

BAB IV

PROSEDUR KERJA

4.1. Penyiapan Simplisia

Bahan berupa simplisia daun sambiloto diperoleh dari CV. Merapi Farma Herbal, Sleman Yogyakarta. Determinasi bahan uji dilakukan di Bagian Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi UGM, Yogyakarta.

4.2. Penapisan Fitokimia

Penapisan fitokimia dilakukan pada simplisia lengkuas merah dan ekstrak etanol lengkuas merah meliputi alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, steroid dan triterpenoid, kuinon, monoterpen dan seskuiterpen.

4.2.1. Alkaloid

Sebanyak 2 g sampel ditambahkan dengan 5 mL amonia 25% kemudian digerus dalam mortar, ditambahkan 20 mL kloroform dan digerus kuat-kuat. Campuran disaring dan filtrat digunakan untuk percobaan (larutan A). Larutan A ditetaskan pada kertas saring dan diberi pereaksi Dragendorff. Warna merah jingga yang timbul pada kertas saring menunjukkan alkaloid positif. Sisa larutan A diekstraksi dua kali dengan asam klorida 10% lalu lapisan air atau fraksi asamnya dipisahkan (larutan B). Masing-masing 5 ml larutan B dalam tabung reaksi diuji dengan pereaksi Meyer, selama 15 menit dan hasil positif pada uji dengan pereaksi Dragendorff bila terbentuk endapan merah bata yang bertahan selama 15 menit (Farnsworth, 1966:245).

4.2.2. Flavanoid

Sejumlah 1 gram sampel ditambahkan dengan 100 ml air panas, dididihkan selama 15 menit, kemudian disaring. Filtrat (larutan C) juga digunakan untuk pemeriksaan saponin. Larutan C sebanyak 5 ml serbuk magnesium, asam klorida dan amil alkohol, dikocok dengan kuat-kuat dan kemudian dibiarkan memisah. Terbentuknya warna jingga sampai merah muda pada lapisan amil alkohol menunjukkan adanya flavonoid (Farnsworth, 1966:263).

4.2.3. Saponin

Larutan C sebanyak 10 ml dalam tabung reaksi dikocok vertikal selama 10 detik, kemudian dibiarkan selama 10 menit. Terbentuknya busa yang menetap selama tidak kurang dari 10 menit dengan tinggi 1 cm maka saponin positif. Busa ditambah dengan asam klorida 2 N beberapa tetes, apabila busa tidak hilang maka positif mengandung saponin (Farnsworth, 1966:257).

4.2.4. Tanin

Sejumlah kecil sampel dalam tabung reaksi dipanaskan di atas penangas air, kemudian disaring menggunakan kertas saring. Filtrat yang diperoleh ditambahkan larutan gelatin 1 % segar. Adanya senyawa tanin ditandai dengan adanya endapan putih (Farnsworth, 1966:264).

4.2.5. Triterpenoid dan steroid

Sampel digerus dengan 20 mL eter kemudian disaring. Filtrat sebanyak 5ml dibiarkan menguap dalam cawan penguap, ditambahkan pereaksi Liebermann-Burchard. Terbentuknya warna biru sampai hijau menunjukkan

steroid positif. Warna merah sampai ungu menunjukkan triterpenoid positif (Farnsworth, 1966:258-259).

4.2.6. Monoterpenoid/seskuiterpenoid

Ekstrak ditambahkan eter, dipipet sambil disaring. filtrat ditempatkan dalam cawan penguap kemudian dibiarkan menguap hingga kering. Ke dalam hasil filtrat ditambahkan larutan vanillin 10% dalam H₂SO₄ pekat. Terjadi warna-warn menunjukkan mono dan seskuiterpenoid (Farnsworth, 1966:132).

4.2.7. Kuinon

Satu spatel sampel ditempatkan pada tabung reaksi, ditambahkan air secukupnya, dan dipanaskan di atas penangas air kemudian disaring dengan menggunakan kertas saring. Filtrat yang diperoleh ditambahkan larutan natrium hidroksida atau kalium hidroksida 5%. Apabila timbul warna kuning sampai merah menandakan positif kuinon (Farnsworth, 1966:265).

4.3. Penentuan Kadar Air

Simplisia sebanyak 2 g dimasukkan ke dalam labu kering 500 mL, lalu ditambahkan kurang lebih 200 mL toluena, dan alat dihubungkan. Setelah itu mulai mendidih, disuling dengan kecepatan lebih kurang 2 tetes tiap detik, hingga sebagian air tersuling.

Kemudian dinaikkan kecepatan penyulingan hingga 4 tetes tiap detik. Setelah semua air tersuling, dicuci bagian dalam pendingin dengan toluena, sambil dibersihkan dengan sikat tabung yang disambungkan pada sebuah kawat tembaga dan lebih dibasahi dengan toluena. Selanjutnya dilakukan penyulingan

selama 5 menit. Lalu dibiarkan tabung penerima pendingin hingga suhu kamar. Jika ada tetes air yang melekat pada pendingin tabung penerima, digosok dengan karet yang diikatkan pada kawat tembaga dan dibasahi dengan toluena hingga tetesan air turun. Setelah air dan toluena memisah sempurna, dibaca volume air dan dihitung kadar air dalam persen (DepKes RI, 1995:1035).

4.4. Penetapan Kadar Abu

Pada penetapan kadar abu dibagi menjadi penetapan kadar abu total dan penetapan kadar abu tidak larut asam.

a. Penetapan kadar abu total

Kurang lebih 2 g sampai 3 g zat yang telah digerus dan ditimbang seksama, masukkan ke dalam krus platina atau krus silikat yang telah dipijarkan dan ditara, ratakan. Pijarkan perlahan-lahan hingga arang habis, dinginkan, timbang. Hitung kadar abu terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Depkes RI, 1995:1043).

b. Penetapan kadar abu tidak larut dalam asam

Abu yang diperoleh dari penetapan kadar abu, dididihkan dengan 25 mL HCl encer P selama 5 menit, kumpulkan bagian yang tidak larut dalam asam, saring melalui krus kaca masir atau kertas saring bebas abu, cuci dengan air panas, pijarkan hingga bobot tetap, timbang. Hitung kadar abu yang tidak larut dalam asam terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Depkes RI, 1995:1043).

4.5. Pembuatan Ekstrak

Ekstrak etanol dibuat dengan cara sejumlah simplisia dimaserasi dengan etanol 96% selama tiga kali dua puluh empat jam. Setiap 24 jam filtrat dikumpulkan dan sampel direndam kembali dengan pelarut etanol yang baru. Kemudian ekstrak ditampung dalam labu erlenmeyer, kemudian ekstrak tersebut pelarutnya diuapkan dengan menggunakan *rotary vaccum evaporator*.

Rendemen ekstrak dihitung dengan rumus :

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak kental}}{\text{Berat Simplisia}} \times 100\% \quad (1)$$

4.6. Pembuatan Media Pertumbuhan Jamur

Media SDA (*Sabouraud Dextrose Agar*) dibuat dari serbuk agar SDA sebanyak 65 g dilarutkan dalam 1000 mL aquadest dalam erlenmeyer. Lalu ditambahkan minyak zaitun sebanyak 1% untuk menunjang pertumbuhan *Malassezia* sp dan ditambahkan kloramfenikol untuk menghambat mikroba lain sebanyak 50 µL. Untuk media *Candida albicans* tidak diberikan minyak zaitun. Kemudian seluruh erlenmeyer dipanaskan hingga mendidih. Setelah mendidih diangkat lalu disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

4.7. Penyiapan Jamur Uji

Pada jamur *Malassezia* sp. dipelihara dalam agar miring selama 3 hari pada suhu 29°C dan untuk jamur *Candida albicans* dipelihara dalam agar miring selama 2 hari pada suhu 25°C. Satu ose koloni dari masing-masing fungi

disuspensikan ke dalam 10 mL NaCl P 0,9% steril dalam 2 tabung reaksi berbeda. Sehingga didapatkan 2 suspensi inokulum jamur.

Untuk penetapan, diencerkan sebagian suspensi persediaan dengan penambahan sejumlah larutan NaCl P 0,9% steril dan ukur transmitannya pada panjang gelombang 580 nm. Kemudian diatur perbandingan hingga inokula mempunyai transmittan sebesar 25% terhadap larutan NaCl P 0,9% steril sebagai blanko (Depkes RI, 1995:896).

4.8. Uji Aktivitas Antifungi Terhadap *Malassezia* sp. dan *Candida albicans*

Sterilisasi alat, aquades, dan media SDA dilakukan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Kemudian dibuat lempeng agar dengan cara 19 mL agar (SDA) cair ditambah dengan 100 µL inokulum *Malassezia* sp. dan *Candida albicans*, dituangkan ke dalam cawan petri berbeda, dihomogenkan lalu dibiarkan sampel menjadi padat. Kemudian agar yang sudah memadat dengan menggunakan perforator dibuat lubang-lubang perforasi sebesar 7 mm. Setelah itu masukkan larutan uji ekstrak etanol daun sambiloto dengan konsentrasi 0,5; 1; 2,5; 5; 10; dan 20% sebanyak 40 µL. Cawan petri diinkubasi pada suhu 25°C untuk *Candida albicans* dan 29°C untuk *Malassezia* sp. selama 2-3 hari kemudian diameter hambat diamati.

4.8.1. Penentuan KHM (Konsentrasi Hambat Minimum) ekstrak etanol daun sambiloto

Lempeng agar dibuat dengan cara 19 mL agar SDA cair dicampur dengan 100 μ L inokulum *Malassezia* sp. dan *Candida albicans*, dituangkan ke dalam cawan petri berbeda, dihomogenkan lalu dibiarkan sampai menjadi padat. Kemudian agar yang sudah memadat dengan menggunakan perforator dibuat lubang-lubang perforasi sebesar 7 mm. Setelah itu kedalam masing-masing lubang dimasukkan larutan uji dengan penurunan konsentrasi dari hasil penentuan uji aktivitas sebanyak 40 μ L. Cawan petri diinkubasi pada suhu 25°C untuk *Candida albicans* selama 2 hari dan 29°C untuk *Malassezia* sp. selama 3 hari kemudian diameter hambat diamati.

4.8.2. Uji potensi antifungi ketokonazol terhadap sediaan uji

Antijamur pembanding yaitu ketokonazol sebanyak 50 mg dilarutkan dalam 50 mL DMSO (konsentrasi 1000 ppm), dibuat pengenceran dengan penambahan DMSO sehingga diperoleh larutan ketokonazol 1000, 800, 600, 400, 200, dan 100 ppm. Lempeng agar dibuat dengan cara 19 ml agar SDA cair dicampur dengan 1 ml inokulum *Malassezia* sp. dan *Candida albicans* dituangkan ke dalam cawan petri, dihomogenkan lalu dibiarkan sampai menjadi padat. Kemudian agar yang sudah memadat dengan menggunakan perforator dibuat lubang-lubang perforasi sebesar 7 mm. Masukkan larutan ketokonazol dengan konsentrasi 1000, 800, 600, 400, 200, dan 100 ppm sebanyak 40 μ L. Cawan petri diinkubasi pada suhu 25°C untuk *Candida albicans* selama 2 hari dan 29°C untuk *Malassezia* sp. selama 3 hari, kemudian diameter hambat diamati.

Uji ini dilakukan untuk mengetahui sejauh mana kekuatan atau daya antifungi sampel bila dibandingkan suatu pembanding. Prinsipnya adalah dengan membandingkan respon yang dihasilkan oleh zat antifungi baku pada kondisi yang sama. Respon tersebut berupa hambatan terhadap pertumbuhan fungi. Uji banding suatu sampel dilakukan dengan cara membuat suatu grafik atau kurva baku dari pembanding. Logaritma konsentrasi digambarkan terhadap sumbu-x dan diameter hambat digambar terhadap-y, berdasarkan kurva ini dapat diperoleh nilai konsentrasi yang ditetapkan, sehingga dapat pula ditetapkan nilai uji banding sampel terhadap sampel terhadap zat pembanding (Mayasari, 2007:27).