

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan merupakan penelitian eksperimental dengan metode kualitatif. Dengan pengujian karakterisasi metabolit sekunder pada ekstrak etil asetat daun kangkung pagar (*Ipomoea carnea* Jacq.) menggunakan metode LC-MS dan pengujian aktivitas antijamur dari ekstrak etil asetat daun kangkung pagar (*Ipomoea carnea* Jacq.) terhadap jamur *Trichophyton rubrum*. Pengujian dilakukan dengan beberapa tahapan yaitu dimulai dari penyiapan sampel, proses determinasi, proses ekstraksi simplisia, skrining fitokimia pada ekstrak etil asetat daun kangkung pagar, lalu dilakukan karakterisasi metabolit sekunder pada ekstrak etil asetat daun kangkung pagar (*Ipomoea carnea* Jacq.) menggunakan metode LC-MS dan selanjutnya pengujian aktivitas antijamur dari ekstrak etil asetat daun kangkung pagar (*Ipomoea carnea* Jacq.) terhadap jamur *Trichophyton rubrum*. Pengukuran hasil karakterisasi menggunakan metode LC-MS didapatkan hasil berupa nilai bobot molekul pada senyawa kimia daun kangkung pagar (*Ipomoea carnea* Jacq.).

3.2 Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak etil asetat daun kangkung pagar (*Ipomoea carnea* Jacq.) yang didapatkan dari Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat Balitro Instansi Penelitian dan Pengembangan Teknologi Pertanian Kabupaten Bogor dan Jamur *Trichophyton rubrum* didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Indonesia.

3.3 Alat dan Bahan yang Digunakan

3.3.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat-alat gelas (pyrex) dalam laboratorium kimia, timbangan analitik digital (Shimadzu), cawan petri (Onemed), cawan penguap (Onemed), aluminium foil (Best fresh), vacuum rotary evaporator (Eyela osb-2100), oven (Gemmyco yco-no1), rak & tabung reaksi (Iwaki), botol kaca coklat (Amber), alat analisis LC-MS (LC-MS-8040), autoklaf (Gea), hot plate (Thermo), *laminar air flow* (Fume hood), jarum ose (Iwaki), incubator (B-One), mikropipet (Iwaki), label.

3.3.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah simplisia daun kangkung pagar 1 Kg, ekstrak daun kangkung pagar, pelarut etil asetat (Supelco), pereaksi Liebermann–Burchard, pereaksi dragendorff, pereaksi mayer, H_2SO_4 , HCl 2N, HCL pekat, serbuk logam magnesium, $FeCl_3$ 1%, *Potato Dextrose Agar/PDA* (Agavi Lab), NaCl 0,9%, DMSO 10% (Merck), Ketoconazole serbuk, biakan jamur *Trichophyton rubrum*, aquadest.

3.4 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia Farmasi Universitas Buana Perjuangan Karawang pada bulan Februari sampai Juni tahun 2025.

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Determinasi

Tanaman kangkung pagar dideterminasi terlebih dahulu di Laboratorium Universitas Padjajaran untuk mengetahui jenis tumbuhan yang digunakan dengan benar dan jelas. Determinasi pada tanaman uji bertujuan untuk memvalidasi tanaman yang akan digunakan dalam penelitian.

3.5.2 Ekstraksi

Pembuatan ekstraksi daun kangkung pagar dilakukan dengan metode maserasi, dilakukan penimbangan pada simplisia lalu dilarutkan dengan pelarut etil asetat dengan menggunakan maserator. Pertama-tama pelarut etil asetat dituangkan kedalam maserator secara perlahan, kemudian biarkan cairan penyari merendam serbuk simplisia lalu diaduk sesekali. Selanjutnya lakukan remaserasi selama 4-5 hari atau lebih, kemudian hasil filtratnya diambil dan dimasukan kedalam wadah baru hingga diperoleh ekstrak cair. Hasil filtrat ekstrak cair tersebut kemudian dipekatkan menggunakan alat yaitu *Rotary evaporator* sampai menghasilkan ekstrak kental.

3.5.3 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia pada daun kangkung pagar bertujuan untuk mengetahui kandungan senyawa tertentu dalam daunnya. Skrining fitokimia merupakan tahap awal yang dilakukan untuk menentukan senyawa aktif yang terkandung dalam tanaman. Skrining fitokimia pada daun kangkung pagar

dapat dilakukan dengan metode kualitatif, yaitu dengan melihat reaksi warna dan terbentuknya endapan. Uji fitokimia yang dilakukan pada daun kangkung pagar meliputi Uji flavonoid, Uji tannin, Uji alkaloid, Uji steroid, Uji saponin dan uji polifenol. Metode ini mengacu pada pengujian yang dirujuk dari penelitian Wijaya *et al.* (2014) dan Abriyani *et al.* (2024) dengan tahapan skrining fitokimia sebagai berikut :

1. Uji Alkaloid

Sedikit ekstrak daun kangkung pagar (*Ipomoea carnea* Jacq.) diencerkan menggunakan sejumlah kecil aquadest, kemudian dibagi menjadi dua bagian. Tabung reaksi pertama ditambahkan 3 tetes pereaksi Mayer. Jika terbentuk endapan putih, hal ini menunjukkan adanya kandungan alkaloid. Untuk tabung reaksi kedua, ditambahkan 3 tetes pereaksi Dragendorff. Jika terdapat endapan putih atau coklat maka sampel positif mengandung alkaloid.

2. Uji Flavonoid

Untuk mendeteksi flavonoid, ekstrak daun kangkung pagar (*Ipomoea carnea* Jacq.) diambil sedikit, kemudian dilarutkan dengan 5 mL air panas. Lakukan penyaringan, setelah disaring larutan diberi 5 tetes HCl pekat dan ditambahkan serbuk logam magnesium. Jika larutan menunjukkan warna kuning, merah, atau jingga, hal ini menunjukkan adanya flavonoid dalam serbuk simplisia tanaman obat.

3. Uji Steroid dan Terpenoid

Ekstrak daun kangkung pagar (*Ipomoea carnea* Jacq.) diambil secukupnya, lalu diencerkan dengan eter dan ditambahkan pereaksi Liebermann-Burchard. Jika larutan menghasilkan warna ungu, maka hal ini menunjukkan keberadaan terpenoid, sedangkan warna biru-hijau menandakan adanya kandungan steroid.

4. Uji Saponin

Ekstrak daun kangkung pagar (*Ipomoea carnea* Jacq.) diambil dalam jumlah kecil, lalu dilarutkan dengan 5 mL air panas dan dikocok kuat

selama 10-15 detik. Jika terdapat busa tambahkan HCl 2N 1 tetes, lalu berbentuk busa kembali maka terdapat saponin pada ekstrak tersebut.

5. Uji Tanin dan Polifenol

Sampel ekstrak diencerkan kemudian hasil ekstrak tersebut ditetesi 2-3 tetes larutan FeCl_3 1% lalu diamati. Jika menghasilkan warna biru kehijauan maka menunjukkan adanya tanin dalam sampel dan jika berwarna hijau kekuningan maka menunjukkan adanya fenolik dalam sampel.

3.5.4 Karakterisasi Metode *Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy* (LC-MS)

Penelitian ini menggunakan metode uji kuantitatif LC-MS (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometer*) untuk mengukur kadar senyawa aktif dalam ekstrak etil asetat daun kangkung pagar (*Ipomoea carnea* Jacq.). Prinsip kerja metode ini adalah memisahkan serta mendeteksi senyawa yang terkandung dalam ekstrak tersebut berdasarkan perbedaan berat molekulnya dari senyawa lain. Metode ini mengacu pada pengujian yang dirujuk dari penelitian Fatimah *et al.*, (2020) dan Pathiassana *et al.*, (2020), dengan analisis senyawa menggunakan metode LC-MS dilakukan melalui beberapa tahapan, yaitu :

1. Pengenceran Sampel

Ekstrak etil asetat daun kangkung pagar (*Ipomoea carnea* Jacq.) dilarutkan dalam 10 ml metanol pro analisis untuk mencapai konsentrasi 100 ppm dengan rasio sampel 1:10. Larutan tersebut kemudian disaring menggunakan saringan Milipore berukuran 0,22 mikron, dilanjutkan dengan proses *degassing* untuk menghilangkan gas-gas dalam sampel.

2. Analisis LC-MS

Analisis dilakukan di Laboratorium Universitas Airlangga menggunakan alat *Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy* (LC-MS). Sebanyak 1 μl larutan diambil dan dimasukkan ke dalam vial 2 ml, kemudian diinjeksikan ke dalam sistem LC-MS-8040. Fase gerak yang digunakan terdiri dari *metanol*, *asetonitril*, dan air dengan perbandingan

40:15:45 (v/v/v). Laju aliran fase gerak adalah 0,5 ml/menit, dengan waktu analisis selama 60 menit, suhu kapiler 350°C, dan gas pengabut pada 60 ml/jam dengan tegangan sumber 5,0 V. Fase diam yang digunakan adalah kolom Shimadzu Shim Pack FC-ODS (2 mm x 150 mm, 3µm) dengan mode ionisasi positif. Rentang m/z full scan adalah 10-1000.

3.5.5 Aktivitas Antijamur *Trichophyton rubrum*

Prosedur pengujian aktivitas antijamur dilakukan dengan beberapa tahap, metode ini mengacu pada pengujian yang dirujuk dari penelitian Fikayuniar, *et al.*, (2022) dengan tahapan pengujian aktivitas antijamur sebagai berikut :

1. Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan sebelumnya dicuci sampai bersih lalu dikeringkan. Alat-alat tersebut dibungkus menggunakan kertas coklat kemudian disterilkan di dalam autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit.

Adapun prosedur sterilisasi media atau bahan dalam penelitian ini yaitu dibungkus media yang telah dibuat menggunakan kertas, dimasukan kedalam autoklaf, ditutup rapat autoklaf lalu dikunci rapat, disambungkan pada stok kontak ditunggu hingga mencapai suhu 121°C selama 15 menit.

2. Pembuatan Media Agar Jamur

Potato Dextrose Agar (PDA) ditimbang sebanyak 6,86 gram dalam 176 mL aquadest pada erlenmeyer, lalu panaskan di atas hot plate sampai larutan berwarna keruh, lalu di sterilisasi di dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah itu, dimasukan kedalam cawan petri sebanyak 15 mL dan dinginkan pada suhu ruangan/masukan kedalam *Laminar Air Flow*.

3. Penyiapan Jamur Uji

Tahapan penyiapan uji aktivitas antijamur meliputi :

a) Peremajaan Jamur

Peremajaan jamur uji digunakan untuk merawat jamur agar tetap dalam kondisi baik. Media yang digunakan adalah *Potato Dextrose Agar* (PDA) dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 10 ml. Caranya dengan mengambil 1 ose jamur *Trichopyton rubrum* menggunakan jarum ose steril pada permukaan agar miring. Jamur yang sudah digoreskan pada media kemudian diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C dalam inkubator.

b) Pembuatan Suspensi Jamur

Pembuatan suspensi jamur dengan mengambil biakan jamur *Trichopyton rubrum* 1 Ose menggunakan Ose steril disuspensikan kedalam tabung reaksi yang berisi 10 ml NaCl 0,9%.

c) Pembuatan Larutan Uji

Pembuatan larutan uji dibuat dengan mengencerkan ekstrak menggunakan DMSO 10%. Konsentrasi ekstrak yang digunakan yaitu 100% (b/v), 50% (b/v), 25% (b/v) dan 12,5% (b/v). Larutan uji ekstrak disusun menggunakan teknik pengenceran bertingkat. Pada vial pertama, ditimbang ekstrak sebanyak 2 gr tanpa tambahan pelarut sehingga merepresentasikan konsentrasi 100%. Vial kedua hingga vial keenam masing-masing diberi 1 mL larutan DMSO 10%. Untuk memperoleh konsentrasi 50% pada vial kedua, dimasukkan 1 gr ekstrak ke dalam 1 mL DMSO 10%. Proses dilanjutkan dengan pengenceran bertingkat, yaitu memindahkan 1 mL larutan dari vial 2 ke vial 3 untuk menghasilkan konsentrasi 25%, lalu mengambil 1 mL dari vial 3 ke vial 4 sehingga diperoleh konsentrasi 12,5%.

d) Pembuatan Larutan Kontrol

Pembuatan larutan kontrol positif yang digunakan pada penelitian ini adalah ketokonazol serbuk. Pembuatan larutan kontrol negatif yang digunakan pada penelitian ini adalah DMSO 10%. *Dimetil sulfoxide* (DMSO) digunakan sebagai kontrol negatif karena untuk membuktikan bahwa pelarut ini tidak mempunyai aktivitas antijamur terhadap larutan uji (Suryaku, 2017).

e) Pengujian Aktivitas Antijamur

Penentuan aktivitas antijamur *Trichophyton rubrum* dilakukan dengan menggunakan metode sumuran. Metode ini dilakukan dengan prosedur yaitu 2 cawan petri ditambahkan sebanyak 15 ml media PDA (*Potatoes Dextrosa Agar*) cair dituangkan masing-masing ke dalam cawan petri, setelah media memadat ditambahkan 1 ml suspensi jamur *Trichophyton rubrum*, dituangkan masing-masing ke dalam cawan petri lalu diratakan. Selanjutnya metode sumuran dilakukan dengan membuat lubang yang dibuat tegak lurus pada agar padat yang telah diinokulasikan dengan bakteri uji. Jumlah dan letak lubang disesuaikan dengan konsentrasinya dimana konsentrasi yang digunakan yaitu 12,5%, 25%, 50% dan 100%, serta DMSO 10% sebagai kontrol negatif dan ketoconazole serbuk sebagai kontrol positif. Kemudian masing-masing lubang diisi dengan sampel uji. Lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 3 x 24 jam.

f) Penentuan Zona Hambat

Pertumbuhan jamur diamati untuk melihat ada tidaknya daerah hambatan di sekeliling lubang. Daerah hambatan ditandai dengan zona bening, selanjutnya, daerah bening tersebut diukur menggunakan jangka sorong. Setelah didapatkan diameter zona hambat masing-masing percobaan, kemudian nilai yang didapatkan dirata-ratakan sehingga diperoleh diameter zona hambat pada masing-masing konsentrasi fraksi (Hidayati *et al.*, 2021).

Pengukuran zona hambat yang terbentuk diukur diameternya menggunakan alat ukur yaitu jangka sorong berskala dan diperoleh diameter (mm) daerah hambat pertumbuhan jamur. Dilakukan pengukuran untuk menunjukkan hasil yang akurat (Hidayati *et al.*, 2021).

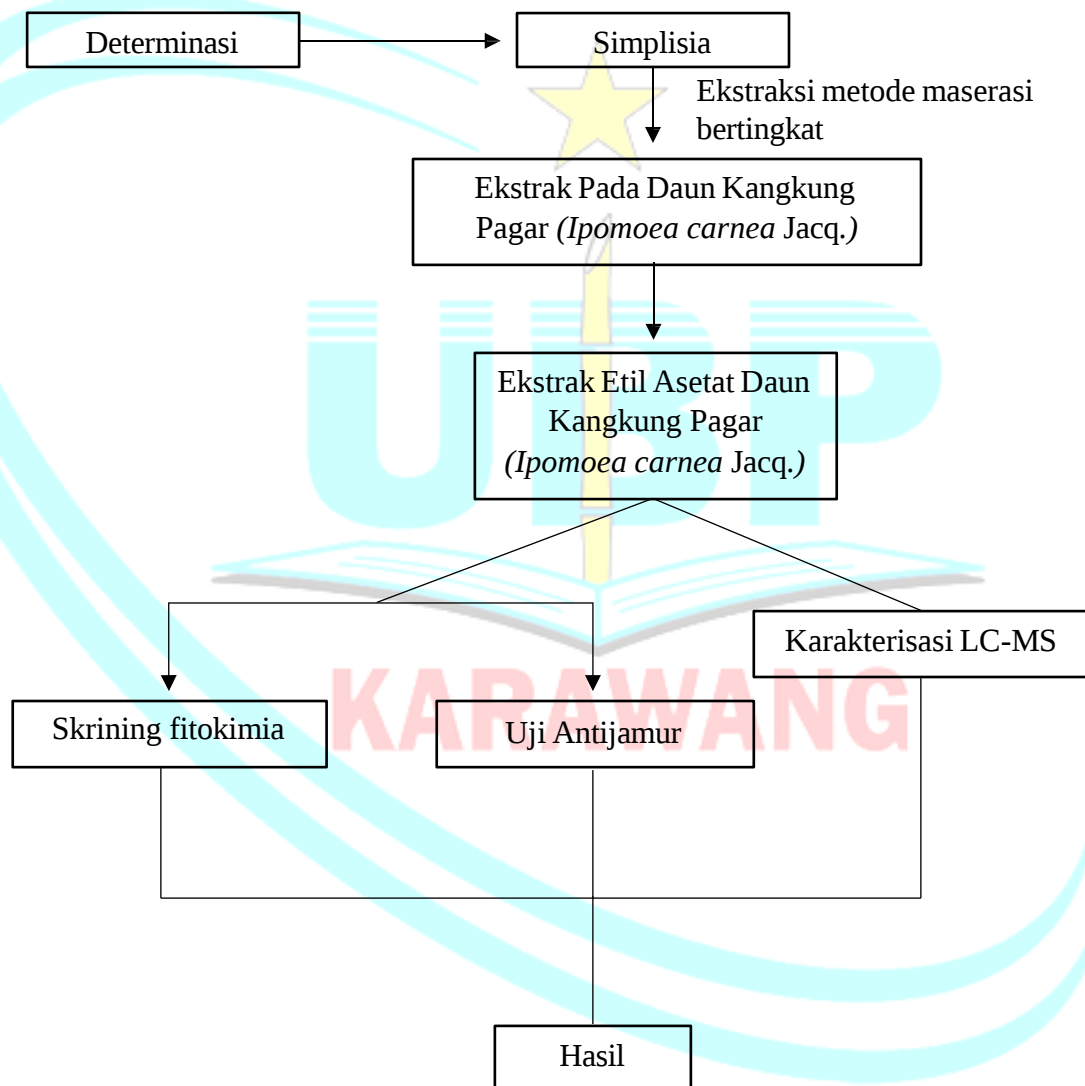
Nilai diameter zona hambat dianalisis berdasarkan kategori respon hambat yaitu :

Lemah : < 5 mm

Sedang : 6-10 mm
 Kuat : 11-20 mm
 Sangat kuat : >20 mm (CLSI, 2014).

3.6 Diagram Alir Penelitian

Berikut merupakan diagram alir penelitian Karakterisasi LC-MS Dan Uji Antijamur *Trichophyton rubrum* Dengan Ekstrak Etil Asetat Pada Daun Kangkung Pagar (*Ipomoea carnea* Jacq.) sebagai berikut :



Gambar 3.1 Diagram Alir Penelitian