205-0006) dan kuvet (Purshee™).

### 3.4 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan mulai bulan November 2021 sampai dengan bulan Juli 2022 di Laboratorium Farmasi Universitas Buana Perjuangan Karawang.

### 3.5 Variabel Penelitian

#### 3.5.1 Klasifikasi Variabel

##### a. Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini yaitu bioaktivitas antioksidan dari ekstrak etanol bunga kangkung pagar (*Ipomoea carnea Jacq.*) dan ekstrak bunga kangkung pagar (*Ipomoea carnea Jacq.*) dengan variasi pelarut polar (etanol), semi polar (etil asetat) dan nonpolar (n-heksana) yang diperoleh sampel serta uji aktivitas antibakterinya terhadap bakteri *Salmonella typhi*.

##### b. Variabel terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah uji aktivitas antioksidan yang skala ukurnya menggunakan metode ABTS dan dalam uji aktivitas antibakteri dengan besarnya diameter zona bening yang terbentuk di sekeliling kertas cakram (DDH) yang diukur menggunakan jangka sorong.

#### 3.5.2 Definisi operasional variabel

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

**Tabel 3.1** Definisi Operasional Variabel

No	Variabel	Definisi	Alat Ukur	Skala	Hasil Ukur
<b>Variabel Bebas</b>					
1	Bioaktivitas antioksidan	Uji aktivitas antioksidan dari ekstrak bungan kangkung pagar dengan varian pelarut polar (etanol), semi polar (etil asetat) dan nonpolar (n-heksana)	Pengujian antioksidan dengan menggunakan metode ABTS	-	-

2	Aktivitas antibakteri ekstrak bunga kangkung pagar terhadap bakteri <i>Salmonella typhi</i>	Aktivitas antibakteri ekstrak bunga kangkung diperoleh dari nilai diameter daerah hambat	Pengujian antibakteri difusi cakram dengan kontrol positif amoxycillin	-	-
<b>Variabel Bebas</b>					
3	Daya Hambat antibakteri terhadap <i>Salmonella Typhi</i>	Pengujian untuk mengukur zona digital hambat di daerah sekitar kertas cakram	Jangka sorong	Rasio	Diameter Daya Hambat (mm)
4	Aktivitas antioksidan	Pengujian untuk mengukur tingkat kekuatan antioksidan	Sprektrofotometer UV-Vis	Rasio	Nilai IC50 (ppm)

### 3.6 Prosedur Penelitian

#### 3.6.1 Preparasi Sampel

Determinasi atau pemeriksaan pada tanaman bunga kangkung pagar dilakukan di UPT Laboratorium Herbal Materian Medica Batu, Malang bertujuan untuk mendapatkan jenis tumbuhan yang digunakan dengan jelas. Determinasi dilakukan dengan mencocokkan tanaman dengan ciri-ciri morfologi tumbuhan bunga kangkung pagar yang digunakan penelitian sesuai acuan pustaka.

Setelah determinasi dilakukan kemudian dilakukan pengumpulan sampel Bunga kangkung pagar dengan perajangan dan pengeringan di suhu ruangan antara 20°C sampai 25°C selama 3-4 hari guna mengurangi kadar air yang terkandung di dalamnya. Sampel yang telah dikeringkan, kemudian di haluskan menggunakan blender yang bertujuan untuk memperbesar luas permukaan sehingga interaksi antara sampel dengan pelarut semakin besar guna mempercepat proses pelarutan senyawa yang di inginkan. Sampel yang telah dihaluskan disimpan di dalam wadah tertutup baik untuk studi lebih lanjut.

#### 3.7 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan untuk menentukan dan mengidentifikasi kandungan senyawa kimia yang terdapat pada simplisia ataupun ekstrak bunga kangkung pagar (*Ipomoea carnea* Jacq.). Adapun skrining fitokimia yang harus dilakukan antara lain uji flavonoid, saponin, tanin, polifenol, uji alkaloid, steroid dan terpenoid. Berikut merupakan tahapan skrining fitokimia menurut Abriyani dan Fikayuniar (2020) :

## 1. Uji Flavonoid

Sebagian lapisan air dari ekstrak diambil dan dipindahkan menggunakan pipet ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan asam klorida (HCl) pekat dan ditambahkan serbuk magnesium (Mg), adanya warna jingga, merah muda sampai merah menunjukkan positif (+) flavonoid.

## 2. Tanin dan Fenolik

Lapisan air dari ekstrak diambil dan dipindahkan menggunakan pipet ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan pereaksi besi klorida ( $\text{FeCl}_3$ ), berwarna biru tua, hijau, hitam yang menunjukkan adanya fenol atau tanin.

## 3. Saponin

Lapisan air dikocok kuat dalam tabung reaksi selama 30 detik, terus menerus berbuih yang menunjukkan saponin.

## 4. Terpenoid dan Steroid

Lapisan kloroform dibawa ke tiga lubang drop plate, biarkan kering. Teteskan konsentrasi asam sulfat ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) ke masing-masing lubang drop plate dan setetes asetat anhidrida ( $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$ ), hijau atau hijau kebiruan menunjukkan adanya steroid dan merah atau magenta menunjukkan terpenoid.

## 5. Alkaloid

Dua sampai empat gram sampel dihaluskan dengan mortar stamper, tambahkan sedikit pasir dan 10 mL kloroform ( $\text{CHCl}_3$ ) – larutan ammonia ( $\text{NH}_3$ ) 0,05 N. filtrat disaring dengan kapas dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 10 tetes asam sulfat 2 N dikocok perlahan. Campuran dibiarkan sampai terbentuk dua lapisan yaitu lapisan asam dan lapisan kloroform. Asam lapisan diambil dengan pipet tetes kaca dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Lapisan asam ditambahkan pereaksi Mayer, endapan putih menunjukkan adanya gugus alkaloid.

### 3.8 Pembuatan Ekstrak

Prosedur pembuatan ekstrak bunga kangkung pagar (*Ipomoea carnea Jacq.*) dikerjakan dengan metode maserasi, yaitu dengan merajang, menimbang lalu mengekstraksi dengan pelarut n-heksan, etil asetat dan etanol dengan metode maserasi secara berurutan. Sampel bunga kangkung pagar (*Ipomoea carnea Jacq.*) dimasukkan ke dalam maserator.

Sampel yang kering dan dalam bentuk serbuk diekstrak menggunakan 3 pelarut yaitu n-heksan, etil asetat dan etanol. Pengekstrakan pertama dilakukan dengan n-heksan dengan metode maserasi. Kemudian perendaman dilakukan dalam 4 sampai 5 hari dan sesekali diaduk, kemudian disaring. Setelah disaring kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator*. Residu dilakukan remaserasi kembali dalam beberapa hari dan sesekali diaduk. Perlakuan tersebut dilakukan beberapa kali sampai ekstrak terjadi perubahan warna filtrat yang signifikan. Untuk melakukan perlakuan berikutnya, residu sebelumnya dikeringkan dan kemudian dilanjutkan dengan pelarut berikutnya.

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

### **3.9 Pengujian Bioaktivitas Antioksidan Menggunakan Metode ABTS**

#### **3.9.1 Pembuatan larutan stok ABTS**

- a. Larutan a : ditimbang 7,1015 mg ABTS, dilarutkan dalam 5 ml aquadest. Diinkubasi selama 12 jam
- b. Larutan b : Ditimbang 3,500 mg kalium persulfat ( $K_2S_2O_8$ ) dilarutkan dalam 5 ml aquadest. Diinkubasi selama 12 jam
- c. Larutan a dan b dicampur dalam ruang gelap dan cukupkan volumenya dengan etanol absolut sampai 25 ml.

#### **3.9.2 Pengukuran Serapan Larutan Blanko ABTS**

Larutan ABTS dipipet sebanyak 1 ml dan dicukupkan volumenya sampai 5 ml dengan etanol p.a dalam labu terukur. Larutan ini kemudian diukur dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 750 nm.

#### **3.9.3 Pengukuran Aktivitas Pengikatan Radikal bebas ABTS dengan sampel**

Larutan stok sampel ekstrak bunga kangkung pagar 1000 ppm di pipet masing – masing 25  $\mu$ l, 50  $\mu$ l, 75  $\mu$ l dan 100  $\mu$ l, campuran ditambah 1 ml larutan ABTS lalu dicukupkan volumenya sampai 5 ml dengan etanol p.a sehingga diperoleh 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm dan 20 ppm. Selanjutnya dihomogenkan lalu diukur serapan dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 734 nm. Besarnya daya antioksidan dihitung dengan persamaan 1 sebagai berikut:

$$\text{Daya antioksidan} = \frac{(\text{Abs Blanko} - \text{Abs sampel})}{\text{Absorbansi Blanko}} \times 100\%$$

### 3.9.4 Pengukuran Aktivitas Pengikatan Radikal bebas ABTS dengan vitamin c murni

Pengujian dilakukan dengan memipet masing – masing 25µl, 30µl, 35µl dan 40µl dari larutan stok vitamin C murni 1000 ppm, campuran ditambah 1 ml larutan ABTS lalu dicukupkan volumenya sampai 5 ml dengan etanol p.a sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 5 ppm, 6 ppm, 7 ppm dan 8 ppm. Selanjutnya dihomogenkan lalu serapan diukur dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 734 nm.

### 3.9.5 Perhitungan Nilai IC<sub>50</sub>

Pengukuran aktivitas ekstrak bunga kangkung pagar dengan metode perendaman radikal bebas ABTS dihitung dengan cara menentukan *Inhibitor concentration* (IC<sub>50</sub>). Perhitungan nilai IC<sub>50</sub> menyatakan hubungan antara konsentrasi larutan (x) dengan % inhibisi (y). Nilai IC<sub>50</sub> dapat diperoleh dari persamaan 2 sebagai berikut :

$$y = a + bx$$

Keterangan : y = 50      a = intersep  
X = IC<sub>50</sub>      b = slop

Secara spesifik suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan sangat kuat jika nilai IC<sub>50</sub> kurang dari 50 ppm, kuat untuk IC<sub>50</sub> bernilai 50-100 ppm, sedang jika bernilai 100-150 ppm, dan lemah jika nilai IC<sub>50</sub> bernilai 151-200 ppm (Meigaria, *et al.*, 2017).

### 3.10 Pengujian Bioaktivitas Antibakteri

Metode yang digunakan dalam pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol, n-heksana dan etil asetat bunga kangkung pagar terhadap bakteri *Salmonella typhi* adalah dengan metode difusi cakram pada media NA pada konsentrasi ekstrak 3000 ppm, 2500 ppm, 2000 ppm dan 1500 ppm. Adanya daya hambat ekstrak terhadap pertumbuhan bakteri ditandai dengan zona bening yang terbentuk di sekitar kertas cakram yang diukur diameternya sebagai

diameter daya hambat (DDH) serta penentuan nilai KHM dilakukan dengan mengamati pada konsentrasi berapa mulai tidak terjadi pertumbuhan bakteri yang ditandai dengan tidak terbentuknya kekeruhan pada media NA (Rachmatiah, Tiah *et al*, 2020).

### **3.10.1 Pembuatan Media Nutrient Agar**

Pembuatan nutrient agar dilakukan dengan cara sebanyak 0,56 g Nutrient Agar ditimbang dan dilarutkan ke dalam 20 mL aquadest untuk setiap cawan petrinya dalam erlenmeyer lalu tutup dengan aluminium foil, kemudian dipanaskan di atas *hotplate* hingga larut sempurna. Sebelum digunakan, semua media disterilisasi terlebih dahulu dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit untuk menghindari tumbuhnya mikroorganisme yang tidak diinginkan. Setelah itu, tunggu media hingga suam-suam kuku ( $\pm 40^{\circ}\text{C}$ ) lalu media dapat dituangkan secara aseptis ke dalam cawan petri steril dan didiamkan pada suhu ruangan hingga media memadat (Manus *et al.*, 2016).

### **3.10.2 Peremajaan bakteri uji**

Bakteri *S.typhi* diinokulasikan ke medium agar dengan cara mengambil sebanyak satu sampai dua jarum ose secara aseptis lalu diinokulasikan dengan menggosok pada medium agar. Selanjutnya diinkubasi selama 24 jam pada temperatur 37°C sampai terjadi pertanaman.

### **3.10.3 Persiapan suspensi biakan bakteri**

Pembuatan suspensi bakteri dilakukan dengan cara mencampurkan 1-2 ose biakan bakteri *Salmonella typhi* yang telah diremajakan selama 24 jam disuspensikan ke dalam 5 ml larutan NaCl fisiologis steril 0,9%. Suspensi bakteri diencerkan hingga diperoleh bakteri sejumlah  $1 \times 10^7$  sel/ml –  $1 \times 10^8$  sel/ml yang disesuaikan dengan kekeruhan larutan standar Mc. Farland 0,5. Suspensi yang telah sesuai tersebut digunakan sebagai inokulum (Rachmatiah, Tiah *et al*, 2020).

### **3.10.4 Pembuatan Kontrol Negatif dan Kontrol Positif**

Satu tablet amoxicillin digerus menggunakan mortir kemudian timbang sebanyak 0,05 g, lalu dilarutkan ke dalam 50 mL aquadest. Larutan tersebut

kemudian diambil 1 mL dan ditambahkan aquadest ad 10 mL, sehingga didapatkan larutan amoxycillin dengan konsentrasi 50 µg. Kontrol negatif DMSO 10% dibuat dengan cara sebanyak 1 ml DMSO dimasukkan ke dalam gelas ukur, kemudian ditambahkan aquadest hingga 10 ml (Rahmadani, 2015)

### **3.10.5 Prosedur Uji Diameter Daya Hambat (DDH)**

Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi cakram. Batang kapas yang telah disterilisasi di masukkan ke dalam suspensi bakteri uji kemudian dioleskan ke dalam media NA padat hingga merata. Langkah selanjutnya meletakkan kertas cakram steril yang telah direndam larutan ekstrak dengan konsentrasi 3000 ppm, 2500 ppm, 2000 ppm dan 1500 ppm. Kontrol positif yang digunakan adalah amoxycillin dan sebagai kontrol negatif adalah DMSO 10%. Setelah diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C, adanya pertumbuhan bakteri uji dan terbentuknya zona bening di sekitar cakram diamati, lalu diukur diameternya sebagai diameter daya hambat (DDH) menggunakan jangka sorong.

### **3.10.6 Prosedur Uji Konsentrasi Hambat Minimum (KHM)**

Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) yaitu dengan mengamati adanya pertumbuhan bakteri uji pada konsentrasi ekstrak terendah yang menghasilkan diameter daerah hambat (Rachmatiah, Tiah *et al*, 2020).

### **3.11 Analisis Data**

Analisis statistik dengan menggunakan metode *Analysis of Variance* (ANOVA) untuk analisis data uji aktivitas antioksidan. Metode *kruskal wallis* yang merupakan pengembangan dari metode anova satu arah untuk kondisi beberapa persyaratan tidak bisa terpenuhi untuk analisis parametris. Data harus berdistribusi normal, nilai varian populasi sebaiknya sama dan data yang menjadi sampel harus *independent* secara acak selanjutnya uji t-test yang digunakan untuk menguji taraf kepercayaan pada analisis data uji antibakteri.

### 3.12 Jadwal Kegiatan

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan November 2021 sampai Juli 2022. Adapun kegiatan penelitian ini meliputi tahap persiapan sampai dengan penyusunan laporan penelitian.

### 3.13 Diagram Alir Penelitian



