

## **BAB IV**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **4.1 Jenis Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium. Pengujian dilakukan secara *in vitro* dengan metode yang digunakan adalah metode difusi cakram.

#### **4.2 Bahan Penelitian**

Penelitian ini menggunakan daun mahoni (*Swietenia mahagoni* L.) yang didapatkan dari desa Kombangan, Kecamatan Geger, Kabupaten Bangkalan, Madura. Daun mahoni (*Swietenia mahagoni* L.) dideterminasi dan diserbuk di UPT Laboratorium Herbal Materia Medica Batu sebagai bahan penelitian. Mikroorganisme uji yang digunakan dalam penelitian adalah *Candida albicans* yang didapat dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

#### **4.3 Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian dilakukan di Laboratorium Sintesis Program Studi Farmasi Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Malang dan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang akan dilakukan pada bulan Desember 2023 – Februari 2024.

#### **4.4 Variabel Penelitian**

##### **4.4.1 Variabel Bebas**

Variabel dependen (bebas) dalam penelitian ini adalah ekstrak etil asetat dari daun mahoni (*Swietenia mahagoni* L.) dengan konsentrasi 5%, 25%, dan 50% yang diterapkan terhadap *Candida albicans*.

#### 4.4.2 Variabel Terikat

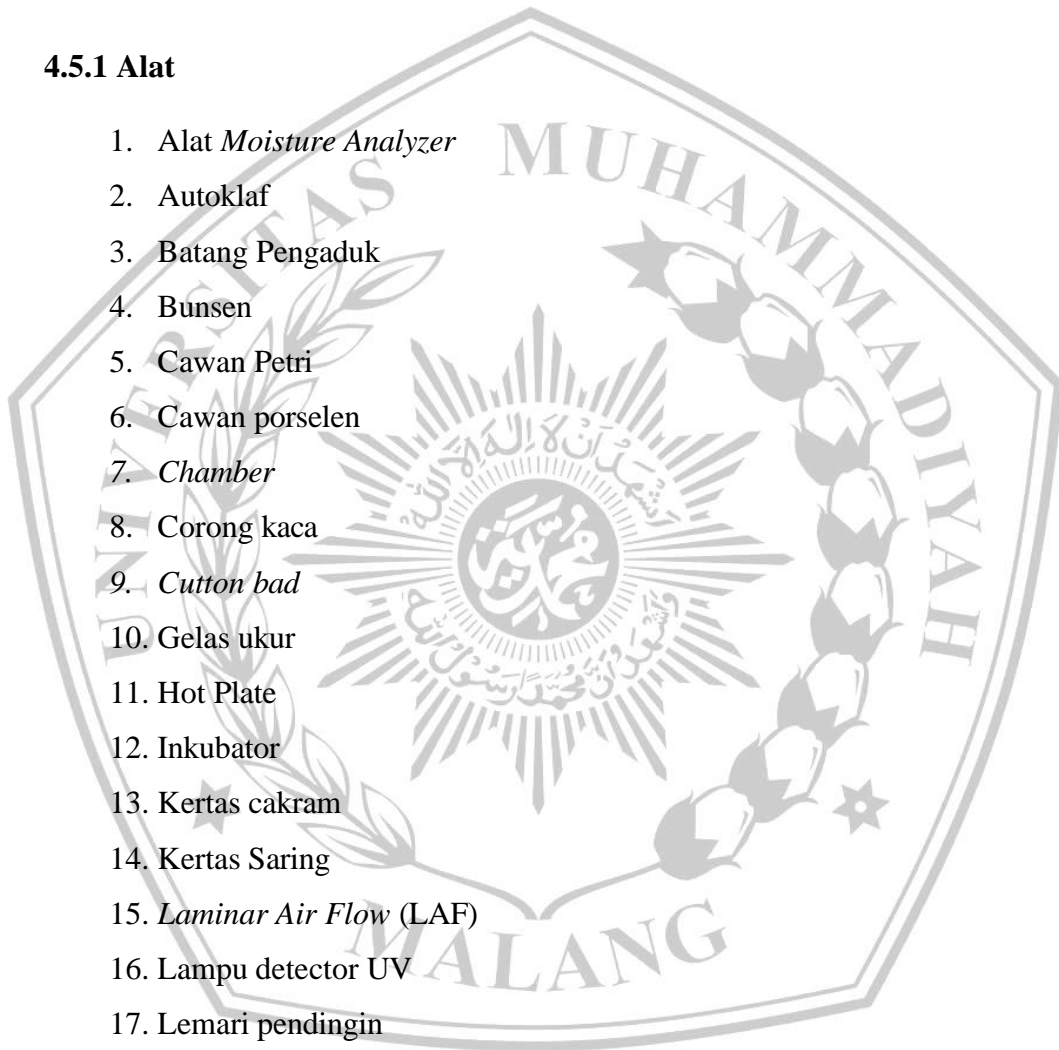
Variabel independen (terikat) pada penelitian ini adalah ukuran diameter zona hambat yang ditunjukkan dengan adanya daerah bening disekitar senyawa uji.

#### 4.5 Instrumen Penelitian

Instrumen penelitian yang digunakan dalam penelitian ini meliputi:

##### 4.5.1 Alat

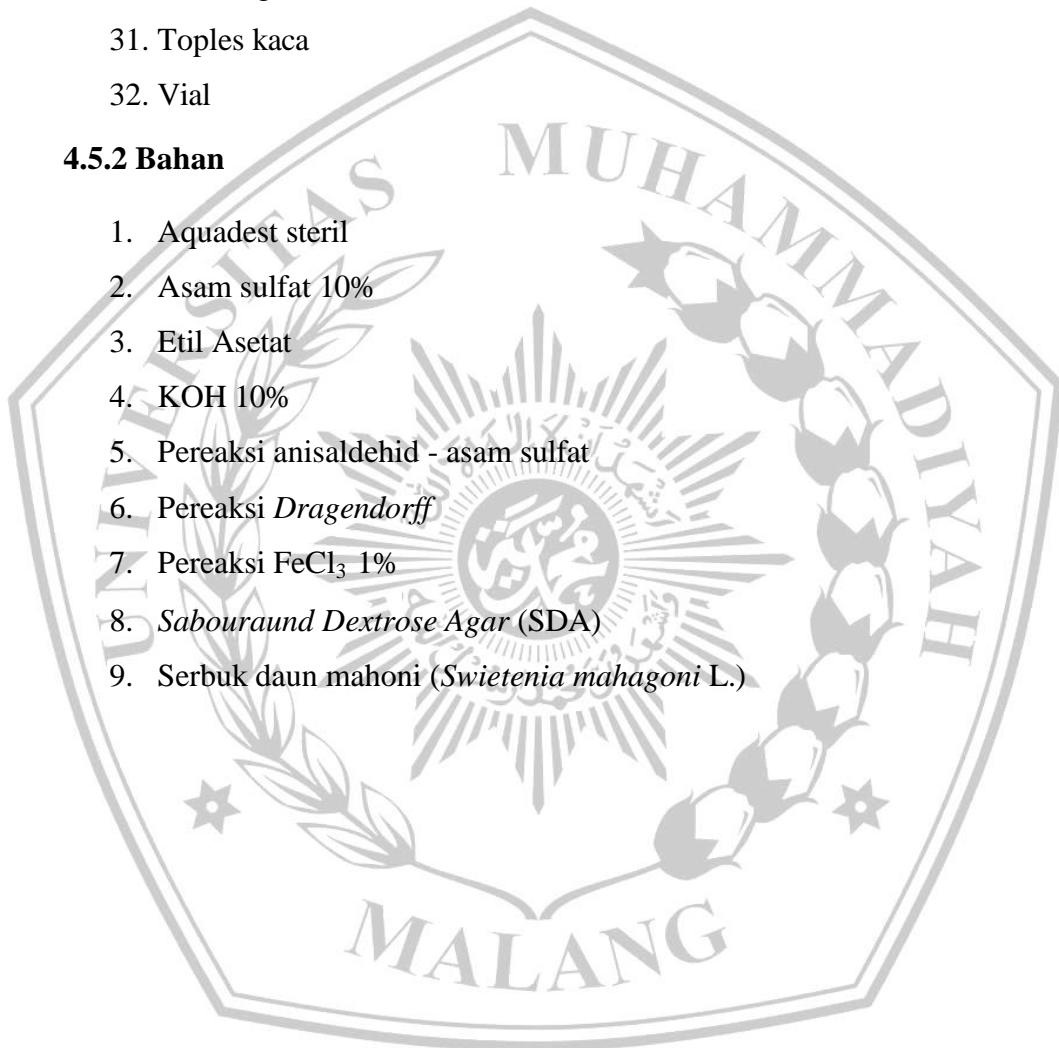
1. Alat *Moisture Analyzer*
2. Autoklaf
3. Batang Pengaduk
4. Bunsen
5. Cawan Petri
6. Cawan porselen
7. *Chamber*
8. Corong kaca
9. *Cutton bad*
10. Gelas ukur
11. Hot Plate
12. Inkubator
13. Kertas cakram
14. Kertas Saring
15. *Laminar Air Flow (LAF)*
16. Lampu detector UV
17. Lemari pendingin
18. Mesin penggiling 43
19. Mikro pipet
20. Oven
21. Pengayak *mesh* 60
22. Penjepit
23. Penyaring *Buchner*



24. Pinset
25. Pipa Kapiler
26. Pipet Volume
27. Plat KLT
28. Rotary evaporator vacuum
29. Tabung reaksi
30. Timbangan analitik
31. Toples kaca
32. Vial

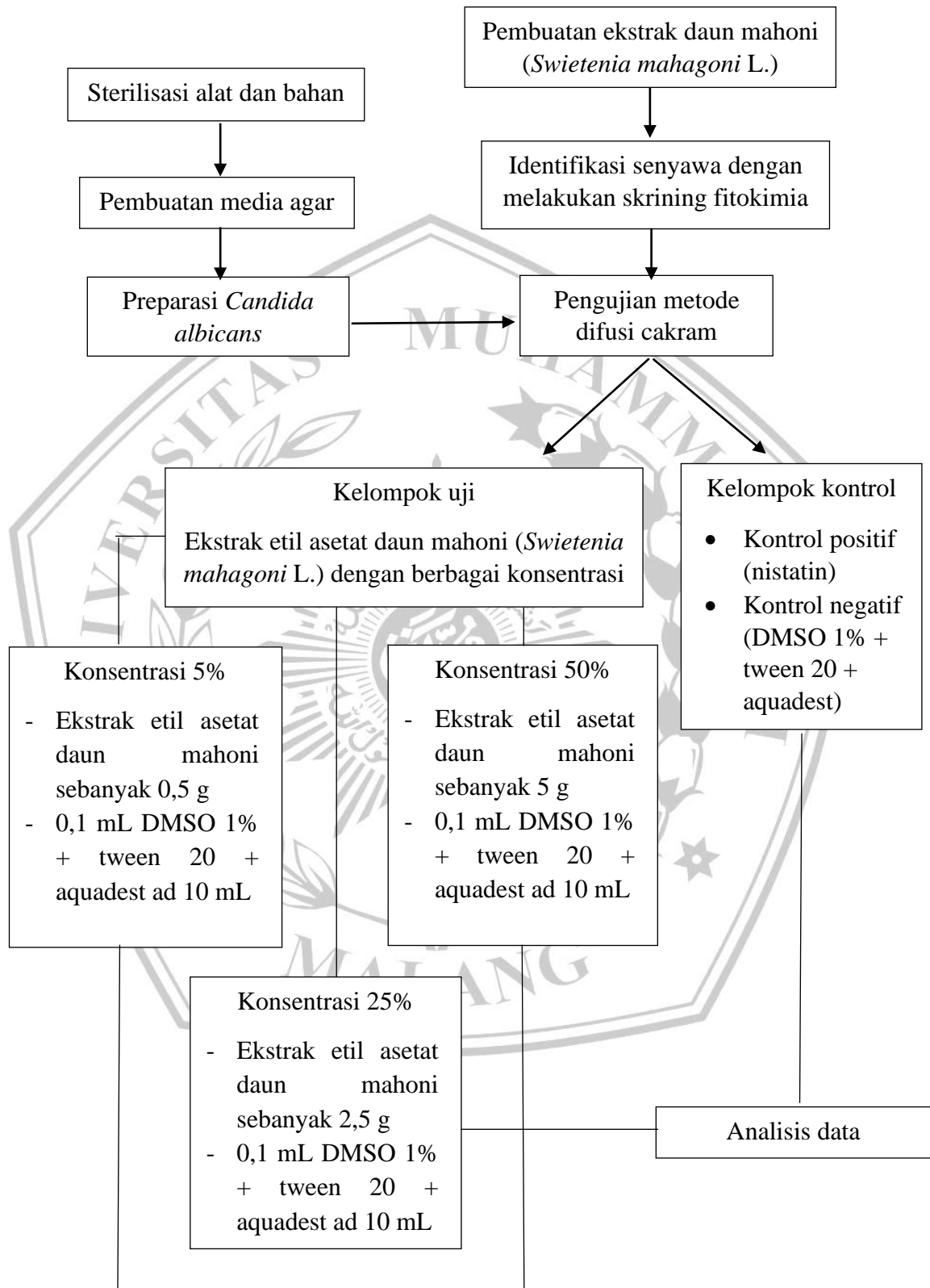
#### 4.5.2 Bahan

1. Aquadest steril
2. Asam sulfat 10%
3. Etil Asetat
4. KOH 10%
5. Pereaksi anisaldehyd - asam sulfat
6. Pereaksi *Dragendorff*
7. Pereaksi  $\text{FeCl}_3$  1%
8. *Sabouraud Dextrose Agar (SDA)*
9. Serbuk daun mahoni (*Swietenia mahagoni* L.)



## 4.6 Metode Penelitian

### 4.6.1 Kerangka operasional



**Gambar 4.1** Kerangka Operasional Penelitian

## 4.7 Prosedur Kerja

### 4.7.1 Penyiapan Sterilisasi Alat dan Bahan

Semua instrumen yang akan digunakan dalam penelitian ini dilakukan proses sterilisasi sebagai langkah penting untuk mengurangi risiko terjadinya kontaminasi. Proses sterilisasi melibatkan dua metode yaitu sterilisasi kering dan sterilisasi basah.

Sterilisasi kering terdiri dari dua cara. Pertama, peralatan seperti jarum ose, mulut tabung biakan, pinset, spatel, dan batang pengaduk disterilkan dengan menggunakan api langsung. Kedua, peralatan gelas tanpa skala, seperti cawan petri, tabung reaksi, dan pipet disterilkan dengan menggunakan oven pada suhu  $160^{\circ}\text{C}$  selama 1-2 jam. Hal ini untuk memastikan bahwa alat-alat tersebut benar-benar steril dan bebas kontaminasi mikroba.

Di sisi lain, sterilisasi basah dilakukan dengan menggunakan alat autoklaf. Alat-alat seperti gelas ukur, erlenmeyer disterilkan menggunakan autoklaf. Proses sterilisasi ini dilakukan pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  selama 15-20 menit.

### 4.7.2 Preparasi Sampel

Daun mahoni (*Swietenia mahagoni* L.) disiapkan melalui beberapa tahap. Langkah pertama, daun dibersihkan menggunakan air mengalir agar bersih. Kemudian, daun-daun tersebut ditiriskan lalu diiris menjadi potongan-potongan kecil. Potongan-potongan ini kemudian ditimbang selanjutnya dikeringkan. Proses pengeringan dilakukan pada suhu ruang dengan cara daun-daun tersebut diangin-anginkan. Dalam pengeringan ini, perlu dihindari dari sinar matahari langsung yang dapat mempengaruhi kualitas daun dan menghindari hilangnya komponen senyawa yang terdapat pada daun.

Setelah daun-daun kering, langkah selanjutnya adalah dihaluskan dengan menggunakan mesin penggiling khusus (mesin 43) sehingga diperoleh serbuk daun yang halus. Setelah proses penggilingan selesai,

serbuk daun tersebut diayak menggunakan *shieve shaker* dengan derajat kehalusan tertentu.

Setelah itu, dilakukan pengukuran MC menggunakan alat *moisture analyzer* untuk mengetahui kadar air yang terdapat dalam simplisia daun mahoni (*Swietenia mahagoni* L.). Untuk pengukuran MC ditimbang serbuk sebanyak 2 g dan dilakukan replikasi sebanyak 3 kali. Persyaratan utama dalam pengukuran ini adalah kadar air yang diinginkan dalam simplisia daun mahoni harus kurang dari 10%. Dengan demikian, proses persiapan dan pengukuran ini bertujuan untuk memastikan bahwa daun mahoni siap digunakan dalam kondisi yang sesuai dengan standar kadar air yang diinginkan.

#### **4.7.3 Proses ekstraksi Bahan Uji**

Pada penelitian ini, sebanyak 1,5 kilogram serbuk daun mahoni (*Swietenia mahagoni* L.) diekstraksi dengan metode maserasi perendaman menggunakan pelarut etil asetat. Proses ekstraksi ini dilakukan dengan cara sebagai berikut:

- (1) Serbuk daun mahoni sebanyak 1,5 kilogram dimasukkan ke dalam bejana, ditambahkan dengan pelarut etil asetat sebanyak 15000 ml (perbandingan 1:10). Selanjutnya direndam selama 3x24 jam. Setelah proses perendaman selesai, dilakukan penyaringan dengan menggunakan penyaring tipe *buchner* dan filtratnya ditampung.
- (2) Dilakukan pemekatan menggunakan rotary evaporator vacum sampai diperoleh ekstrak kental. Rotary evaporator merupakan suatu alat yang digunakan untuk menghilangkan pelarut dari ekstrak, sehingga yang tersisa adalah ekstrak yang lebih kental dan murni.

#### **4.7.4 Skrining Fitokimia Ekstrak**

Untuk mengidentifikasi komponen senyawa yang terdapat dalam ekstrak etil asetat daun mahoni (*Swietenia mahagoni* L.), dilakukan

identifikasi senyawa metabolit sekunder yang dilakukan menggunakan beberapa tahap sebagai berikut.

a. Preparasi Larutan Uji

Ekstrak daun *Swietenia mahagoni* L. ditimbang sebanyak 100 mg dan ditambahkan dengan 10 mL pelarut etanol. Hasil tersebut disaring kemudian diambil filtratnya, lalu dimasukkan ke dalam cawan. Selanjutnya dilakukan pemisahan komponen senyawa menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT).

b. Prosedur Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Totolkan larutan uji dengan jarak antara 1,5 sampai 2 cm dari tepi bawah lempeng, dan biarkan mengering. Masukkan lempeng KLT ke dalam bejana kromatografi (*chamber*). Fase gerak dalam bejana harus mencapai tepi bawah lapisan penjerap, kemudian totolan sampel jangan sampai terendam. Ditunggu bejana dan biarkan fase gerak merambat sampai batas jarak rambat. Keluarkan lempeng, lalu amati bercak dengan sinar *ultraviolet* pada gelombang pendek (254 nm) dan gelombang panjang (366 nm). Ukur dan catat jarak tiap bercak dari titik penotolan. Selanjutnya dilakukan beberapa uji metabolit sekunder yang terdiri dari:

- Uji Alkaloid

Fase gerak: Kloroform : metanol (9:1)

Fase diam: Silika gel 60 F<sub>254</sub>

Penampak noda: *Dragendorff* (noda berwarna coklat atau jingga)

- Uji Flavonoid

Fase gerak: Kloroform : Aseton : Asam formiat (10:2:1 tetes)

Fase diam: Silika gel 60 F<sub>254</sub>

Penampak noda: Asam sulfat 10% (noda berwarna kuning atau kuning kecoklatan)

- Uji Terpenoid

Fase gerak: n-Heksan : etil Asetat (9:1)

Fase diam: Silika gel 60 F<sub>254</sub>

Penampak noda: Anisaldehyd-asam sulfat, panaskan lempeng pada suhu 100°C selama 5-10 menit (noda berwarna ungu atau ungu-merah)

- Uji Tanin

Fase gerak: Etil asetat P : metanol P : air (100:13,5:10)

Fase diam: Silika gel 60 F<sub>254</sub>

Penampak noda: Besi(III) klorida 10% (noda berwarna hitam)

- Uji Antrakuinon

Fase gerak: Etil asetat : metanol : air (100:13,5:10)

Fase diam: Silika gel 60 F<sub>254</sub>

Penampak noda: Kalium hidroksida 10% (noda berwarna jingga atau merah)

#### 4.7.5 Pembuatan Konsentrasi Larutan Uji

- Timbang ekstrak sebanyak 0,5 g, larutkan dalam 0,1 ml DMSO 1% + 0,1 mL tween 20 + aquades ad 10 ml, diperoleh larutan uji 5% (b/v).
- Timbang ekstrak sebanyak 2,5 g, larutkan dalam 0,1 ml DMSO 1% + 0,1 tween 20 + aquades 10 ml, diperoleh larutan uji 25% (b/v).
- Timbang ekstrak sebanyak 5 g, larutkan dalam 0,1 ml DMSO 1% + 0,1 mL tween 20 + aquades ad 10 ml, diperoleh larutan uji 50% (b/v)

#### 4.7.6 Preparasi Media

Dalam penelitian ini untuk identifikasi aktivitas antijamur, digunakan suatu media yakni *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA). Pembuatan media *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) dilakukan dengan langkah-langkah sebagai berikut:

- (1) Pertama, sebanyak 65 gram SDA ditambahkan ke dalam 1 liter air suling (*aquadest*) dalam erlenmeyer.
- (2) Dicampur dengan baik sampai didapatkan suspensi yang homogen, lalu direbus selama satu menit.
- (3) Setelah proses perebusan, suspensi SDA dimasukkan ke dalam alat bernama autoklaf, dan dipanaskan hingga mencapai suhu antara 118



hingga 121 derajat Celsius. Proses ini dilakukan selama 15 menit dengan hati-hati untuk mencegah terjadinya panas berlebihan.

- (4) Setelah proses sterilisasi selesai, media SDA disimpan pada suhu antara 8 hingga 15 derajat Celsius untuk mempertahankan kestabilannya.

#### **4.7.7 Peremajaan Jamur *Candida albicans***

Proses peremajaan jamur dilakukan dengan mengambil biakan murni yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. 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.

#### **4.7.8 Pembuatan Larutan Standar McFarland**

Larutan baku McFarland terdiri atas 2 komponen, yaitu larutan BaCl<sub>2</sub> 1% dan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1%. Pembuatan Standart Kekeruhan Larutan McFarland dilakukan dengan cara:

1. Diambil larutan BaCl<sub>2</sub> 1% sebanyak 0,05 ml dengan menggunakan pipet volume lalu masukkan ke dalam labu ukur 10 ml.
2. Masukkan larutan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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  $1,4 \times 10^6$  CFU/mL.
3. Larutan harus dikocok terlebih dahulu hingga homogen setiap akan digunakan untuk membandingkan suspensi jamur.

#### **4.7.9 Suspensi Jamur**

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

**Tabel IV. 1** Standar McFarland

Spesies	CFU/mL	Sel/bidang
<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

#### 4.7.10 Pembuatan Kontrol Positif

Pada penelitian ini kontrol positif yang digunakan adalah nistatin konsentrasi 50 µg/mL. Diambil sediaan sebanyak 50 µg lalu ditambahkan ke dalam 1 mL aquadest.

#### 4.7.11 Pengujian Metode Difusi Cakram

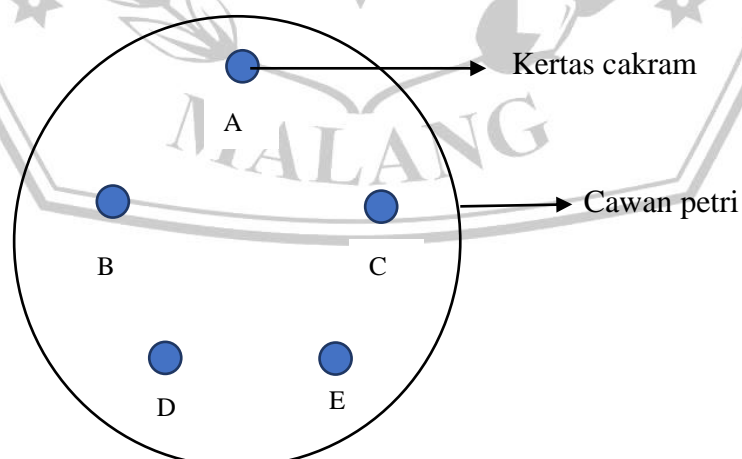
Proses pengujian antijamur untuk metode difusi cakram, antara lain sebagai berikut :

1. Disiapkan vial yang telah berisi larutan uji dengan konsentrasi 5%; 25%; dan 50%.
2. Suspensi jamur diambil dengan cara mencelupkan kapas lidi steril satu kali. Selanjutnya, putar kapas lidi steril tersebut pada bagian tepi tabung secara perlahan agar jamur yang akan dioleskan tidak terlalu banyak. Setelah itu dioleskan pada media *Sabouraud*

*Dextrose Agar* dan diratakan.

3. Media *Sabouraud Dextrose Agar* yang telah dioleskan jamur *Candida albicans* dibiarkan dahulu lima menit supaya mengering. Cakram kertas saring berdiameter 6 mm sebanyak 5 buah dicelupkan ke dalam sampel uji, kontrol positif (nistatin) dan kontrol negatif (DMSO 1% + tween 20 + aquadest).
4. Selanjutnya, kertas cakram diletakkan pada media dengan jarak tiap cakram 25 mm dan dari tepi lempeng sebesar 15 mm. Disk kertas saring ditekan lembut dengan menggunakan pinset pada permukaan media sehingga terdapat kontak yang baik antara disk lempengan agar. Jarak diatur sedemikian rupa sehingga satu disk dengan disk yang lainnya berjauhan.
5. Selanjutnya media *Sabouraud Dextrose Agar* diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C.
6. Setelah diinkubasi, pengujian senyawa antijamur dilakukan dengan cara diamati dan diukur dengan melihat zona bening disekitar cakram. Zona hambatan yang terbentuk diukur dengan penggaris dalam satuan milimeter (mm).
7. Perlakuan diulangi sebanyak tiga kali.

#### 4.7.10 Tata Letak Kertas Cakram



**Gambar 4.2** pengujian difusi cakram. (A) Sampel 1 (ekstrak etil asetat daun mahoni konsentrasi 50%); (B) sampel 2 (ekstrak etil asetat daun

mahoni konsentrasi 25%); (C) sampel 3 (ekstrak etil asetat daun mahoni konsentrasi 5%); (D) Kontrol negatif (DMSO 1% + tween 20 + aquadest); (E) Kontrol positif (nistatin).

#### 4.8.11 Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan pendekatan deskriptif yaitu dengan mengamati dan mencatat pengukuran diameter zona hambat yang berupa daerah bening pada beberapa konsentrasi ekstrak etil asetat daun mahoni (*Swietenia mahagoni* L.) terhadap jamur *Candida albicans*.

