

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian Eksperimental, penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Bahan Alam Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Buana Perjuangan Karawang untuk mengetahui metabolit sekunder dan uji antifungi yang terkandung pada ekstrak etanol daun kangkung pagar dan melakukan uji LC-MS (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*) di Laboratorium Universitas Airlangga, Surabaya.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Peralatan yang akan digunakan pada penelitian ini yaitu LC-MS (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*), autoklaf (Agm Medica), ekstraktor, pengaduk magnetik, centrifuge, *rotary evaporator* (Ika Rv), *syringe filters*, inkubator (*Memmert*), pipet elektrik, cawan petri, tabung reaksi (Iwaki), timbangan digital (SKA digital), spatula, pipet tetes (*Pyrex*), lemari pendingin, LAF (*Mascotte*), bunsen, masker (*Sensi*), sarung tangan (*Onemed*), jarum ose.

3.2.2 Bahan

Bahan yang akan digunakan pada penelitian ini yaitu daun kangkung pagar, etanol 96%, *Potato Dextrose Agar* (PDA), aquadest, jamur *Candida albicans*, zat aktif Nistatin (kontrol positif), HCl pekat, KOH, FeCl₃, HCl 2N, H₂SO₄, dragendrof, bubuk magnesium, liebermann- burchard, gelatin dan metanol.

3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Lokasi penelitian dilaksanakan di Laboratorium Bahan Alam dan Laboratorium Mikrobiologi Universitas Buana Perjuangan Karawang. Pengujian LC-MS (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*) dilakukan diluar yaitu Laboratorium Universitas Airlangga.



3.4 Prosedur Penelitian

Adapun prosedur-prosedur pada penelitian ini meliputi:

3.4.1 Determinasi Daun Kangkung Pagar (*Ipomoea carnea* Jacq)

Sampel daun kangkung pagar (*Ipomoea carnea* Jacq) dideterminasi di Universitas Padjajaran Bandung. Tujuan dari dideterminasi adalah untuk mengetahui kebenaran jenis tanaman yang digunakan pada pengujian.

3.4.2 Pembuatan Simplisia

Pembuatan simplisia daun kangkung pagar (*Ipomoea carnea* Jacq). Daun kangkung pagar (*Ipomoea carnea* Jacq) dilakukan sortasi basah bertujuan untuk membersihkan daun dari kotoran-kotoran dan bahan-bahan asing lainnya. Pencucian menggunakan air bersih secara mengalir agar menghilangkan tanah atau pengotor lain yang melekat pada daun, kemudian ditiriskan. Daun kangkung pagar (*Ipomoea carnea* Jacq) dilanjutkan dengan proses pengeringan dengan cara dijemur menggunakan matahari dan penjemuran ditutupi dengan kain hitam yang tidak terlalu tebal, setelah simplisia kering dilakukan sortasi kering yang bertujuan untuk dipisahkan dari kotoran- kotoran atau bahan-bahan asing lainnya. Setelah itu simplisia disimpan dalam wadah dan dihaluskan sampai menjadi serbuk halus. Simplisia kering diayak menggunakan ayakan *mesh* no. 80, serbuk yang halus akan lebih mudah diekstraksi. Selanjutnya serbuk ditimbang 500 gram untuk dilakukan proses ekstraksi secara maserasi (Depkes RI, 2014).

3.4.3 Pembuatan Ekstrak Daun Kangkung Pagar

Pembuatan ekstrak daun kangkung pagar (*Ipomoea carnea* Jacq) dilakukan dengan metode dingin (maserasi), yaitu simplisia daun kangkung pagar (*Ipomoea Carnea* Jacq.) ditimbang sebanyak 1 kilogram, dimaserasi dengan etanol 96% sebanyak 1500 ml, disimpan di tempat yang tertutup selama 3 hari yang terlindung dari cahaya sesekali diaduk, Disaring menggunakan kertas saring rangkap kemudian filtrat dimasukan ke dalam *beaker glass* dan ditutup dengan alumunium foil, dilakukan remaserasi selama

2 hari dengan cara merendam kembali ampas dengan etanol 96% sebanyak 750 ml sambil sesekali diaduk, sisa filtrat dikumpulkan kemudian dipekatkan, dan dilakukan pengentalan ekstrak. (Fikayuniar *et al.*, 2022).

Sampel yang digunakan adalah ekstrak etanol daun kangkung pagar yang di dapat dari Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat Ballitro Instalasi Penelitian dan Pengembangan Teknologi Pertanian di Kabupaten Bogor.

3.4.4 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia merupakan suatu langkah awal untuk memberikan gambaran tentang kandungan senyawa tertentu dalam bahan alam yang akan diteliti. Metode skrining fitokimia secara kualitatif dilakukan dengan mengamati reaksi warna atau pembentukan endapan menggunakan reagen tertentu, yang bertujuan untuk mendeteksi golongan metabolit sekunder pada sampel tanaman, seperti simplisia dan ekstrak herba daun kangkung pagar (Vifta & Advistasari, 2019). Skrining fitokimia ini dengan memakai acuan dari Abriyani *et al.*, 2021 yang mencakup pengujian sebagai berikut:

1. Uji Kandungan Flavonoid

Larutan ekstrak daun kangkung pagar hasil pemanasan dengan aquadest dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan serbuk magnesium dan 0,5 ml HCl. Setelah dikocok dengan kuat, munculnya warna merah, jingga, atau kuning menunjukkan hasil positif untuk flavonoid.

2. Uji Kandungan Alkaloid

Ekstrak daun kangkung pagar sebanyak 1 ml masukkan kedalam tabung reaksi kemudian tambahkan 2 ml HCl 2N, filtrat pada ekstrak daun kangkung pagar tambahkan sebanyak 2 tetes larutan dragendrof, setelah itu panaskan selama 5 menit, amati hasil sampai larutan berwarna jingga.

3. Uji Kandungan Saponin

Ekstrak daun kangkung pagar sebanyak 1 mL, larutan dipanaskan dan hasil pemanasan dengan aquadest dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu

dikocok dengan kuat selama 10 detik. Jika terbentuk busa setinggi 1 cm yang bertahan selama 1 menit dan tidak hilang setelah ditambahkan 1 tetes HCl encer, maka menunjukkan hasil positif untuk kandungan saponin.

4. Uji Kandungan Tanin

Pengujian kandungan tanin dilakukan dengan memasukkan larutan hasil pemanasan dengan aquadest ke dalam tabung reaksi, kemudian menambahkan larutan gelatin 1%. Munculnya warna kuning jernih atau endapan putih menunjukkan hasil positif untuk tanin.

5. Uji Kandungan Steroid dan Triterpenoid

Ekstrak daun kangkung pagar dan larutannya diuapkan dan kemudian ditambahkan pereaksi Liebermann-Burchard. Jika muncul warna ungu, ini menunjukkan hasil positif untuk triterpenoid, sedangkan warna biru- hijau menunjukkan hasil positif untuk steroid.

3.4.5 Pembuatan Aktivitas Antijamur

1. Pembuatan Media Jamur

Potato Dextrose Agar (PDA) ditimbang dan dicampurkan dengan 20 ml air di dalam Erlenmeyer, lalu dipanaskan di atas hot plate hingga larut sepenuhnya dan larutan terlihat jernih. Setelah itu, larutan disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah selesai, larutan dituangkan ke dalam cawan petri dan kemudian didinginkan pada suhu ruangan atau di dalam Laminar Air Flow (Fikayuniar *et al.*, 2022).

2. Media Peremajaan Jamur

Sebanyak 1-2 ose koloni jamur diambil dari biakan murni yang sudah disiapkan menggunakan jarum ose secara aseptis, kemudian jamur tersebut digoreskan pada media agar miring dan diinkubasi di dalam inkubator selama 24 jam pada suhu 20°C (Fikayuniar *et al.*, 2022).

3. Pembuatan Suspensi Jamur

Pembuatan suspensi jamur *Candida albicans* dilakukan dengan mengambil 2-3 ujung ose koloni jamur *Candida albicans*, kemudian dimasukkan ke dalam 10 ml larutan NaCl steril. Suspensi tersebut dihomogenkan, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C, setelah itu sampai mendapat kekeruhan yang sesuai standar kekeruhan larutan 0,5 Mc. Farland.

4. Pengujian Aktivitas Antijamur

Media dasar PDA dituang ke dalam cawan petri dan dibiarkan mengeras. Pada permukaan lapisan dasar diletakkan 6 pencadang dan diatur sedemikian rupa sehingga terdapat daerah yang baik untuk mengamati zona hambat yang terjadi, setelah itu PDA yang mengandung suspensi jamur uji dituang ke dalam cawan petri di sekeliling pencadang, kemudian dikeluarkan pencadang dari cawan petri sehingga terbentuk sumur yang akan digunakan untuk larutan uji, larutan kontrol positif (+) dan larutan kontrol negatif (-), diteteskan larutan uji ekstrak sampel etanol, larutan kontrol positif (+) dan larutan kontrol negatif (-), kemudian dilakukan pengulangan secara triplo dengan cara yang sama, diinkubasikan dalam inkubator pada suhu 37°C selama 1x24 jam. Amati zona hambat yang terjadi di sekitar sumuran kemudian diukur diameter zona hambat secara horizontal dan vertikal dengan menggunakan jangka sorong berskala (Rahma Putri *et al.*, 2022).

3.4.6 Karakterisasi LC-MS (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometer*)

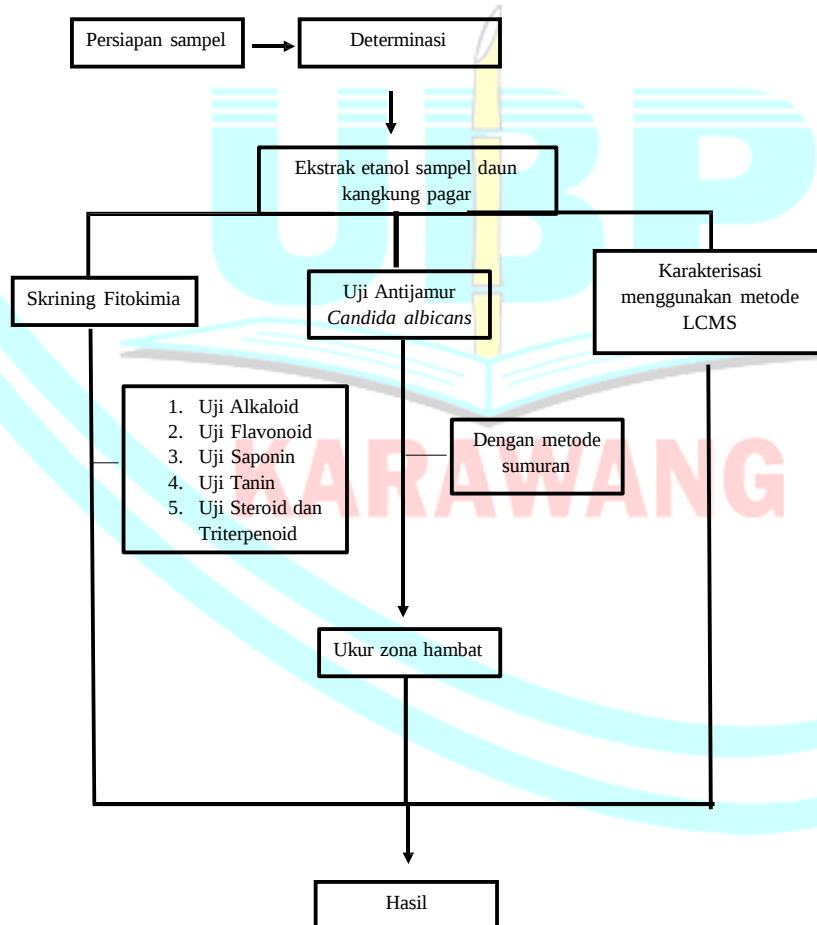
Teknik ini bekerja dengan memisahkan dan mendeteksi senyawa-senyawa dalam daun kangkung pagar berdasarkan berat molekulnya, sehingga senyawa aktif dapat diidentifikasi secara spesifik kemudian proses ini memanfaatkan fase gerak yang terdiri dari 90% metanol dengan air, serta fase diam menggunakan kolom Shimadzu Shim Pack FCODS (2 mm x 150 mm, 3 µm), laju aliran fase gerak diatur sebesar 0,5 ml per menit, dengan durasi analisis selama 60 menit pada suhu kapiler 350°C. Rentang pada mode

pemindaian penuh adalah 10 hingga 1000, dengan waktu pemindaian 0,6 detik per scan (Mangurana *et al.*, 2019).

3.5 Analisis Data

Analisis data aktivitas antijamur dilakukan dengan mengukur pada daerah zona hambat menggunakan jangka sorong pada masing-masing konsentrasi, kemudian analisis statistik menggunakan *Analysis of Variance* (ANOVA) untuk melihat perbedaan rata-rata dari kelompok penelitian.

3.6 Diagram Alir Penelitian



Gambar 3.1 Diagram Alir Penelitian