

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini menggunakan metodologi desain eksperimental. Metode ekstraksi yang digunakan adalah metode maserasi. Dan untuk pengujian antijamur menggunakan metode difusi cakram yang dilakukan secara *in vitro*.

4.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya pada bulan Januari 2024.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

Pada penelitian ini variabel bebas yang digunakan adalah ekstrak n-Heksan daun mahoni (*Swietenia mahagoni* L) dengan konsentrasi 5%, 25% dan 50%.

4.3.2 Variabel Terikat

Penelitian ini menggunakan diameter zona hambat sebagai variabel terikat. Zona hambat ditandai dengan adanya daerah bening di sekitar lempeng cakram yang dihasilkan dari senyawa ekstrak n-Heksan daun mahoni (*Swietenia mahagoni* L) dengan konsentrasi 5%, 25% dan 50%.

4.4 Instrumen penelitian

4.4.1 Pembuatan Serbuk Simplisia

1. Mesin penggiling (Blender)
2. Pengayak *mesh* 60
3. Timbangan analitik Scout Pro
4. Oven (BINDER)

4.4.2 Proses Ekstraksi

1. Timbangan analitik Scout Pro
2. Gelas ukur
3. Gelas piala 1000 mL (Pyrex)

4. Desikator
5. Cawan porselen 10 cm
6. Penyaring *Buchner* 100 mm
7. Oven (BINDER)
8. Pipet tetes
9. Batang pengaduk
10. Sudip
11. Erlenmeyer 1000 mL
12. *Rotary evaporator vacuum* (Buchi R-215)

4.4.3 Pengujian Difusi Cakram

1. *Autoclave*
2. Inkubator
3. Mikro pipet
4. *Laminar Air Flow*
5. Tabung reaksi
6. *Hot plate*
7. Bunsen
8. Pipet volume
9. Kertas saring
10. Kertas cakram
11. Erlenmeyer
12. Penjepit kayu
13. Cawan petri
14. Kawat ose

4.4.4 Identifikasi Senyawa dengan KLT

1. *Chamber*
2. Plat KLT
3. Lempeng panas
4. Penyemprot noda
5. Pinset
6. Cawan porselen
7. Pipa kapiler 5 μ l

8. Sinar UV 254 nm dan 365 nm
9. Timbangan analitik Scout Pro

4.5 Bahan Penelitian

4.5.1 Bahan Uji

Pada penelitian ini, bahan tanaman uji yang digunakan ialah daun mahoni (*Swietenia mahagoni* L.) yang diperoleh dari Desa Kombangan, Kec. Geger, Kab. Bangkalan, Madura. Daun-daun tersebut telah dibuat serbuk oleh UPT. Balai Materia Medika Batu. Penelitian ini mengambil sampel daun mahoni (*Swietenia mahagoni* L.) segar dengan warna hijau yang kemudian dikeringkan. Mikroba uji yang digunakan adalah jamur *Candida albicans* yang didapatkan dari Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Malang.

4.5.2 Proses Ekstraksi

1. Serbuk herba daun mahoni (*Swietenia mahagoni* L.)
2. n-Heksan teknis (Bratachem)

4.5.3 Identifikasi Senyawa dengan KLT

1. n-Heksan teknis (Bratachem)
2. Asam sulfat 10% (Mallinckrodt)
3. Larutan KOH 10% (Merck)
4. FeCl_3 1% (SAP)
5. NaCl 10% (SAP)
6. Reagen Dragendorff
7. Reagen anisaldehyd-asam sulfat (Merck)
8. Lempeng KLT silika gel 60 F₂₅₄ (Merck)
9. Aseton (Merck)
10. Kloroform (Merck)

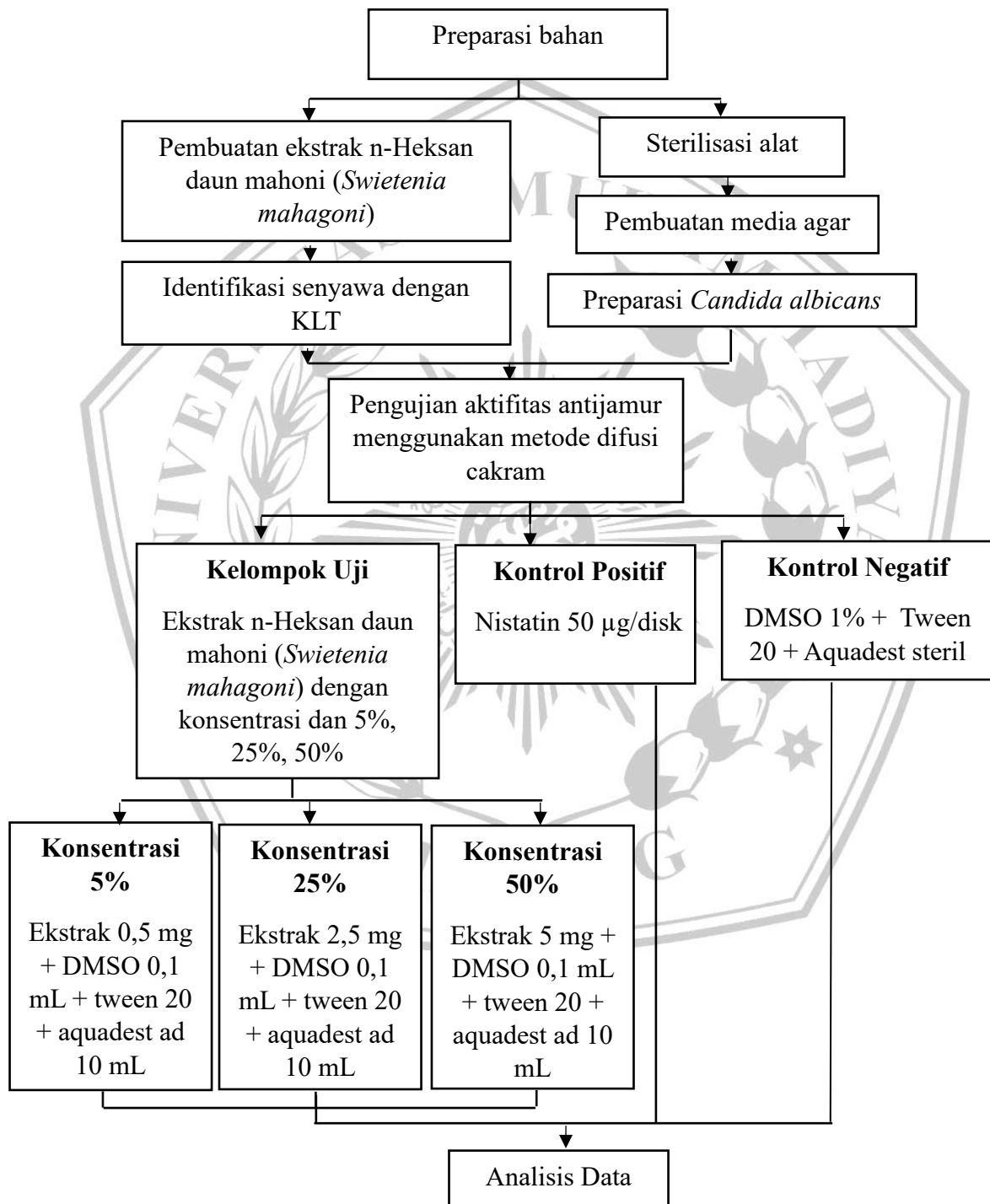
4.5.4 Pengujian Difusi Cakram

1. Ekstrak n-Heksan daun mahoni (*Swietenia mahagoni* L.)
2. Jamur *Candida albicans*
3. Nistatin
4. *Saboraud Dextrose Agar* (SDA)

5. Aquadest
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 Penyiapan Sterilisasi Alat

Sebelum digunakan, semua alat menjalani sterilisasi terlebih dahulu. Terdapat dua kategori proses sterilisasi: sterilisasi kering dan sterilisasi basah. Sterilisasi kering meliputi cara sterilisasi dengan api langsung dan cara sterilisasi dengan pemanas oven. Sterilisasi dengan api langsung dilakukan terhadap peralatan seperti jarum ose, pinset, spatel, mulut tabung biakan dan batang pengaduk. Sedangkan sterilisasi pemanasan dengan oven, digunakan untuk peralatan gelas yang tidak berskala, seperti cawan petri, tabung reaksi dan pipet. Alat-alat yang disterilkan dimasukkan ke dalam oven setelah suhu mencapai 160°C selama 1-2 jam.

Sterilisasi basah dilakukan dengan menggunakan autoklaf. Peralatan yang disterilkan dengan sterilisasi basah diantaranya gelas ukur, erlenmeyer dan pipet tetes. Proses sterilisasi ini dilakukan pada suhu 121°C selama 15 menit.

4.7.2 Preparasi Sampel

Sampel yang diteliti adalah daun mahoni (*Swietenia mahagoni* L.). Daun dibersihkan, ditiriskan, diiris tipis-tipis dan ditimbang, lalu dikeringkan. Pengeringan dilakukan pada suhu ruang dengan cara diangin-anginkan tanpa terpapar sinar matahari langsung. Setelah kering daun dihaluskan menggunakan mesin penggiling 43, sehingga didapatkan serbuk halus. Kemudian serbuk diayak menggunakan *Shieve Shaker* dengan derajat kehalusan tertentu. Setelah itu, dilakukan pengujian kadar air untuk mengukur jumlah air yang masih terdapat dalam simplisia. Untuk menentukan kadar air dari sampel simplisia, dimasukkan sebanyak 2 gram simplisia kering ke dalam alat *moisture analyzer*, lalu ditekan tombol enter pada alat hingga berbunyi. Ulangi proses ini sebanyak tiga kali pada sampel yang sama hingga didapatkan nilai kadar air. Syarat kadar air yang didapatkan tidak boleh melebihi 10% dari total berat sampel.

4.7.3 Pembuatan Ekstrak n-Heksan Daun Mahoni

Dalam penelitian ini, sebanyak 1,5 kg serbuk simplisia daun mahoni diekstraksi menggunakan pelarut n-Heksan melalui metode maserasi perendaman. Proses ekstraksi dilakukan dengan memasukkan 1,5 kg serbuk simplisia ke dalam bejana dengan menambahkan pelarut n-Heksan sebanyak 15 L dengan perbandingan 1:10. Sampel daun mahoni direndam selama tiga kali 24 jam berturut-turut, kemudian disaring dengan menggunakan penyaringan *buchner* dengan bantuan pompa vakum. Larutan filtrat yang dihasilkan kemudian diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak n-Heksan kental dari daun mahoni.

4.7.4 Skrining Fitokimia

a. Preparasi larutan uji

Ditimbang saksama kurang lebih ekstrak n-Heksan daun mahoni 100 mg dan ditambahkan 10 mL pelarut n-Heksan. Kemudian hasil tersebut disaring dan diambil filtratnya, lalu dimasukkan ke dalam cawan.

b. Prosedur KLT

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.

Berikut pengujian fitokimia senyawa metabolit sekunder yang dilakukan:

1) Uji Alkaloid

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

2) Uji Flavonoid

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

3) Uji Terpenoid dan Steroid

Fase gerak : n-Heksan P : etil Asetat P (9:1)
 Fase diam : Silika gel 60 F₂₅₄
 Penampak noda : Anisaldehyd-asam sulfat, panaskan lempeng pada suhu 100° selama 5-10 menit (noda berwarna ungu)

4) Uji Polifenol

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

5) Uji Antrakinon

Fase gerak : Etil asetat P : metanol P : air (100:13,5:10)
 Fase diam : Silika gel 60 F₂₅₄
 Penampak noda : Kalium hidroksida 10% (noda berwarna jingga atau merah)

4.7.5 Pembuatan Konsentrasi Larutan Uji

- 1) Sampel ekstrak n-heksan daun mahoni sebanyak 0,5 g, dilarutkan dalam 0,1 ml dimetil sulfoksida (DMSO 1%) ditambah Tween 20, kemudian ditambahkan ad 10 mL aquades ke dalam larutan tersebut, sehingga didapatkan larutan uji 5% (b/v).

- 2) Sampel ekstrak n-heksan daun mahoni sebanyak 2,5 g, dilarutkan dalam 0,1 ml dimetil sulfoksida (DMSO 1%) ditambah Tween 20, kemudian ditambahkan ad 10 mL aquades ke dalam larutan tersebut, sehingga didapatkan larutan uji 25% (b/v).
- 3) Sampel ekstrak n-heksan daun mahoni sebanyak 5 g, dilarutkan dalam 0,1 ml dimetil sulfoksida (DMSO 1%) ditambah Tween 20, kemudian ditambahkan ad 10 mL aquades ke dalam larutan tersebut, sehingga didapatkan larutan uji 50% (b/v).

4.7.6 Preparasi Media

Pada penelitian ini menggunakan satu media yaitu *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA). Untuk pembuatan suspensi mikroba, menggunakan aquades steril dengan meremajakan jamur sehari sebelum penggunaan.

Media *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) dibuat dengan cara 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 volume 1 L. Kemudian larutan tersebut dipanaskan diatas *hot plate* hingga mendidih. Setelah itu, disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121° C. Larutan yang telah disterilkan dituangkan ke dalam cawan petri hingga memadat pada suhu ruang.

4.7.7 Pembuatan Standar Kekeruhan McFarland

Larutan baku McFarland terdiri atas 2 komponen, yaitu larutan BaCl₂ 1% dan H₂SO₄ 1%. Pembuatan Standart Kekeruhan Larutan McFarland dilakukan dengan cara:

1. Diambil larutan BaCl₂ 1% sebanyak 0,05 ml dengan menggunakan pipet volume lalu masukkan ke dalam labu ukur 10 ml.
2. Masukkan larutan H₂SO₄ 1% ke dalam labu ukur sampai tanda batas dan dikocok hingga homogen. Nilai absorban larutan baku McFarland 0,5 ekuivalen dengan suspensi sel jamur konsentrasi 1,4 x 10⁶ CFU/mL

3. Larutan harus dikocok terlebih dahulu hingga homogen setiap akan digunakan untuk membandingkan suspensi jamur (Aviany and Pujiyanto, 2020)

4.7.8 Preparasi Jamur

Proses peremajaan jamur dilakukan dengan mengambil biakan murni yang diperoleh dari Laboratorium Biomedik, Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah 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 (Guinea *et al.*, 2010)

Spesies	CFU/ml ^b	Cells/field
<i>T. mucoides</i>	$4,5 \times 10^6$	<1
<i>Rhodotorula spp.</i>	$1,9 \times 10^6$	4-5
<i>C. tropicalis</i>	$3,3 \times 10^6$	5-6
<i>S. cerevisiae</i>	$1,2 \times 10^6$	<1
<i>C. parapsilosis</i>	$1,3 \times 10^6$	4-5
<i>C. glabrata</i>	$4,3 \times 10^6$	>20
<i>C. albicans</i>	$1,4 \times 10^6$	<1
<i>C. kefyr</i>	$2,1 \times 10^6$	>10
<i>C. krusei</i>	$3,1 \times 10^6$	2-3
<i>T. inkin</i>	$1,4 \times 10^6$	<1

4.7.9 Preparasi Kontrol Positif

Pada penelitian ini kontrol positif yang digunakan adalah nistatin 0,05g/mL. Diambil sediaan sebanyak 50 μ L dengan mikropipet. Diletakkan blank disk di atas cawan petri kosong dan ditetesi dengan kontrol positif sesuai jumlah yang dikehendaki. Dikeringkan disk yang telah berisi kontrol positif di dalam inkubator selama 10 menit. Dilakukan replikasi sebanyak tiga kali.

4.7.10 Pengujian Metode Difusi Cakram

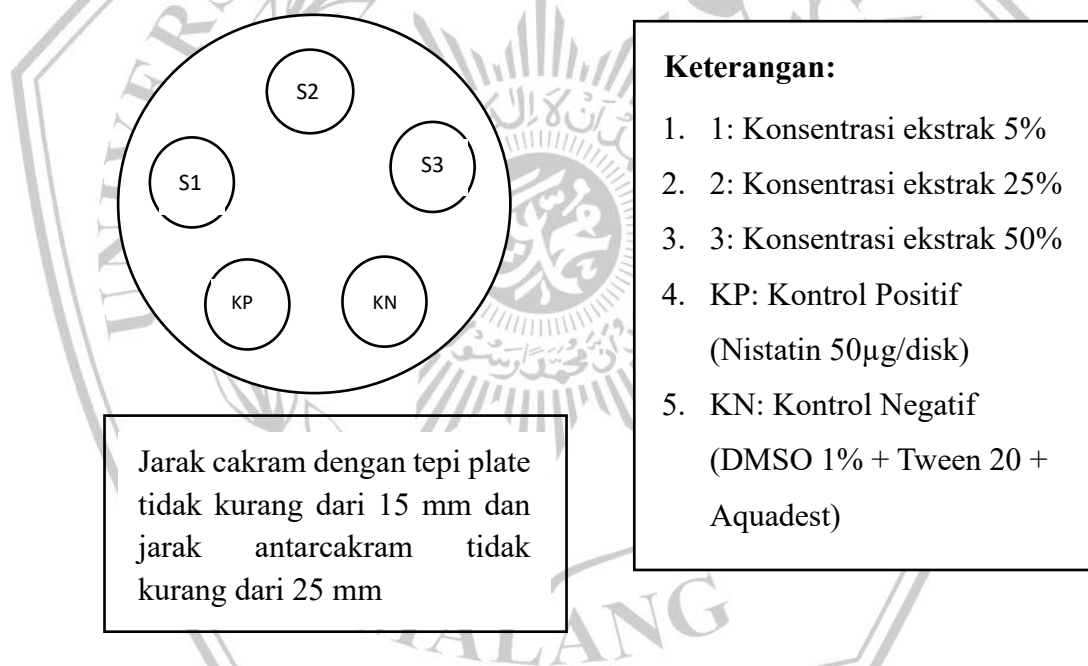
Proses pengujian antijamur dengan metode difusi cakram, antara lain sebagai berikut :

- 1) Disiapkan vial yang telah berisi larutan uji dengan konsentrasi 5%; 25%; dan 50%.
- 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* (SDA) yang telah diolesi jamur *Candida albicans* dibiarkan terlebih dahulu selama lima menit agar mengering. Disiapkan 3 buah kertas cakram dengan diameter 6 mm yang telah ditetesi sampel uji, kontrol positif (nistatin) dan kontrol negatif (DMSO 1% ditambah Tween 20 dan Aquadest) 1 buah. Kemudian, diletakkan inokulan pada media dengan jarak tiap cakram tidak kurang dari 25 mm dan dari tepi lempeng tidak kurang dari 15 mm. Ditekan kertas cakram dengan pinset pada permukaan lempengan sehingga terdapat kontak yang baik antara disk lempengan agar. Diatur disk dengan jarak yang berbeda satu sama lain.
- 5) Semua media *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 48 jam.

- 6) Untuk menguji senyawa antijamur, dilakukan pengamatan setiap 24 jam untuk mengamati area jernih di sekitar kertas cakram. Diamati juga area hambatan yang terbentuk dengan jangka sorong dalam satuan milimeter (mm).
- 7) Dilakukan replikasi sebanyak tiga kali

4.7 Analisis Data

Pada penelitian ini, analisis data yang digunakan adalah deskriptif. Dan uji statistik menggunakan SPSS 27.0. Dilakukan pengukuran diameter zona hambat di daerah berwarna bening pada berbagai konsentrasi dari ekstrak n-Heksan daun mahoni (*Swietenia mahagoni* L.) terhadap pertumbuhan jamur *Candida albicans*.



Gambar 4.2 Pengujian Antijamur Dengan Metode Difusi Cakram