

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Waktu serta tempat yang dilakukan dan digunakan oleh peneliti dalam melaksanakan penelitian, bertempat di Laboratorium Farmasi Universitas Buana Perjuangan Karawang serta terhitung sejak bulan Maret 2019 hingga bulan Agustus 2020 waktu yang digunakan oleh peneliti.

3.2 Alat dan Bahan

Peralatan, serta bahan-bahan untuk menunjang penelitian di antaranya.

3.2.1 Alat

Berikut beberapa peralatan digunakan pada penelitian, yaitu maserator, *waterbath*, timbangan analitik, evaporator, cawan porselen 100 ml, botol kaca, *beaker glass* 50 ml, *beaker glass* 100 ml, gelas ukur 10 ml, gelas ukur 25 ml, gelas ukur 100 ml, batang pengaduk, kertas saring, spatula, mikropipet, pinset.

3.2.2 Bahan

Berikut daftar bahan di gunakan pada saat penelitian berlangsung, yaitu ekstrak kangkung pagar, aquadest, metanol, n-heksana, etil asetat, aluminium foil, Mg, HCl pekat, amil alkohol, FeCl_3 , DMSO, MHA, pereaksi mayer, dan dragendorff, gelatin.

3.3 Prosedur Kerja

Prosedur pengerjaan yang digunakan oleh peneliti, yaitu persiapan sampel, tahap pembuatan ekstrak, tahap uji fitokimia, tahap uji antibakteri..

3.3.1 Persiapan Sampel

Tanaman kangkung pagar dideterminasi terlebih dahulu, hal ini memiliki maksud guna mendapat jenis yang digunakan pada tumbuhan secara jelas. Bertempat di Laboraturium Institut Teknologi Bandung, Fakultas Sekolah Ilmu dan teknologi Hayati tanaman kangkung pagar dideterminasi.

Sampel bunga kangkung pagar yang segar langsung dirajang dan dikeringkan pada suhu ruangan antara 20 °C sampai 25 °C selama 3 – 4 hari guna mengurangi kadar air yang terkandung di dalam bunga tersebut. Menggunakan blender, bunga kangkung pagar yang dikeringkan dihaluskan. Dimana hal tersebut memiliki tujuan guna melakukan pembesaran pada luas suatu permukaan, hingga interaksi yang terjadi antara sampel bersama pelarut menjadi lebih besar untuk mempercepat pada suatu proses pelarutan senyawa yang diinginkan. Sampel yang telah dihaluskan, lalu disimpan wadah tertutup baik untuk dilakukan studi lebih lanjut.

3.3.2 Tahap Pembuatan Ekstrak

Melalui metode maserasi dilakukan pembuatan ekstra, dengan cara penimbangan bunga kangkung pagar yang telah dirajang, selanjutnya dilakukan ekstraksi melalui cara memberikan pelarut berupa n-heksana, etil asetat serta methanol melalui maserasi dengan cara berturut-turut.. Masukkan sampel bunga kangkung pagar ke dalam maserator.

1. Pelarut n-heksana dituang secara perlahan ke dalam maserator. Selanjutnya serbuk simplisia yang direndam oleh cairan penyari dibiarkan, serta diaduk secara berkala, setelah melakukan re-maserasi selama empat hari sampai menjadi bening, kemudian dilakukan penyaringan ke wadah yang baru hingga mendapat ekstrak yang cair. Ekstrak dari hasil penyarian, kemudian dilakukan penguapan dengan *waterbath* di bawah titik didih sampai memperoleh ekstrak pekat.

2. Pelarut etil asetat dituang ke dalam maserator secara perlahan. Selanjutnya, serbuk simplisia yang dibiarkan terendam dalam cairan penyari, dimana diaduk secara berkala, lalu re-maserasi dilakukan selama empat hari sampai bening, kemudian dipindahkan pada wadah baru dengan cara disaring sehingga ekstrak cair diperoleh. Ekstrak yang dihasilkan dari penyarian, lalu dilakukan penguapan melalui *waterbath* di bawah titik didih hingga didapat ekstrak pekat
3. Pelarut metanol dituang ke dalam masetor secara perlahan. Kemudian, biarkan cairan penyari merendam serbuk simplisia yang sesekali dilakukan pengadukan, lalu dilakukan re-maserasi selama empat hari hingga bening. kemudian disaring ke dalam wadah baru sehingga diperoleh ekstrak cair. Hasil penyarian dari ekstrak, lalu diuapkan menggunakan *waterbath* di bawah titik didih sampai diperoleh ekstrak kental.

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

3.3.3 Tahap Uji Fitokimia

Setelah melakukan ekstraksi, selanjutnya dilakukan uji fitokimia metabolit sekunder sebagai berikut (Alasa *et al*, 2017) :

1. Flavonoid

Ekstrak yang diambil kemudian mendapat penambahan sebanyak 0.2 g serbuk Mg, lalu ditambahkan 5 ml asam klorida pekat serta 2 ml amil alkohol. Flavonoid dikatakan positif apabila menunjukkan warna merah, kuning, jingga pada lapisan amil alkohol (Depkes RI, 1979).

2. Saponin

Uji busa yang dilakukan didalam air panas digunakan untuk mendeteksi Saponin. Dimana secara stabil busa terlihat dalam jangka waktu 5 menit tidak menghilang setelah ditambahkan 1 tetes HCl 2 N. Oleh sebab itu Saponin dinyatakan ada.

3. Alkaloid

1 ml ekstrak ditambahkan dengan 2 ml HCl, lalu dikocok. Lalu dibagi ke dalam dua tabung reaksi. Tabung pertama ditetesi pereaksi mayer. Reaksi positif ditandai dengan adanya sedimen putih atau kuning. Tabung kedua ditetesi pereaksi dragendorff. Reaksi positif ditandai dengan adanya sedimen berwarna merah.

4. Tanin

Diambil sebanyak 1 ml sampel, lalu ditetesi FeCl_3 . Warna hitam atau biru tua menandakan adanya tanin melalui reaksi positif

5. Fenolik

Diambil sebanyak 1 ml sampel, lalu ditetesi dengan FeCl_3 . Hasil dikatakan positif jika menunjukkan warna ungu, hitam pekat, biru, merah atau hijau.

6. Steroid dan Terpenoid

Diambil 1 ml sampel dengan ditambahkan Asam asetat anhidrat sebanyak 5 tetes dan kemudian dikocok. Selanjutnya penambahan H_2SO_4 sebanyak 2 tetes dan dikocok serta diamati. Jika hasil yang ditunjukkan berupa warna hijau biru, maka hasilnya positif dan terdapat steroid sedangkan warna merah adalah terpenoid.

3.3.4 Tahap Uji Antibakteri

Pada tahap ini dilakukan pembuatan media dengan mengambil Mueller Hinton broth sebanyak 0,57 gram, lalu dicampurkan dengan aqua dest sebanyak 15 ml di dalam erlenmeyer. Kemudian Melalui proses pemanasan campuran tersebut diaduk sampai mendidih dan menjadi jernih warnanya. Lalu, bungkus erlenmeyer dan siap untuk disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Kemudian, cairan media Mueller Hinton agar dituang ke dalam cawan petri 15 ml. Lalu, dinginkan sampai memadat.

Tahap berikutnya dilakukan peremajaan kultur murni bakteri *Staphylococcus epidermidis*. Diambil biakan murni menggunakan jarum ose, lalu diinokulasikan ke media Mueller Hinton agar. Kemudian, media

Mueller Hinton agar yang sudah diinokulasikan, diinkubasi selama 1x24 jam. Lalu, dilihat pertumbuhan bakterinya. Tahap selanjutnya dilakukan pembuatan larutan suspensi dengan mengambil sebanyak 10 ml NaCL ke dalam vial, lalu diambil bakteri *Staphylococcus epidermidis* dengan menggunakan jarum ose ke dalam vial berisi NaCl. Kemudian, bandingkan kekeruhan larutan NaCL tersebut dengan Mc. Farland 0.5 (10^8 koloni/ml).

Tahap selanjutnya dilakukan penanaman bakteri ke media Mueller Hinton agar dengan mengambil larutan NaCL menggunakan mikropipet sebanyak 100 mikrometer ke media Mueller Hinton agar. Lalu, ratakan menggunakan batang L ke media agar. Kemudian, diisi lubang sumuran dengan masing-masing konsentrasi ekstrak, kontrol positif dan kontrol negatifnya. Lalu berikutnya, dilakukan inkubasi selama 1x24 jam. Hasil jernih dari zona hambat yang dihasilkan, lalu diukur menggunakan jangka sorong.

3.4 Diagram Alir

