

III. BAHAN DAN METODE

3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kimia Organik dan Laboratorium Biokimia, Jurusan Kimia, FMIPA, Universitas Riau selama kurang lebih 9 (sembilan) bulan.

3.2. Alat dan Bahan

3.2.1. Alat

Alat-alat yang akan digunakan pada penelitian ini adalah peralatan gelas yang biasa digunakan di laboratorium kimia serta ditunjang juga dengan peralatan lainnya seperti alat-alat untuk ekstraksi dan evaporasi, indikator universal, pH meter digital, viskometer, dan plat KLT GF₂₅₄, dan peralatan lainnya yang sesuai dengan prosedur kerja.

3.2.2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah umbi, batang, dan daun Dahlia dengan bunga warna merah dan putih, pelarut-pelarut p.a (*pro analysis*), pelarut-pelarut teknis yang sudah didestilasi (n-heksan, metanol), kloroform, etanol absolut, etil asetat, Silika gel GF₂₅₄, media Sabouraud Dextrose Agar (SDA), Potato Dektrosa Agar (PDA), Nutrient Broth, Nutrient Agar, *Peptone Water* (WP), vaselin album, paraffin liquidum, asam oleat, gliserin, basis Cera Alba (Sumber Chemica), Cutina® MD (PT. Cognis), Eumulgin® B1 (PT. Cognis), Metilparaben, Natrium Tetraborat (Brataco), dan Paraffin cair, serta bahan-bahan kimia lain yang sesuai dengan prosedur kerja.

3.3. Metode Penelitian

Tahapan penelitian ini adalah (1) maserasi dengan pelarut n-heksana, (2) Evaporasi ekstrak n-heksana yang sebelumnya diultrasonikasi, (3) Residu n-heksana kemudian dimaserasi lagi dengan pelarut metanol, (4) Evaporasi ekstrak metanol yang

sebelumnya diultrasonikasi, (5) Ekstrak n-heksana dan ekstrak metanol yang didapat dilakukan uji antijamur dengan menggunakan kontrol klotrimazol, (6) kemudian ekstrak kering n-heksana dan ekstrak metanol diVLC, (7) Fraksi-fraksi hasil VLC ini kemudian di kromatografi KLT, dilakukan uji antijamur dan antibakteri untuk menentukan fraksinat aktif, dan ditentukan Konsentrasi Hambat Tumbuh Minimumnya. Tiap tahapan dilakukan untuk masing-masing sample dari dahlia yang berwarna merah dan putih.

3.4. Prosedur Penelitian

3.4.1. Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah umbi, batang, dan daun dahlia (*Dahlia Variabilis*) bunganya berwarna merah dan putih yang sudah berumur setahun atau lebih yang diambil dari daerah Batusangkar dan Payakumbuh, Sumatera Barat, dan dari daerah Kabanjahe dan Brastagi.

3.4.2. Ekstraksi

Umbi, batang, dan daun dahlia (*Dahlia variabilis*) yang bunganya berwarna merah dan putih dibersihkan dan dipotong tipis kemudian dikeringkan. Setelah kering, masing-masingnya dihaluskan sampai menjadi bubuk. Sampel kering berupa bubuk halus kemudian dimaserasi dengan pelarut n-heksana. Maserat yang diperoleh ditampung dan kemudian pelarut diuapkan dengan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental n-heksana.

Kemudian residu dimaserasi lagi dengan cara yang sama menggunakan pelarut yang lebih polar yakni dengan metanol, kemudian ekstrak yang diperoleh diuapkan pelarutnya dengan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental metanol.

3.4.3. Uji Aktivitas Antijamur Ekstrak n-heksan dan Ekstrak Metanol

Spora jamur disuspensikan dalam media *Water Pepton* dan sebanyak 1 ml dimasukkan ke dalam petridis kemudian ditambahkan media *Potato Dextrose Agar* (PDA) pada suhu 45°C. Setelah agar membeku, dimasukkan kertas cakram (diameter 6 mm) yang telah dibasahi ekstrak n-heksana dan ekstrak metanol dengan konsentrasi 2%, 4%, 6%, 8% dan 10% yang telah dilarutkan dalam etanol absolut (Yuharmen dkk, 2002).

Sebagai kontrol pada masing-masing cawan petri dimasukkan kertas cakram yang telah dibasahi dengan etanol absolut. Cawan petri ini diinkubasi dengan cara terbalik selama 24 jam pada suhu 35-37°C. Daerah bening di sekitar kertas cakram menunjukkan uji positif, diameter daerah bening yang diperoleh diukur dan dibandingkan dengan senyawa standar klotrimazol. Uji ini dilakukan pada kedua jenis jamur uji dengan tiga kali pengulangan. Semua uji dilakukan secara aseptik. Dari pengujian ini akan diketahui ekstrak mana yang mempunyai aktifitas antijamur.

3.4.4. Pemisahan Ekstrak Aktif terhadap Jamur Uji dengan Proses Kromatografi Vakum cair (VLC)

Pada kromatografi vakum cair pertama kali dilakukan pembuatan kolom dengan menggunakan silika gel 230-400 mesh tanpa dibasahi pelarut atau dibuat dalam keadaan kering. Agar kemasan silika gel kerapatannya maksimum digunakan vakum. Pemisahan dengan kromatografi vakum cair ini dilakukan pada ekstrak metanol dan ekstrak n-heksana. Untuk 50 gram silika gel, ekstrak yang digunakan adalah sebanyak 15 gram.

Ekstrak yang mempunyai aktivitas antijamur akan dipisahkan melalui proses preadsorpsi terlebih dahulu. Setelah kolom kering dibuat, ekstrak yang telah dipreadsorpsi dimasukkan ke dalam kolom dan diatas sampel diberi sedikit silika gel agar sampel rata. Setelah kemasan kolom selesai, pemisahan dapat dilakukan dengan menambahkan pelarut mulai dari n-heksana 100%, n-heksana : etil asetat sampai etil asetat: metanol (5:5). Hasil pemisahan dapat ditampung dalam erlenmeyer. Kemudian hasil ini dievaporasi dan dibiarkan sampai pelarutnya menguap.

3.4.5. Pengujian hasil pemisahan KLT

Plat yang telah ditotolkan dengan ekstrak aktif terhadap jamur uji dimasukkan ke dalam bejana eluen yang telah jenuh dengan campuran antara kloroform:metanol (2:1). Setelah eluen sampai ke garis batas atas plat, plat dikeluarkan dari bejana, dan kemudian pelarutnya dibiarkan mengering. Noda pada plat dilihat dengan lampu ultraviolet (UV) atau dengan reagen penampak noda. Rf masing-masing noda kemudian diukur, harga Rf yang sama digabungkan menjadi satu fraksi.

3.4.6. Penentuan Konsentrasi Hambat Tumbuh Minimum (KHTM)

Pada masing-masing fraksi ekstrak n-heksana dan ekstrak metanol hasil kromatografi kolom dilakukan penentuan konsentrasi hambat tumbuh minimum (KHTM) menggunakan metode sumur. Dibuat larutan stok dari sampel untuk kemudian divariasikan konsentrasinya dengan melarutkannya dalam etanol absolut. Sampel dimasukkan ke dalam sumur yang telah mengandung biakan jamur dalam cawan petri steril. Kemudian cawan petri diinkubasi pada suhu 27°C.

Adanya hambatan terhadap pertumbuhan jamur terlihat sebagai daerah atau zona kosong disekeliling sumur. Zona hambatan yang terbentuk diukur dengan jangka sorong. Peubah yang diamati ialah diameter zona hambatan yang terbentuk di sekeliling koloni jamur, dan dinyatakan dalam 3 kategori, yaitu:

- a. Zona hambatan total, yaitu apabila zona hambatan yang terbentuk di sekeliling sumur terlihat jernih dan luas.
- b. Zona hambatan parsial, yaitu apabila pada zona hambatan yang terbentuk masih memperlihatkan adanya koloni jamur yang tipis.
- c. Zona hambatan nol, yaitu apabila tidak ada zona hambatan yang terbentuk di sekeliling sumur.

Untuk menguji pengaruh pelarut, dilakukan pengujian blanko yaitu uji aktivitas pelarut yang dimasukkan dalam sumur yang telah dibuat pada media biakan jamur dalam cawan petri steril.

3.4.7. Ekstraksi dan uji fitokimia umbi, daun, dan bunga Dahlia Putih

Sampel kering (serbuk) dimaserasi dengan pelarut etanol selama 24 jam secara berulang-ulang. Filtrat yang diperoleh ditampung dan kemudian pelarutnya diuapkan dengan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental etanol. Ekstrak total etanol yang didapat di KLT dengan larutan heksan, larutan etil asetat, dan larutan metanol.

Pada uji fitokimia, dilakukan uji kandungan fenolik terhadap sampel umbi, daun dan bunga dahlia putih. Diambil sedikit ekstrak kental etanol, dimasukkan kedalam tabung reaksi kemudian ditambah sedikit air (\pm 5-10 ml) dan kloroform (\pm 5-10 ml), dikocok, maka akan terbentuk 2 lapisan, dimana lapisan atas adalah air dan lapisan

bawah adalah kloroform. Dipipet ± 2 ml dari lapisan air kedalam plat tetes, kemudian ditetaskan sedikit FeCl_3 . Jika terbentuk endapan hijau, maka positif fenolik.

3.4.8. Uji aktivitas antibakteri (metode difusi)

Peremajaan bakteri bertujuan untuk mengaktifkan kembali bakteri dari agar miring ke dalam larutan *nutrient broth* (Difco laboratory). Media *nutrient broth* yang disiapkan menurut prosedur kemasan, dimasukkan ke dalam tabung reaksi masing-masing sebanyak 5 ml dan ditutup dengan kapas kemudian disterilkan dalam autoklaf. Jarum ose yang telah disterilkan digoreskan pada agar miring berisi biakan bakteri. Jarum ose selanjutnya dicelupkan ke dalam tabung reaksi berisi media *nutrient broth*. Tabung ditutup dengan kapas dan kemudian diinkubasi dalam inkubator pada suhu 35° - 37°C selama 24 jam. Semua dikerjakan secara aseptik untuk masing-masing jenis bakteri uji.

Satu ml biakan bakteri yang diremajakan dalam *nutrient broth* dipipet ke dalam cawan petri. Dituangkan kira-kira 15 ml *nutrient agar* (Difco Laboratory) yang dipersiapkan sesuai dengan prosedur kemasan, dimasukkan ke dalam cawan petri. Media *nutrient agar* dibiarkan memadat, kemudian diletakkan kaertas cakram yang berdiameter 6 mm yang telah dicelupkan ke dalam ekstrak atau senyawa yang akan diuji dengan konsentrasi 20 μl dalam etanol absolut pada cawan petri di atas. Sebagai kontrol digunakan kertas cakram yang dicelupkan ke dalam etanol absolut. Kemudian diinkubasi dalam inkubator pada suhu 35° - 37°C selama 24 jam, diulangi dua kali. Semua uji dilakukan secara aseptik.

3.4.9. Analisa Data

Data yang diperoleh diuji secara statistik untuk analisis sidik ragam perlakuan masing-masing kandidat obat antijamur kulit dalam untuk mengetahui pengaruh masing-masing senyawa terhadap diameter hambat jamur. Analisis data menggunakan rancangan faktorial 2 faktor dalam acak lengkap. Analisis lanjut dengan Uji Duncan dimaksudkan untuk mengetahui senyawa dan konsentrasi yang memberikan aktivitas terbaik (Sudjana, 1989).