

## **BAB IV**

### **PROSEDUR KERJA**

#### **4.1 Penyiapan Bahan**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu umbi wortel yang diperoleh dari daerah Cipanas, Cianjur. Kemudian, dilakukan determinasi untuk memastikan kebenaran tumbuhan wortel yang digunakan. Determinasi dilakukan di Herbarium Bandungense Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, Institut Teknologi Bandung.

#### **4.2 Pengambilan Bahan Uji**

Umbi wortel dicuci dengan air yang mengalir hingga benar-benar bersih dari pengotor. Kemudian, buang bagian pangkal wortel yang masih berwarna hijau dengan menggunakan pisau steril serta bagian-bagian wortel yang keras. Karena, bagian umbi wortel tersebut akan mengurangi kualitas dari air perasan (Handayani. P, 2010). Kemudian, umbi wortel dicuci menggunakan akuades steril dan di juicer dengan menggunakan alat juicer steril hingga diperoleh filtrat, selanjutnya filtrat ditampung dalam gelas kimia steril.

#### **4.3 Penapisan Fitokimia**

##### **4.3.1 Alkaloid**

Sampel ditambahkan dengan ammonia 25% lalu digerus dalam mortar, tambahkan 20 ml kloroform dan digerus kuat-kuat. Kemudian disaring dan diambil fitratnya untuk pengujian (Larutan A), kemudian diberi pereaksi Dragendorff. Hasil positif alkaloid jika timbul warna jingga pada kertas saring. Sisa larutan A dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan asam klorida 10% v/v akan terbentuk 2 fase, lalu dibagi menjadi 2 bagian dalam tabung reaksi (Larutan B). Tabung pertama ditambahkan pereaksi dragendorff, dan tabung kedua ditambahkan pereaksi mayer. Hasil positif dengan pereaksi dragendorff akan menunjukkan endapan merah bata yang bertahan selama 15 menit, sedangkan hasil positif dengan pereaksi mayer akan menunjukkan endapan putih yang bertahan selama 15 menit (Farnsworth, 1966 : 254-255).

#### **4.3.2 Saponin**

Sampel diencerkan dengan 1-10 ml air, dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Apabila ada busa setinggi 1-10 cm dan jika busa bertahan selama 10 menit, tambahkan beberapa tetes asam klorida, maka menandakan simplisia mengandung saponin (Depkes RI, 1989 : 167).

#### **4.3.3 Flavonoid**

Sampel dicampurkan dengan serbuk Magnesium dan 1 ml HCL pekat, lalu dipanaskan diatas penangas air dan disaring. Kemudian, ditambahkan amilalkohol, lalu dikocok kuat hingga terjadi pemisahan. Hasil positif menunjukkan jika terbentuk warna kuning hingga merah (Depkes RI, 1989 : 168).

#### **4.3.4 Tanin**

Sampel digerus dengan air, dipindahkan dalam tabung reaksi dan dididihkan selama beberapa menit. Kemudian disaring, dan filtratnya dibagi menjadi tiga bagian, yaitu bagian A : filtrat ditetaskan larutan NaCl, bagian B :



filtrat diteteskan larutan gelatin, bagian C : filtrat ditambahkan serbuk gelatin. Adanya endapan setelah ditambah pereaksi atau penambahan larutan gelatin dan garam gelatin menandakan positif tanin (Mojab, 2003 : 77).

#### **4.3.5 Steroid dan Triterpenoid**

Sampel ditambahkan eter lalu digerus hingga halus, dan ditempatkan dalam cawan penguap. Kemudian, dibiarkan menguap hingga kering. Lalu ditambahkan pereaksi Liebermann-Buchard. Apabila menimbulkan warna hijau-biru maka menandakan positif steroid, dan apabila menimbulkan warna ungu, maka menandakan positif triterpenoid (Farnsworth, 1966 : 259).

#### **4.3.6 Polifenolat**

Sampel ditempatkan pada tabung reaksi lalu ditambahkan air secukupnya dan dipanaskan di penangas air. Kemudian disaring, dan ditambahkan  $\text{FeCl}_3$  akan timbul warna biru, biru-hitam, hijau, atau biru-hijau dan endapan menandakan komponen fenolat atau endapan coklat menandakan adanya fenolat (Mojab, 2003 : 77).

#### **4.3.7 Monoterpen dan Sesquiterpen**

Sampel ditambahkan eter, kemudian disaring. Filtrat ditempatkan dalam cawan penguap, dibiarkan hingga menguap dan kering. Lalu ditambahkan larutan Vanillin 10% dalam asam sulfat pekat. Kemudian, diamati timbulnya warna-warna, apabila timbul warna maka menandakan positif monoterpen dan sesquiterpen (Depkes RI, 1977 : 132).

#### **4.3.8 Kuinon**

Sampel digerus dengan air lalu disaring, ditambahkan beberapa tetes

NaOH 5%. Kemudian diamati, apabila timbul warna merah maka menandakan positif kuinon (Farnsworth, 1966 : 265-266).

#### **4.4 Penetapan Bobot jenis Air Perasan Umbi Wortel**

Penetapan bobot jenis menggunakan piknometer kering, bersih, dan telah dikalibrasi dengan menetapkan bobot piknometer dan bobot air yang baru dididihkan pada suhu 25°C. Suhu ekstrak cair diatur hingga lebih kurang 20°C dimasukkan ke dalam piknometer. Suhu piknometer yang telah diisi diatur hingga suhu 25°C, kelebihan ekstrak cair dibuang dan ditimbang. Bobot piknometer kosong dikurangkan dengan bobot piknometer yang telah diisi. Bobot jenis ekstrak cair adalah hasil yang diperoleh dari bobot piknometer ekstrak dibagi dengan hasil yang diperoleh dari bobot air dalam piknometer pada suhu 25°C (Depkes RI, 2000 : 14).

#### **4.5 Pengujian Aktivitas Antifungi**

Proses pengujian aktivitas antifungi meliputi penyiapan media pertumbuhan fungi, sterilisasi alat, pembiakkan fungi uji (*Aspergillus niger* dan *Candida albicans* ATCC 10231), pensuspensian fungi uji.

##### **4.5.1 Penyiapan Media Pertumbuhan Fungi**

Media agar dibuat dengan cara melarutkan 65 gram *Saboraud Dextrose Agar* (SDA) kedalam 1 liter air suling, kemudian dipanaskan sambil diaduk hingga didapat larutan agar yang bening. Kemudian, media agar ini disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama  $\pm$  15 menit (Kursini, Dewi., dkk, 2006).

#### 4.5.2 Sterilisasi Alat dan Bahan

Semua alat, bahan, dan media yang akan digunakan diperlukan dalam kondisi steril supaya tidak terkontaminasi dengan mikroba lain, sehingga semua alat, bahan, dan media yang digunakan terlebih dahulu harus disterilkan melalui proses sterilisasi. Sterilisasi alat-alat gelas dilakukan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama  $\pm$  15 menit. Sedangkan, untuk alat-alat seperti jarum ose dan alat-alat lain yang terbuat dari logam, langsung dipijarkan pada api Bunsen.

#### 4.5.3 Pembiakkan Fungi Uji

Media agar ini sebagian digunakan untuk pembenihan fungi sebanyak 5 ml per tabung untuk dibuat agar miring. Fungi uji ditanamkan diatas permukaan agar miring pada media pertumbuhan *Saboraud Dextrose Agar* (SDA) dengan membuat goresan menggunakan jarum ose. Untuk fungi *Aspergillus niger* diinkubasi pada suhu 29°C selama 4 hari dan fungi *Candida albicans* ATCC 10231 diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 hari.

#### 4.5.4 Pensuspensian Fungi

Fungi dari kultur kerja dibuat suspensi fungi dengan menggunakan larutan NaCl fisiologis dengan cara koloni fungi diambil dari kultur kerja menggunakan jarum ose, kemudian dimasukkan kedalam larutan NaCl fisiologis dan dikocok dengan menggunakan vortex, lalu diukur kekeruhannya untuk fungi *Aspergillus niger* transmittan diatur pada  $T = 75\%$  dengan  $\lambda = 520$  nm dan fungi *Candida albicans* ATCC 10231 transmittan diatur pada  $A = 0,12-0,15$  dengan  $\lambda = 530$  nm (Rathi, 2010).

#### **4.6 Pengujian Aktivitas Antifungi dan Penetapan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) menggunakan Difusi Agar**

Uji aktivitas antifungi dilakukan menggunakan metode difusi agar dengan perforasi. Untuk air perasan umbi wortel terhadap *Aspergillus niger* dibuat serial larutan dengan konsentrasi (100%, 75%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 5%), sedangkan untuk air perasan umbi wortel terhadap *Candida albicans* ATCC 10231 dibuat serial larutan (100%, 75%, 50%, 37,5%, 25%, 12,5%, 6,25%, 5%). Suspensi fungi masing-masing sebanyak 100 µl dimasukkan ke dalam cawan petri steril, dan dituangkan 15-20 ml SDA yang sudah dicairkan ke dalam cawan petri, campuran dihomogenkan dengan cara diputar perlahan kemudian dibiarkan hingga dingin dan memadat. Setelah padat, pada agar dibuat sumur-sumur menggunakan perforator. Air perasan umbi wortel dimasukkan ke dalam sumur pada masing-masing cawan petri sebanyak 50 µl, lalu diinkubasi. Untuk *Aspergillus niger* diinkubasi pada suhu 29°C selama 4 hari dan untuk *Candida albicans* ATCC 10231 diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 hari. Kemudian dilakukan pengamatan dan diukur diameter hambat dari zona bening yang terbentuk disekitar sumur. Pengujian dilakukan secara triplo dan penentuan konsentrasi hambat minimum (KHM) dilakukan pada bahan uji yang memiliki aktivitas antifungi dan berdasarkan zona hambat yang terbentuk.

#### **4.7 Penetapan Kesetaraan Aktivitas Antifungi Air Perasan Umbi Wortel Terhadap Ketokonazol menggunakan Metode Difusi Agar**

Penetapan kesetaraan aktivitas antifungi air perasan umbi wortel terhadap ketokonazol dilakukan menggunakan metode difusi agar dengan perforasi.

Antifungi pembanding yang digunakan adalah ketokonazol dengan serial konsentrasi (5%, 2,5%, 2%, 1%, 0,5%). Berdasarkan hasil pengukuran diameter hambat antifungi pembanding, dibuat persamaan garis antara logaritma konsentrasi dengan diameter hambat. Logaritma konsentrasi digambarkan terhadap sumbu x sedangkan diameter hambat digambarkan terhadap sumbu y. Persamaan yang diperoleh, digunakan untuk melihat kesetaraan antara sampel uji dengan antifungi pembanding.

