

BAB III BAHAN DAN METODA

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan selama lebih kurang enam bulan di laboratorium Organik dan laboratorium Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Riau.

3.2 Bahan dan Alat yang Digunakan

3.2.1 Alat-alat yang Digunakan

Alat destilasi, *rotary evaporator*, inkubator, autoklaf, kertas saring Whatman 42, oven, pipet mikro, dan alat-alat gelas lain sesuai dengan prosedur kerja.

3.2.2 Bahan-bahan yang Digunakan

Bahan hidup : *Candida albicans* dan *Staphylococcus aureus* yang diperoleh dari laboratorium Kimia Organik FMIPA Kimia Universitas Riau.

Bahan Kimia : Daging buah mengkudu, n-hexan, etil asetat, butanol, reagen Meyer, Reagen Dragendorff, agar batang, kentang, glukosa, Nutrient agar, Nutrient broth, Pepton water, dan bahan-bahan kimia lain sesuai prosedur kerja.

3.3 Metodologi Penelitian

Masing-masing ekstrak buah mengkudu (n-heksan, etil asetat, butanol, dan jus) diuji aktivitas anti bakteri dan anti jamur terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Candida albicans* menggunakan metode difusi kertas saring (cakram). Kemudian setelah diperoleh ekstrak mengkudu yang memiliki aktivitas antijamur dan antibakteri optimum, maka ekstrak tersebut dibuat dalam bentuk sediaan salep. Masing-masing sediaan diuji kembali aktivitas antijamur dan antibakterinya dengan metoda difusi sumur. Selanjutnya dilakukan uji karakteristik fisik antara lain homogenitas, pemeriksaan pH, pemeriksaan stabilitas dengan pendinginan, serta pemeriksaan iritasi dan kepekaan kulit.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Penanganan Sampel

Sampel yang digunakan adalah mengkudu mengkal dan matang yang terdapat di daerah Pekanbaru. Mengkudu yang sudah matang dihancurkan daging buahnya dan diperas sehingga diperoleh jus buah segarnya. Sampel ini digunakan dalam keadaan segar. Sedangkan sampel mengkudu mengkal dipotong tipis menggunakan pisau cutter atau alat pembuat keripik. Sampel yang sudah dipotong kemudian dikeringanginkan selama ± 2 hari dan dikeringkan lagi dengan menggunakan oven pada temperatur 35° - 40°C selama ± 2 hari. Sampel kering kemudian diblender hingga halus dan disimpan dalam wadah kering yang tertutup.

3.4.2 Uji Fitokimia

Pada sampel basah dan kering buah mengkudu dilakukan uji fitokimia dengan prosedur sebagai berikut:

a. Uji alkaloid

Sampel digerus dengan menggunakan lumpang hingga halus, kemudian ditambahkan 3 mL CHCl_3 dan 3 mL CHCl_3 beramonia. Filtratnya dipipet dengan pipet tetes yang ujungnya dilapisi dengan kapas dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Filtrat ditambahkan dengan H_2SO_4 2N dan dikocok. Lapisan asam (bagian atas) diuji dengan pereaksi Meyer dan pereaksi Dragendorff. Bila ada alkaloid maka akan terbentuk endapan putih dengan pereaksi Meyer dan terbentuk endapan cokelat kemerahan dengan pereaksi Dragendorff.

b. Uji terpenoid dan steroid

Sampel dipotong kecil dan ditambah dengan etanol secukupnya dan dididihkan. Setelah mendidih, disaring dan filtratnya didinginkan. Filtrate ditambahkan dengan CHCl_3 dan air kemudian dikocok dan didiamkan hingga terbentuk 2 lapisan. Lapisan CHCl_3 (lapisan bawah) ditambah pereaksi Liebermann-Burchard (asam asetat anhidrat dan asam sulfat pekat). Bila terbentuk warna hijau atau ungu, maka sampel mengandung steroid. Jika terbentuk warna merah kecoklatan menunjukkan adanya terpenoid.

c. Uji fenolik

Sampel ditambah dengan etanol kemudian dididihkan. Ekstraknya dipipet dengan pipet tetes yang ujungnya dilapisi kapas. Ekstrak didinginkan kemudian ditambah dengan FeCl_3 . Terbentuknya endapan menunjukkan adanya fenolik.

d. Uji flavonoid

Lapisan etanol air (lapisan atas) pada uji terpenoid dan steroid dipipet kemudian ditambahkan HCl pekat. Kemudian ditambahkan sedikit logam Mg. timbulnya warna merah menunjukkan adanya flavonoid.

e. Uji saponin

Lapisan etanol air dikocok. Bila terbentuk busa stabil selama 5 menit, maka sampel mengandung saponin.

3.4.3 Ekstraksi Sampel Mengkudu

Sebanyak 737,2 gram sampel kering dimaserasi dengan menggunakan pelarut n-heksan selama 48 jam dan diultrasonikasi selama 30 menit. Filtrat yang diperoleh ditampung kemudian diuapkan dengan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental n-heksan. Maserasi dilakukan sebanyak 3 kali dan ekstrak kental ditampung dalam pial.

Kemudian residu dimaserasi lagi dengan pelarut etil asetat dengan cara yang sama. Filtrat kemudian ditampung dan diuapkan dengan *rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak kentalnya. Setelah itu residu kembali dimaserasi dengan pelarut butanol dan filtratnya diuapkan hingga diperoleh ekstrak kentalnya. Setiap ekstrak yang diperoleh disimpan dalam wadah tertutup sampai waktunya sampel diuji aktivitas antibakteri dan antijamurnya.

Sampel jus diperoleh dari mengkudu yang sudah matang dan dihancurkan kemudian diperas hingga diperoleh sari mengkudunya. Sampel ekstrak dari jus mengkudu diencerkan dengan menggunakan air dan digunakan dalam kondisi segar.

3.5 Peremajaan Mikroba

Peremajaan mikroba dilakukan untuk mengaktifkan kembali mikroba yang terdapat pada agar miring (stok) ke media tanam yang baru berupa nutrient agar



untuk *Staphylococcus aureus* dan PDA untuk *Candida albicans*. Hal ini bertujuan agar dapat memperoleh mikroba yang berada pada umur produktif atau memiliki kondisi optimum.

3.5.1 Peremajaan *Staphylococcus aureus*

Media nutrient agar disiapkan sesuai dengan prosedur kemasan, kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditutup dengan kapas kasa. Media diautoklaf selama 15 menit. Tabung reaksi yang berisi media dimiringkan dan dibiarkan mengeras selama 24 jam. Media kemudian digoreskan dengan satu ose bakteri stok dan diinkubasi dalam inkubator pada temperatur 37°C selama 24 jam. Semua perlakuan dilaksanakan secara aseptik.

3.5.2 Peremajaan *Candida albicans*

Media *potato dextro agar* (PDA) dipersiapkan dengan cara mengiris 40 gram kentang dan masukkan ke dalam 50 mL air, didihkan selama 20 menit, kemudian disaring dengan kain kasa. Filtrat yang diperoleh dicampur 4 gram glukosa. Tambahkan air hingga volume 200 mL, kemudian tambahkan 3,4 gram agar dan panaskan sampai agarnya larut. Kemudian media diautoklaf selama 15 menit. Media PDA yang masih cair dimasukkan ke dalam cawan petri dan dibiarkan memadat selama 30 menit. Media yang memadat di dalam cawan petri dibalikkan dan didiamkan selama 24 jam. Satu ose jamur stok digoreskan ke media PDA yang ada pada cawan petri kemudian diinkubasi selama 48 jam pada temperatur 37°C.. Semua perlakuan dilaksanakan secara aseptik.

3.6 Uji Aktivitas Antimikroba Ekstrak Mengkudu dengan Metode Difusi Cakram

Uji antimikroba dilakukan terhadap ekstrak n-heksan, etil asetat, dan butanol, dan jus mengkudu matang dengan konsentrasi 1%, 3%, 5% dan 7 %. Uji antimikroba dilakukan terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Candida albicans* yang merupakan mikroba patogen yang terdapat pada kulit.

3.6.1 Uji Aktivitas Antibakteri

Media *nutrient broth* dibuat sesuai dengan prosedur pada label dan disterilkan dengan autoklaf selama 15 menit. Jarum ose yang sudah disterilkan

digoreskan pada agar miring yang berisi bakteri. Kemudian jarum ose tersebut dicelupkan ke dalam tabung reaksi berisi *nutrient broth* dan diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam. Satu mL bakteri yang diremajakan dalam *nutrient broth* dipipet ke dalam cawan petri. Dituangkan 40 mL *nutrient agar* yang dipersiapkan sesuai prosedur kemasan ke dalam cawan petri. Media dibiarkan memadat, kemudian diletakkan kertas cakram berdiameter 6 mm yang sudah ditetesi 10µL ekstrak mengkudu (n-heksan, etil asetat, butanol, dan jus). Kemudian diinkubasi dengan inkubator selama 24 jam pada suhu 37°C dengan membalikkan cawan petri. Selanjutnya diamati zona bening yang terbentuk disekitar kertas cakram dan dihitung diameternya. Prosedur ini diulang sebanyak dua kali dan dilakukan secara aseptik.

3.6.2 Uji Aktivitas Antijamur

Media PDA yang ditumbuhi oleh fungi dipotong dengan ukuran 1x1 cm dan dimasukkan ke dalam tabung berisi *water pepton* yang disiapkan sesuai prosedur. Kemudian tabung digoyang secara perlahan agar spora fungi tersuspensi ke larutan. Suspensi diinkubasi selama 48 jam pada temperature 37°C. Dua mL larutan *water pepton* yang mengandung spora *Candida albicans* dipipet ke dalam cawan petri. PDA yang sudah dicairkan pada suhu 50°C dituangkan ke dalam cawan petri sebanyak 40 mL kemudian digoyang memutar secara perlahan agar spora tersebar. PDA dibiarkan memadat, kemudian diletakkan kertas cakram berdiameter 6 mm yang sudah ditetesi 10µL ekstrak mengkudu (n-heksan, etil asetat, butanol, dan jus). Cawan petri dibalikkan dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Selanjutnya diamati zona bening yang terbentuk disekitar kertas cakram dan diukur diameternya. Pengerjaan dilakukan sebanyak dua kali dan aseptik.

3.7 Pembuatan Sediaan Salep

Penggunaan dasar salep didasari oleh ekstrak mengkudu yang memiliki aktivitas optimum agar bahan dasar salep dapat bercampur sempurna dengan bahan aktif dari ekstrak mengkudu tersebut. Bahan-bahan untuk pembuatan salep dileburkan sesuai dengan fase larutnya kemudian dicapur dengan menggunakan lumpang dan alu serta ditambahkan dengan ekstrak mengkudu sebagai bahan aktif

antimikrobanya. Semua bahan dicampur hingga rata dan kemudian disimpan dalam wadah tertutup.

Tabel 3. Variasi dasar salep

Bahan	F1a	F2a	F3a	F4a
Metil paraben	0,0125 gr	0,0125 gr	0,0125 gr	0,0125 gr
Propil paraben	0,0075 gr	0,0075 gr	0,0075 gr	0,0075 gr
Natrium laurel sulfat	1 gr	1 gr	1 gr	1 gr
Propilen glikol	6 mL	6 mL	6 mL	6 mL
Alkohol stearat	6,5 gr	5,5 gr	4,5 gr	3,5 gr
Vaselin putih	12,5 gr	13,5 gr	14,5 gr	15,5 gr
Akuades	24 mL	24 mL	24 mL	24 mL

Tabel 4. Variasi salep aktif

Bahan	F1b	F2b	F3b	F4b
Metil paraben	0,0125 gr	0,0125 gr	0,0125 gr	0,0125 gr
Propil paraben	0,0075 gr	0,0075 gr	0,0075 gr	0,0075 gr
Natrium laurel sulfat	1 gr	1 gr	1 gr	1 gr
Propilen glikol	6 mL	6 mL	6 mL	6 mL
Alkohol stearat	6,5 gr	5,5 gr	4,5 gr	3,5 gr
Vaselin putih	12,5 gr	13,5 gr	14,5 gr	15,5 gr
Jus mengkudu	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL
Akuades	23,5 mL	23,5 mL	23,5 mL	23,5 mL

3.8 Uji Aktivitas Antimikroba dari Salep dengan Metoda Difusi Sumur

Uji aktivitas antimikroba dilakukan dengan menguji salep yang sudah ditambahkan dengan ekstrak yang memiliki aktivitas antimikroba optimum terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Candidia albicans* dengan menggunakan metoda difusi sumur (lubang). Media padat, yang telah dicampur dengan suspensi bakteri atau jamur, dilubangi dengan alat pelubang media (agar). Kemudian lubang yang telah terbentuk diisi dengan sediaan salep yang sudah dibuat. Kemudian diinkubasi selama 24 jam untuk bakteri dan 48 jam untuk jamur di dalam inkubator pada temperatur 37°C. Kemudian diukur diameter zona bening yang terbentuk.

3.9 Uji Karakteristik Fisik Salep

3.9.1 Homogenitas

Pemeriksaan dilakukan dengan cara menimbang 0,1 gram salep kemudian dioleskan pada sekeping kaca transparan dengan tipis dan merata sehingga dapat dilihat salep memiliki susunan yang homogen atau tidak.

3.9.2 Pemeriksaan pH

Pemeriksaan ini dilakukan dengan menggunakan pH meter yang terlebih dahulu dikalibrasi menggunakan larutan buffer dengan pH 4 dan 7. 1 gram salep diencerkan dengan menggunakan 10 mL aquadest hingga larut dan diukur pH larutan tersebut dengan pH meter.

3.9.3 Pemeriksaan Stabilitas dengan Pendinginan

Salep dimasukkan ke dalam lemari pendingin dengan temperature -5°C selama 24 jam, kemudian dibiarkan pada temperatur ruang. Salep yang stabil tidak akan menunjukkan adanya pemisahan.

3.9.4 Uji Iritasi Terhadap Kulit

Salep sebanyak 0,1 gram dioleskan pada lengan atas bagian dalam dengan diameter 2 cm, kemudian ditutup dengan kain kasa. Setelah 24 jam diamati gejala yang timbul. Pemeriksaan ini dilakukan terhadap 5 orang panelis.

3.10 Analisis Data

Data yang diperoleh berupa diameter zona bening yang merupakan bukti dari zat uji memiliki aktivitas antimikroba terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Candida albicans* serta beberapa data hasil uji karakteristik fisik dari salep. Data ini kemudian diaplikasikan dalam bentuk tabel dan gambar.