

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental untuk mengetahui aktifitas jamur *Candida albicans*. Metode ekstraksi yang digunakan ialah metode ekstraksi maserasi dengan pelarut n-Heksan. Konsentrasi yang digunakan diantaranya konsentrasi 70%, 80% dan 90%. Pengujian antifungi dilakukan secara invitro dengan metode difusi cakram.

4.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ekstraksi dan skrining fitokimia dilaksanakan di Laboratorium Sintesis. Sterilisasi alat dan uji antifungi dengan metode difusi cakram dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya pada bulan Januari 2024.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel bebas

Variabel bebas dari penelitian ini adalah komponen senyawa kimia yang terkandung dalam ekstrak n-Heksan. Daun mahoni (*Swietenia mahagoni* L.) dengan konsentrasi yaitu konsentrasi 70%, 80% dan 90%.

4.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dari penelitian ini adalah diameter zona hambat yang dihasilkan oleh senyawa uji yang ditandai dengan adanya daerah bening disekitar lempeng cakram. Daerah bening ini digunakan sebagai parameter untuk menentukan hambatan minimum senyawa dari ekstrak n-Heksan dengan konsentrasi 70%, 80% dan 90%.

4.4 Alat Penelitian

4.4.1 Alat Pembuatan Serbuk Simplisia

- 1) Mesin penggiling (Blender)
- 2) Pengayak mesh 60

- 3) Timbangan analitik
- 4) Oven (BINDER)

4.4.2 Alat Ekstraksi

- 1) Timbangan analitik balance
- 2) Gelas ukur
- 3) Gelas piala 1000 ml (Pyrex Iwaki TE_32)
- 4) Bejana
- 5) Cawan Porselen Ø 10 cm
- 6) Penyaring *Buchner* 100 mm
- 7) Batang pengaduk
- 8) Oven (BINDER)
- 9) Pipet tetes
- 10) Sudip besi 20 cm
- 11) Erlenmeyer 1000 ml
- 12) *Rotary evaporator vacuum* (Buchi R-215)

4.4.3 Alat Identifikasi Senyawa dengan KLT

- 1) Cawan porselen
- 2) *Chamber*
- 3) Lempeng KLT
- 4) Lempeng panas
- 5) Penyemprot noda
- 6) Pinset
- 7) Pipa kapiler 5µl
- 8) Sinar UV
- 9) Timbangan analitik

4.4.4 Alat Pengujian Difusi Cakram

- 1) Inkubator
- 2) Autoklaf
- 3) Mikro pipet
- 4) *Laminar Air Flow*
- 5) Tabung reaksi

- 6) *Hot plate*
- 7) Bunsen
- 8) Pipet volume
- 9) Kertas saring
- 10) Erlenmeyer
- 11) Penjepit
- 12) Cawan petri
- 13) Kawat ose

4.5 Bahan Penelitian

4.5.1 Bahan Uji

Bahan tanaman uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah Daun mahoni (*Swietenia mahagoni* L.), yang didapatkan dari desa Kombangan, Kec. Geger, Kab. Bangkalan, Madura dan telah diserbukkan oleh UPT. Balai Materia Medika Batu, Dinas Kesehatan, Pemerintahan Provinsi Jawa Timur. Penelitian ini mengambil sampel berupa daun mahoni (*Swietenia mahagoni* L.) segar dengan warna hijau yang kemudian dikeringkan. Determinasi tanaman diperoleh dari Materia Medica Batu, Dinas Kesehatan, Pemerintahan Provinsi Jawa Timur.

4.5.2 Sampel Jamur

Jamur yang akan diujikan dalam penelitian ini ialah jamur *Candida albicans* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Brawijaya.

4.5.3 Proses Ekstraksi

- 1) Pelarut n-Heksan teknis (Bratachem)
- 2) Daun mahoni (*Swietenia mahagoni* L.)

4.5.4 Identifikasi Senyawa dengan KLT

- 1) n-Heksan teknis (Bratachem)
- 2) Asam sulfat 10% (Mallinckrodt)
- 3) Larutan KOH 10% (MERCK)
- 4) FeCl₃ 1% (SAP)

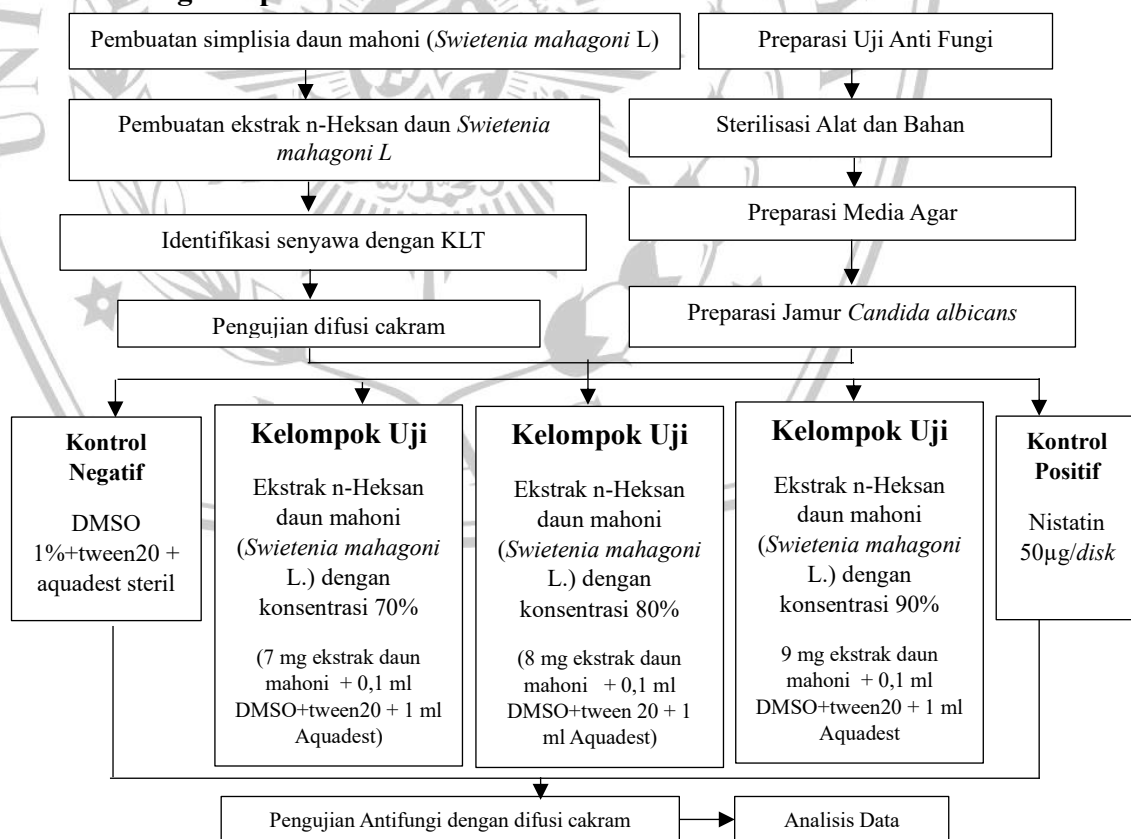
- 5) NaCl 10% (SAP)
- 6) Reagen Dragendorff
- 7) Reagen anisaldehyda-asam sulfat (Merck)
- 8) Lempeng KLT silika gel 60 F₂₅₄ (Merck)
- 9) Aseton (MERCK)
- 10) Kloroform (MERCK)

4.5.5 Bahan Pengujian Difusi Cakram

- 1) Ekstrak n-Heksan Daun mahoni (*Swietenia mahagoni L.*)
- 2) *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA)
- 3) Aqudest steril
- 4) Nistatin
- 5) Jamur *Candida albicans*
- 6) DMSO 1 %
- 7) Tween 20

4.6 Metode Penelitian

4.6.1 Kerangka Operasional



Gambar 4.1 Skema Kerangka Operasional

4.7 Prosedur Kerja

4.7.1 Sterilisasi

Pada penelitian ini semua alat yang dipakai dalam pengujian ini dibersihkan dengan hati-hati menggunakan deterjen dan dicuci dengan air suling untuk menghilangkan potensi cemaran mikroba. Alat-alat yang tahan pemanasan tinggi disterilkan dengan Autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C pada tekanan 2 atm. Sterilisasi alat logam dapat melalui pemanasan secara langsung dengan lampu spiritus sampai berpijar. Ada dua kategori utama sterilisasi yaitu kering dan basah. Sterilisasi kering diantaranya sterilisasi nyala api langsung serta sterilisasi pemanasan dengan oven. Sterilitas kering meliputi cara sterilisasi dengan api langsung dan cara sterilisasi dengan oven pemanas. Sterilisasi dengan api langsung atau pemijaran api bunsen yaitu melakukan pembakaran alat dengan api secara langsung, contoh jarum oase, pinset, spatel logam, mulut tabung biakan dan batang pengaduk. Sterilisasi dengan oven biasanya menggunakan suhu 160°C selama 1-2 jam atau 180°C selama 30 menit. Alat yang dilakukan sterilitas dengan oven antara lain alat gelas yang tidak mempunyai skala, cawan petri, tabung reaksi serta pipet. Sedangkan pada sterilisasi basah dilakukan dengan menggunakan autoklaf. Alat yang dapat dilakukan sterilisasi dengan cara basah antara lain labu erlenmeyer, gelas ukur dan pipet tetes. Media pertumbuhan bakteri yakni *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) yang juga disterilkan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

4.7.2 Preparasi Sampel Bahan Uji

Penelitian ini menggunakan daun mahoni (*Swietenia mahagoni* L.) sebagai sampel. Daun dibersihkan, ditiriskan dari air yang berlebih, kemudian diiris tipis-tipis, lalu ditimbang, dan dikeringkan. Proses pengeringan dikerjakan di suhu ruang disertai sirkulasi udara tetapi tidak dengan sinar matahari secara langsung. Setelah dikeringkan, daun digiling menjadi serbuk halus dengan

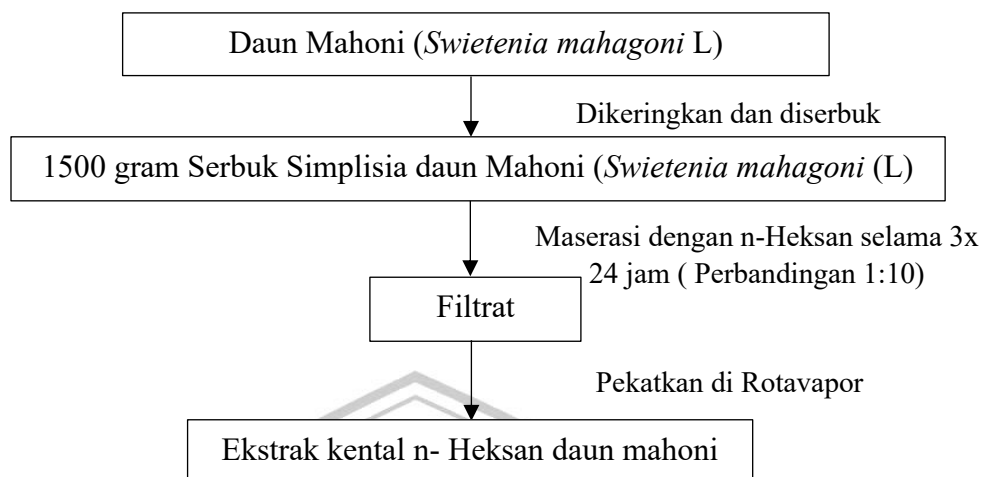
menggunakan mesin penggiling 43. Serbuk kemudian diayak menggunakan *Shieve Shaker* untuk mendapatkan tingkat kehalusan yang diinginkan. Kemudian dilakukan pengukuran MC untuk mengetahui kadar air yang masih terdapat dalam ekstrak dengan memasukkan 2 gram simplisia kering ke dalam alat *Moisture Analyzer*. Sampel dianalisis dengan menekan tombol enter pada alat sampai muncul hasil pembacaan dilakukan replikasi 3 kali hingga kadar air didapatkan, dengan syarat kadar air tidak lebih dari 10%.

4.7.3 Proses Ekstraksi Bahan Uji dengan Pelarut n-Heksan.

Pada proses ekstraksi yang dilakukan menggunakan metode maserasi perendaman 3 hari. Ekstraksi dilakukan menggunakan pelarut n-Heksan.

Ekstraksi yang dilakukan dalam pembuatan ekstraknya digunakan serbuk daun mahoni (*Swietenia mahagoni* L.) dengan total sebanyak 1,5 kilogram yang diekstraksi dengan pelarut n-Heksan menggunakan metode maserasi perendaman. Tujuan pemilihan pelarut ini adalah untuk memisahkan senyawa polar maupun non polar yang terdapat pada daun mahoni (*Swietenia mahagoni* L.).

Serbuk 1500 gram dimasukkan ke dalam bejana, ditambah dengan pelarut n- Heksan sebanyak 15 Liter (perbandingan (1:10). Kemudian dibiarkan selama 3 hari, Setelah itu, disaring filtrat dengan penyaringan *Buchner* dengan bantuan pompa vakum. Selanjutnya, kumpulan filtrat dilakukan penguapan di *rotary evaporator* sampai didapat ekstrak n-heksana yang kental..



Gambar 4.2 Skema Ekstraksi (*Swietenia mahagoni L*)

4.7.4 Skrining fitokimia

a. Preparasi Larutan Uji

Timbang saksama lebih kurang ekstrak *Swietenia mahagoni L*. 100 mg ditambahkan 10 mL pelarut n-heksan, hasil tersebut disaring kemudian diambil filtrat, lalu masukkan ke dalam cawan.

b. Prosedur Kromatografi Lapis Tipis

Totolkan larutan uji dan larutan pembanding dengan jarak antara 1,5 sampai 2 cm dari tepi bawah lempeng, dan biarkan mengering. Tempatkan lempeng pada rak penyangga, hingga tempat penotolan terletak di sebelah bawah, dan masukkan rak ke dalam bejana kromatografi. Fase gerak dalam bejana harus mencapai tepi bawah lapisan penjerap, totolan jangan sampai terendam. Letakkan tutup bejana pada tempatnya dan biarkan fase gerak merambat sampai batas jarak rambat. Keluarkan lempeng dan keringkan di udara, dan amati bercak dengan sinar tampak, ultraviolet gelombang pendek (254 nm) kemudian dengan ultraviolet gelombang panjang (365 nm). Ukur dan catat jarak tiap bercak dari titik penotolan serta catat panjang gelombang untuk tiap bercak yang diamati. Tentukan harga R_f . Jika diperlukan, semprot bercak dengan pereaksi penampak bercak.

Berikut uji senyawa metabolit sekunder yang dilakukan.

1) Uji Alkaloida

Fase gerak : Toluena P : etil asetat P (7:3)
 Fase diam : Silika gel 60 F₂₅₄
 Penampak noda : Pereaksi dragendorff (noda berwarna jingga)

2) Uji Terpenoid dan Steroid

Fase gerak : n-Heksana P-etil Asetat P (9:1)
 Fase diam : Silika gel 60 F₂₅₄
 Penampak noda : Anisaldehid asam sulfat. Plat KLT dipanaskan pada suhu 100°C sampai timbul noda (noda berwarna merah ungu)

3) Uji Flavonoida

Fase gerak : Kloroform : Aseton : Asam Formiat (6:6:1 tetes)
 Fase diam : Silika gel 60 F₂₅₄
 Penampak noda : uap amonia atau asam sulfat 10% (noda berwarna kuning intensif)

4) Uji Polifenol dan Tanin

Fase gerak :Etil asetat P-metanol P-air (100:13,5:10)
 Fase diam :Silika gel 60 F₂₅₄
 Penampak noda :Pereaksi FeCl₃ 1% (noda berwarna hitam)

5) Uji Antraquinon

Fase gerak :Etil asetat P-metanol P-air (100:13,5:10)
 Fase diam :Silika gel 60 F₂₅₄
 Penampak noda :KOH (noda berwarna jingga/merah)

4.7.5 Pembuatan Konsentrasi Larutan Uji

Langkah-langkah pembuatan konsentrasi Larutan Uji :

1. Ditimbang ekstrak n-Heksan daun *Swietenia mahagoni* (L.) Jacq sebanyak 7 mg kemudian dilarutkan dalam 0,1 mL DMSO 1% + tween 20 , ditambahkan aquades ad 10 mL, sehingga diperoleh konsentrasi larutan uji ekstrak n-Heksan daun *Swietenia mahagoni* (L.) Jacq sebesar 70%.
2. Ditimbang ekstrak n-Heksan daun *Swietenia mahagoni* (L.) Jacq sebanyak 8 mg kemudian dilarutkan dalam 0,1 mL DMSO 1% + tween 20, ditambahkan aquades ad 10 mL, sehingga diperoleh konsentrasi larutan uji ekstrak n-Heksan daun *Swietenia mahagoni* (L.) Jacq sebesar 80%.
3. Ditimbang ekstrak n-Heksan daun *Swietenia mahagoni* (L.) Jacq sebanyak 9 mg kemudian dilarutkan dalam 0,1 mL DMSO 1% + tween 20, ditambahkan aquades ad 10 mL, sehingga diperoleh konsentrasi larutan uji ekstrak n-Heksan daun *Swietenia mahagoni* (L.) Jacq sebesar 90%.

4.7.6 Preparasi Media *Candida albicans*

Pada penelitian ini digunakan satu media yakni *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) untuk media pengujian aktivitas anti jamur dan dalam pembuatan suspensi mikroba menggunakan aquades steril dengan meremajakan jamur sehari sebelum penggunaan.

- a. Pembuatan Media *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA)
Pembuatan media *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) dilakukan dengan langkah-langkah sebagai berikut :
 1. Media *Sabouraud Dextrose Agar* dibuat dengan melarutkan bahan SDA (mycological peptone 10 gram, glukosa 40 gram, dan agar 15 gram) sebanyak 65 gram kedalam 1 L aquades pada gelas ukur dengan kapasitas 1 L.
 2. Dicampur dengan baik sampai didapatkan suspense yang homogen, lalu dipanaskan diatas *hot plate* sampai mendidih.

3. Dilakukan sterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121° C, dilakukan secara hati-hati untuk menghindari panas yang berlebih.
4. Dituang ke masing-masing cawan petri hingga membeku pada suhu kamar.

4.7.7 Pembuatan Standar Mc Farland

Larutan baku Mc Farland terdiri atas 2 komponen yaitu larutan BaCl₂ 1% dan H₂SO₄ 1%. Pembuatan standar Mc Farland dilakukan dengan cara :

1. Diambil larutan BaCl₂ 1% sebanyak 0,05 ml dengan menggunakan pipet volume lalu masukan kedalam labu ukur 10 ml.
2. Masukan larutan H₂SO₄ 1% ke dalam labu ukur sampai tanda batas. Campuran kedua larutan dalam tabung tersebut, kocok sampai homogen dan terbentuk larutan keruh. Nilai absorban larutan baku Mc Farland 0,5 ekuivalen dengan suspensi jamur *Candida albicans* yang konsentrasinya 1,4 x 10⁶ CFU/ml (Aviany and Pujiyanto, 2020)

4.7.8 Preparasi Jamur

Proses peremajaan jamur dilakukan dengan mengambil biakan murni yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang. Langkah pertama, diambil biakan murni sebanyak satu ose dan dicelupkan kedalam tabung sebanyak 3-4 kali yang berisi media Sabouraud Dextrose Agar (SDA). Kemudian diinkubasi dengan suhu 37°C selama 24 jam.

Larutan suspensi jamur dibuat dengan cara mengambil sebanyak 2-3 ose koloni jamur dari hasil peremajaan, dimasukkan kedalam tabung reaksi yang berisi 10 ml larutan NaCl 0,9%. Setelah itu, dihomogenkan dengan cara dikocok menggunakan vortex, kemudian kekeruhannya disamakan dengan standar Mc Farland.

Berdasarkan tabel 4.1, tingkat kekeruhan untuk spesies jamur *Candida albicans* yaitu $1,4 \times 10^6$ CFU/ml.

Tabel IV.1 Tabel Standar Kekeruhan menurut Mc. Farland untuk jamur (Guena *et al.*, 2010)

Species	CFU/ml ^b	Cells/Field
<i>T. Mucoides</i>	4.5×10^6	<1
<i>Rhodotorula spp.</i>	1.9×10^6	4-5
<i>C. Tropicalis</i>	3.3×10^6	5-6
<i>S. Cerevisiae</i>	1.2×10^6	<1
<i>C. Parapsilosis</i>	1.3×10^6	4-5
<i>C. glabrata</i>	4.3×10^6	>20
<i>C. albicans</i>	1.4×10^6	<1
<i>C. kefyra</i>	2.1×10^6	>10
<i>C. krusei</i>	3.1×10^6	2-3
<i>T. inkin</i>	1.4×10^6	<1

4.7.9 Preparasi Kontrol Positif

Pada penelitian ini menggunakan kontrol positif Nistatin dengan konsentrasi 0,05g/mL. Sediaan diambil 50 µl dengan mikropipet. *Disk* diletakkan diatas cawan petri kosong dan ditetesi dengan kontrol positif sesuai dengan yang dikehendaki. *Disk* yang telah berisi kontrol positif dikeringkan di dalam inkubator selama 10 menit. Dilakukan replikasi sebanyak tiga kali.

4.7.10 Pengujian Antijamur Dengan Difusi Cakram

Prosedur pengujian pada jamur *Candida albicans* secara difusi cakram dilakukan sebagai berikut :

1. Disiapkan vial yang telah berisi larutan uji dengan konsentrasi 70%; 80%; dan 90%.
2. Disiapkan isolat jamur yang didapat dari laboratorium mikrobiologi Universitas Brawijaya.
3. Jamur yang telah dipreparasi diambil dengan cara mencelupkan kapas lidi steril satu kali, lalu diletakkan pada

tepi tabung reaksi, kemudian kapas lidi steril tersebut diputar agar jamur yang akan dioleskan tidak terlalu banyak. Setelah itu dioleskan pada *Sabouraud Dextrose Agar* dan diratakan.

4. Media *Sabouraud Dextrose Agar* yang diinokulasi dengan *Candida albicans* dibiarkan mengering selama 5 menit. Tiga cakram kertas saring berukuran 6 mm diaplikasikan pada media, masing-masing satu cakram berisi sampel uji, kontrol positif (nistatin), dan kontrol negatif (1% DMSO + tween 20). Cakram ditempatkan pada media yang telah diinokulasi dengan memastikan jarak 2,5 cm antara setiap cakram dan 1,5 cm dari tepi piring. Dengan menggunakan pinset, cakram kertas saring ditekan secara perlahan ke permukaan plate untuk memastikan kontak yang baik antara cakram dan agar. Jarak antar cakram sengaja diatur agar terpisah secara memadai untuk mencegah tumpang tindih atau interaksi antar sampel.
5. Selanjutnya semua media *Sabouraud Dextrose Agar* diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam.
6. Pengujian senyawa antijamur dilakukan dengan pengamatan yang dilakukan setiap 24 jam dengan melihat adanya zona (area) jernih disekitar *Disk* kertas saring. Zona (area) hambatan yang terbentuk diukur dengan jangka sorong dalam satuan millimeter (mm).
7. Dilakukan replikasi sebanyak tiga kali

4.7.11 Analisis Data

Analisis data dilakukan melalui pengamatan secara deskriptif pada pengukuran diameter zona hambat yang nampak pada area dengan warna bening yang terdapat di berbagai konsentrasi dari Heksan daun *Swietenia mahagoni* (L.) Jacq terhadap Jamur *Candida albicans*.

