

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian kuantitatif dengan rancangan eksperimental laboratorium, untuk mengetahui karakteristik senyawa metabolit sekunder ekstrak n-heksana daun kangkung pagar serta mengevaluasi aktivitas antijamurnya terhadap *Malassezia furfur*. Sampel berupa ekstrak n-heksana diuji secara fitokimia, dianalisis menggunakan GC-MS, dan dilakukan uji aktivitas antijamur dengan metode difusi sumuran pada beberapa variasi konsentrasi.

3.2 Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini berupa ekstrak n-heksana daun kangkung pagar (*Ipomoea carnea* Jacq.) yang diperoleh melalui Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat (Balittro), Instalasi Penelitian dan Pengembangan Teknologi Pertanian yang berlokasi di Kabupaten Bogor.

3.3 Bahan dan alat yang digunakan

3.3.1 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi ekstrak n-heksana dari daun kangkung pagar, jamur *Malassezia furfur*, media agar *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA), serta berbagai reagen untuk uji skrining fitokimia, seperti mayer (Raksa III klorida (HgCl_2); Kaliun iodide (KI); aquadest), dragendrof (Barium Nitrat ($\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$); Asam nitrat (HNO_3); Kaliun iodide (KI); aquadest), bubuk magnesium (Mg), *Lieberman-Buchardart* (Asam asetat (CH_3COOH); H_2SO_4 ; Aquadest), FeCl_3 1% (FeCl_3 ; aquadest), HCl 2N (HCl 2N; aquadest), H_2SO_4 2N (H_2SO_4 ; aquadest), HCl 0,1 N (Asam klorida (HCl); aquadest), pelarut n-heksana, DMSO 10% dan sebagai baku pembanding menggunakan Ketokonazole.

3.3.2 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi alat tulis, tabung reaksi (Pyrex), rak tabung, pipet tetes kaca, beaker glass 100ml (iwaki), gelas

ukur 50 ml (*Iwaki*),), gelas ukur 10 ml (*Iwaki*), *Erlenmeyer* (*Iwaki*), corong (*Iwaki*), kertas saring, spatula, batang pengaduk, cawan petri (petri dish), *water bath* (penangas air), batang ose dengan ujung bulat, pengaduk berbentuk L, Autoklaf, penghitung koloni (*colony counter*), serta instrumen *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* (GC-MS) (*Agilent Technologies, Inc.*)

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman daun kangkung pagar (*Ipomoea carnea* Jacq.) dilakukan di Laboratorium Sentral Universitas Padjajaran Bandung, untuk diidentifikasi dan memastikan tanaman yang diteliti sesuai dengan morfologi tumbuhan agar dapat mengetahui kebenaran identitas tanamannya.

3.4.2 Ekstraksi

Proses ekstraksi daun kangkung pagar (*Ipomoea carnea* Jacq.) menggunakan metode maserasi, dilakukannya ekstraksi maserasi karena berdasarkan zat aktifnya. Simplisia yang telah dihaluskan dimasukkan ke dalam wadah maserasi, kemudian ditambahkan pelarut n-heksana, proses perendaman selama 24 jam dengan pengadukan sesekali, kemudian larutan disaring menggunakan kertas saring dan proses perendaman diulangi hingga pelarut tidak lagi berwarna. Seluruh filtrat yang diperoleh kemudian digabungkan dan diuapkan menggunakan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental n-heksana. Selanjutnya, dihitung rendemen ekstrak kental yang dihasilkan (Abriyani, 2024).

Setelah ekstrak kental didapatkan dihitung rendemen ekstrak yang didapat. Rendemen ekstrak dihitung menggunakan rumus berikut:

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

3.4.3 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia merupakan metode yang digunakan untuk mengetahui adanya senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam bahan alam. Prosedur pengujian ini mengacu pada metode yang telah

digunakan dalam penelitian oleh Wijaya *et al.* (2014) dan Abriyani *et al.* (2024) dengan tahapan skrining fitokimia sebagai berikut :

1. Uji Alkaloid

Ekstrak n-heksana dari daun kangkung pagar (*Ipomoea carnea* Jacq.) diencerkan terlebih dahulu menggunakan sedikit pelarut n-heksana. Larutan hasil pengenceran kemudian dibagi ke dalam tiga tabung reaksi. Tabung reaksi pertama digunakan sebagai kontrol (blanko), sedangkan tabung reaksi kedua ditambahkan tiga tetes pereaksi Mayer. Apabila terbentuk endapan berwarna putih, maka uji menunjukkan hasil positif adanya senyawa alkaloid. Pada tabung reaksi ketiga, ditambahkan tiga tetes pereaksi Dragendorff; terbentuknya endapan putih juga menandakan adanya kandungan alkaloid.

2. Uji Tanin

Ekstrak n-heksana diencerkan menggunakan sedikit pelarut n-heksana, kemudian larutan tersebut dibagi ke dalam dua tabung reaksi. Tabung reaksi pertama digunakan sebagai kontrol (blanko), sedangkan pada tabung reaksi kedua ditambahkan dua tetes larutan FeCl_3 1%. Reaksi positif ditunjukkan dengan munculnya warna biru atau hijau kehitaman, yang mengindikasikan keberadaan senyawa fenolik atau tanin.

3. Uji Saponin

Ekstrak n-heksana daun kangkung pagar (*Ipomoea carnea* Jacq.) diencerkan menggunakan pelarut n-heksana, kemudian dikocok secara kuat selama 10–15 detik. Apabila terbentuk busa setinggi ± 1 cm dan tetap stabil setelah penambahan satu tetes larutan HCl 2N, maka hasil tersebut menunjukkan indikasi adanya senyawa metabolit sekunder golongan saponin.

4. Uji Flavonoid

Sampel yang diencerkan menggunakan pelarut n-heksana, kemudian disaring, ditambahkan lima tetes larutan HCl pekat dan sedikit serbuk logam magnesium. Jika campuran larutan menunjukkan perubahan warna menjadi kuning, jingga, atau merah, maka hal tersebut mengindikasikan

adanya kandungan senyawa flavonoid dalam simplisia tanaman obat tersebut.

5. Uji Steroid/Terpenoid

Sampel ekstrak n-heksana diencerkan dengan pelarut n-heksana, ditambahkan 3 tetes pereaksi *Liebermann-Burchard*. Munculnya warna ungu menunjukkan adanya kandungan senyawa triterpenoid, sedangkan perubahan warna menjadi biru kehijauan mengindikasikan keberadaan senyawa golongan steroid.

6. Uji Glikosida

Sampel yang sudah diencerkan kemudian di uji identifikasi glikosida dilakukan dengan menggunakan pereaksi *Liebermann-Burchard* sebanyak 0,1 mL larutan uji terlebih dahulu diuapkan di atas penangas air hingga kering, lalu sisa larutan dilarutkan kembali dengan 5 mL asam asetat anhidrat proanalisis jika ada terbentuknya warna biru atau hijau menunjukkan adanya kandungan senyawa glikosida

3.4.4 Uji Aktivitas Antijamur

Prosedur pengujian mengacu pada metode yang diadaptasi dari Abriyani *et al.* (2024). Tahapan persiapan uji aktivitas antijamur meliputi:

1. Pembuatan Media *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA)
SDA ditimbang sebanyak 27,3 gram dan dilarutkan ke dalam 420 mL aquadest hingga membentuk suspensi homogen. Suspensi tersebut kemudian dipanaskan selama ± 1 menit dan disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah proses sterilisasi, media diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
2. Peremajaan Kultur Jamur
Sebanyak 1–2 ose koloni jamur diambil dari biakan murni menggunakan jarum ose secara aseptis, kemudian diinokulasikan pada media agar miring dan diinkubasi dalam inkubator untuk pertumbuhan ulang.
3. Uji Aktivitas Antijamur
Pengujian aktivitas antijamur dilakukan dengan metode difusi sumuran. Media SDA steril sebanyak 25 mL dituangkan secara aseptik ke dalam

cawan petri steril dan dibiarkan hingga memadat. Setelah media memadat, suspensi jamur dioleskan merata pada permukaan media. Selanjutnya, dibuat lubang sumuran pada media dan diisi dengan ekstrak n-heksana daun kangkung pagar pada konsentrasi 6,25%, 12,5%, 25%, 50%, dan 100%. Ketoconazole digunakan sebagai kontrol positif, sedangkan DMSO 10% digunakan sebagai kontrol negatif. Cawan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, dan zona hambat yang terbentuk diukur menggunakan jangka sorong dengan rumus:

$$\text{Zona Hambat} = \frac{(D_v - D_s) + (D_h - D_s)}{2}$$

Keterangan : Dv = Diameter vertikal (mm)

Dh = Diameter horizontal (mm)

Ds = Diameter sumur (mm)

Parameter anti jamur menurut Saeidi *et al.* (2024) diklasifikasikan ke dalam tabel aktivitas anti jamur pada :

Tabel 3.1. Aktivitas Anti Jamur

Diameter Zona (mm)	Kategori Antijamur
≤ 14	Lemah
15–18	Sedang
≥ 19	Kuat

4. Penetapan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bakterisida Minimum (KBM)

Menurut rujukan dari Daris dan Syam (2023), uji dilakukan seperti :

a. Uji KHM Padatan

- 1) Siapkan media padat (Sabouraud Dextrose Agar untuk jamur).
- 2) Larutkan ekstrak/senyawa uji dengan seri pengenceran bertingkat lalu campurkan ke dalam media agar cair steril (±45–50 °C) dengan konsentrasi berbeda (misal 100%, 50%, 25%, 12,5%, dst.).

- 3) Tuangkan media ke cawan petri sampai memadat.
- 4) Inokulasikan suspensi mikroba standar (spot inokulasi) di permukaan agar.
- 5) Inkubasi sesuai jenis mikroba (jamur 24–48 jam pada 25–30 °C).
- 6) Amati pertumbuhan mikroba di tiap konsentrasi.
- 7) Konsentrasi terendah media yang tidak ditumbuhi koloni ditetapkan sebagai KHM.

b. Uji KBM metode subkultur

- 1) Dari cawan uji KHM yang tidak menunjukkan pertumbuhan, ambil sedikit inokulum dengan ose steril.
- 2) Tumbuhkan kembali pada media agar tanpa ekstrak (kontrol pertumbuhan) dengan menggoreskan pada media agar sesuai konsentrasi, kontrol negatif dan positif
- 3) Inkubasi sesuai kondisi mikroba selama 24 jam
- 4) Hitung koloni dengan menggunakan *colony counter* berapa banyak koloni pada cawan uji
- 5) Konsentrasi terendah yang tidak menumbuhkan koloni sama sekali adalah KBM

3.4.5 Analisis GC-MS (*Gas chromatography - Mass Spectrometry*)

Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GC-MS) digunakan untuk menganalisis metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak n-heksana daun kangkung pagar (*Ipomoea carnea* Jacq.). Mengacu pada prosedur yang diterapkan oleh Simanjuntak *et al.* (2021) dalam analisis, yaitu:

1. Pemisahan Senyawa dengan *Gas Chromatography* (GC)

Sampel diinjeksikan ke kolom kapiler; gas pembawa (helium) mengalir melintasi kolom dengan pemrograman suhu yang terkontrol, memungkinkan pemisahan senyawa berdasarkan volatilitas dan sifat interaksi dengan fase diam kolom

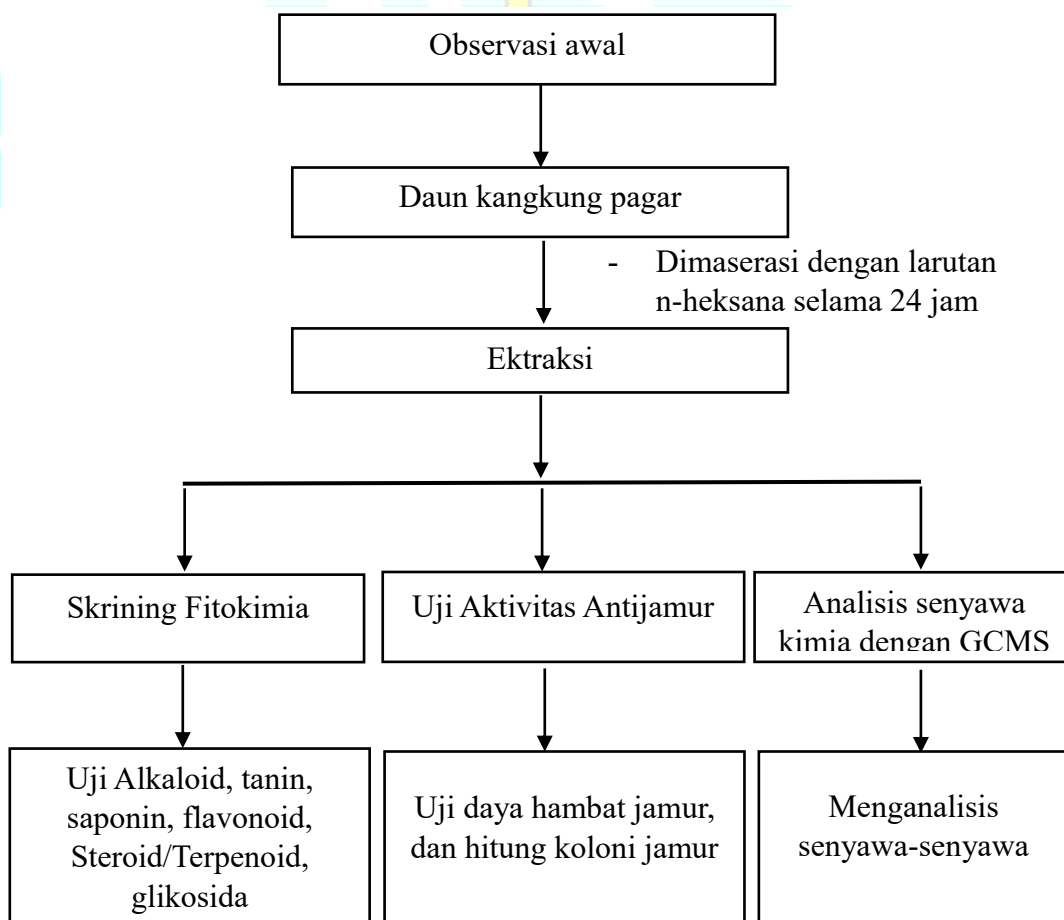
2. Identifikasi melalui *Mass Spectrometry* (MS)

Setelah keluar dari kolom, senyawa diionisasikan dengan menghasilkan spektrum fragmen khusus berdasarkan rasio massa terhadap muatan (m/z). Spektrum ini kemudian dibandingkan dengan perpustakaan spektrum seperti NIST atau Wiley untuk identifikasi zat.

3. Interpretasi Data

Hasil disajikan dalam bentuk kromatogram yang memuat puncak-puncak senyawa beserta retensi, luas puncak (peak area) dan persentase relatif. Identifikasi senyawa dilakukan dengan mencocokkan spektrum dan retention index (RI) ke dalam database seperti GMD (*Global Metabolome Database*)

3.5 Diagram Alir Penelitian



Gambar 3.1 Diagram Alir Penelitian

3.6 Analisis Data

Metode analisis data dalam penelitian ini dilakukan secara deskriptif. Hasil yang diperoleh disajikan melalui tabel maupun grafik, kemudian dijelaskan secara deskriptif berdasarkan temuan yang diamati.

