

BAB IV

PROSEDUR PENELITIAN

4.1. Penyiapan Simplisia

Penyiapan simplisia meliputi pengumpulan bahan, determinasi tanaman dan pengolahan tanaman hingga menjadi simplisia.

4.1.1. Pengumpulan Bahan Tanaman

Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah serbuk biji pala (*Myristica fragrans* Houtt.) yang diperoleh dari kebun Wanayasa Kabupaten Purwakarta.

4.1.2. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman dilakukan di Herbarium Jatinangor, Laboratorium Taksonomi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Prodi Biologi, Universitas Padjajaran.

4.1.3. Pengolahan Bahan

Pengolahan bahan meliputi sortasi, pencucian, perajangan dan pengeringan. Bahan dibersihkan dari pengotor, lalu dicuci bersih dengan cara air dialirkan sebanyak 2 kali pencucian, kemudian dikeringkan di dalam

lemari pengering pada suhu 40°C. Setelah kering, bahan ditumbuk kasar, hingga menghasilkan simplisia kasar.

4.2. Penetapan Kadar Air

Penetapan kadar air dilakukan dengan metode azeotroph, tahapannya sebagai berikut:

Tabung penampung dan kondensor dibilas dengan air kemudian dikeringkan di dalam oven. Sebanyak 200-300 ml toluen yang telah dijenuhkan dengan aquadest dimasukkan ke dalam labu destilasi. Sejumlah simplisia sebanyak 200 gram dimasukkan ke dalam labu. Labu dididihkan perlahan-lahan selama kurang lebih 15 menit dan ditambahkan serpihan porselin. Setelah mendidih, campuran kemudian disuling dengan kecepatan 2 tetes/detik hingga sebagian air tersuling, kemudian naikan kecepatan penyulingan menjadi 4 tetes/detik. Setelah semua air tersuling, bagian dalam kondensor dibilas menggunakan toluen. Selanjutnya dilakukan penyulingan selama 5 menit, kemudian proses pemanasan dihentikan. Tabung penerima didinginkan sampai suhu kamar. Tetesan air yang menempel pada dinding tabung penerima dihilangkan. Air dan toluen dibiarkan memisah dalam tabung penerima, volume air dalam tabung penerima diamati dan selanjutnya dapat ditentukan % kadar air (Depkes RI, 1995:911,1035-1036)

$$\text{Kadar air (\%)} = \frac{\text{Volume air (ml)} \times \text{Bj air (g/ml)}}{\text{g simplisia}} \times 100 \%$$

4.3. Ekstraksi

Metode ekstraksi yang dilakukan ialah maserasi. Alat maserator dibersihkan dan dibilas menggunakan etanol 70%. Kapas disumbat pada bagian bawah alat untuk memastikan saluran bagian bawah tertutup. Sebanyak 1000 gram simplisia dimasukkan dan diratakan di dalam maserator. Pelarut yang digunakan ialah etanol dengan perbandingan antara simplisia dan pelarut 1:10. Bagian atas maserator ditutup untuk menghindari penguapan pelarut dan dibiarkan selama 24 jam. Setelah 24 jam, filtrat ditampung dalam wadah yang telah disiapkan. Filtrat yang didapat kemudian diuapkan dengan rotary evaporator tekanan rendah pada suhu 35-40°C sehingga didapat ekstrak kental etanol 70%.

4.4. Penapisan Fitokimia

Penapisan fitokimia simplisia meliputi pemeriksaan kualitatif golongan senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, polifenolat, tannin, kuinon dan steroid atau triterpenoid.

4.4.1. Alkaloid

Simplisia ditambahkan 5 ml ammonia 25% kemudian digerus dalam mortar bersih. Ditambahkan 20 ml kloroform dan digerus kuat. Campuran disaring dan filtrat di gunakan sebagai (Larutan A). Larutan A ditetaskan pada

kertas saring dan diberi pereaksi Dragendorff. Terbentuknya warna merah atau jingga pada kertas saring menunjukkan adanya golongan senyawa alkaloid. Sisa dari larutan A ditambahkan asam klorida 10% lalu lapisan air atau fraksi asamnya dipisahkan (Larutan B). Larutan B dibagi menjadi dua larutan di masing-masing tabung reaksi, tabung pertama ditambahkan pereaksi Dragendorff terbentuk endapan merah bata, sedangkan tabung kedua ditambahkan pereaksi Mayer terbentuk endapan putih yang menunjukkan positif alkaloid (Farnsworth, 1966:247-254).

4.4.2. Flavonoid

Simplisia dicampur dengan serbuk magnesium dan HCl 2 N. campuran dipanaskan diatas tangas air, lalu disaring. Kedalam filtrat dalam tabung reaksi ditambahkan amil alkohol, lalu kocok kuat. Adanya flavonoid ditandai dengan terbentuknya warna kuning hingga merah yang dapat ditarik oleh amil alkohol (Farnsworth, 1966:263).

4.4.3. Saponin

Sebanyak 10 ml larutan A dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu dikocok vertikal selama 10 detik. Jika busa dengan tinggi 1 cm stabil selama 10 menit, maka pengujian dilanjutkan dengan menambahkan 2 tetes HCl 2N. Jika busa tersebut tetap tidak hilang maka di dalam simplisia terkandung saponin (Farnsworth, 1966:258).

4.4.4. Polifenol dan Tannin

Simplisia ditambahkan air, kemudian dididihkan selama beberapa menit didalam tabung reaksi. Selanjutnya disaring, filtrat dibagi menjadi dua bagian.

Filtrat 1 : ditetaskan larutan pereaksi besi (III) klorida. Adanya warna biru hingga hitam menunjukkan adanya senyawa golongan polifenol.

Filtrat 2 : ditetaskan larutan gelatin, lalu diamati terjadinya pengendapan atau penggumpalan. Adanya penggumpalan menunjukkan bahwa dalam filtrat terkandung senyawa golongan tannin. Endapan gelatin disaring. Filtrat ditetesi larutan pereaksi besi (III) klorida. Bila terbentuk warna hitam, berarti bahwa dalam bahan tersebut terkandung golongan tanin dan polifenol (Farnsworth, 1966:255-265).

4.4.5. Kuinon

Sebanyak 5 ml larutan A dalam tabung reaksi ditambahkan beberapa tetes larutan NaOH 1 N. terbentuknya warna kuning hingga merah menunjukkan adanya golongan senyawa kuinon (Farnsworth, 1966:265-266)..

4.4.6. Steroid dan triterpenoid

Simplisia digerus sambil ditambahkan eter. Kemudian di saring dan filtratnya ditempatkan pada cawan penguap untuk dibiarkan menguap. Ditambahkan peraksi Liebermann-Burchard. Terjadinya warna merah-ungu

menandakan positif triterpenoid, sedangkan bila warna hijau-biru menunjukkan positif steroid (Farnsworth, 1966:259-260).

4.4.7. Monoterpen dan sesquiterpenoid

Simplisia digerus sambil ditambahkan eter. Kemudian disaring dan filtratnya ditempatkan pada cawan penguap untuk dibiarkan menguap. Ditambahkan larutan vanillin 10% dalam HCl pekat. Timbulnya warna-warna menandakan positif senyawa monoterpen dan sesquiterpenoid (Depkes RI, 1977:132).

4.5. Pembuatan Media *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA)

Media pertumbuhan yang digunakan adalah *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) dimana pembuatan media SDA yaitu dengan melarutkan 65 gram serbuk SDA kedalam 1 liter aquadest kedalam Erlenmeyer dan dilakukan sterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121⁰C selama 15 menit. (Kursini Dewi ,dkk, 2006).

4.6. Penyiapan *Candida albicans*

Candida albicans didapatkan dari Laboratorium Farmasi Terpadu Unit D, Fakultas MIPA, Program Studi Farmasi, Universitas Islam Bandung. Dipelihara dalam agar miring, selama 24 - 48 jam pada suhu 37⁰C. satu ose

koloni fungi disuspensikan ke dalam 5 ml NaCl fisiologis steril (Anggara, E.D, dkk., 2014). Kekeruhan fungi dalam suspensi tersebut diukur berdasarkan kekeruhannya menggunakan spektrofotometer, sampai mendapatkan absorbansi 0,12-0,15 pada panjang gelombang 530 nm. (Rathi, S.G, 2010).

4.7. Uji Aktivitas Antifungi terhadap *Candida albicans*

Pengujian aktivitas antifungi meliputi penetapan konsentrasi minimum (KHM) dan penetapan kesetaraan aktivitas antifungi bahan uji dengan pembanding.

4.7.1. Penetapan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM)

Pengujian aktivitas antifungi meliputi penetapan konsentrasi hambat minimum (KHM) menggunakan metode difusi agar dengan cara perforasi. Media SDA yang sudah disterilisasi, dicairkan hingga mencapai suhu 45-50°C. Setelah cair, media SDA cair sebanyak 20 ml dicampur dengan 0,5 ml suspensi *Candida albicans* ke dalam cawan petri. Cawan petri diputar searah jarum jam untuk meratakan campuran inokulum dan media agar. Kemudian dibiarkan memadat. Setelah media memadat, masing-masing cawan petri dilubangi menggunakan alat perforator 0,6 cm. Ke dalam masing-masing lubang dimasukkan larutan ketokonazol atau ekstrak biji pala yang sudah diencerkan dalam DMSO (dimetilsulfoksida) dengan konsentrasi bertingkat

50%; 25%; 12,5%; 6,25%; 3,125 dan 1,56%. Biakan jamur diinkubasi selama 24 - 48 jam pada suhu 37°C. Daerah bening yang terbentuk disekitar lubang yang diindikasikan sebagai daerah hambatan terhadap jamur uji.

4.7.2. Penetapan Kesetaraan Aktivitas Larutan Uji dengan Antijamur Pemanding

Uji ini dilakukan untuk mengetahui sejauh mana kekuatan atau daya antifungi sampel bila dibandingkan suatu pemanding. Prinsipnya adalah dengan membandingkan respon yang dihasilkan oleh zat antifungi baku pada kondisi yang sama. Respon tersebut berupa hambatan terhadap pertumbuhan jamur. Uji banding suatu sampel dilakukan dengan cara membuat suatu grafik atau kurva pemanding. Logaritma konsentrasi digambarkan terhadap sumbu x dan diameter hambat digambarkan terhadap sumbu y. berdasarkan kurva ini dapat diperoleh nilai konsentrasi sampel diameter hambat yang dihasilkan dari nilai diameter hambat sampel pada konsentrasi yang ditetapkan.

(Primiyanti, 2012)