

## **BAB III**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **A. Populasi dan sampel**

##### **1. Populasi**

Populasi adalah seluruh objek yang meliputi sasaran dalam penelitian. Daun tembakau merupakan sasaran dalam penelitian ini yang diperoleh dari petani tembakau di Pati Jawa Tengah pada bulan Januari 2023.

##### **2. Sampel**

Sampel adalah sebagian kecil dari populasi yang digunakan dalam penelitian. Daun Tembakau adalah sampel yang digunakan pada penelitian ini dengan kriteria warna daun hijau muda hingga hijau, bersih, dan segar yang berasal dari petani tembakau di Pati Jawa Tengah pada bulan Januari 2023.

#### **B. Variabel Penelitian**

##### **1. Identifikasi variabel utama**

Variabel utama pada penelitian ini yaitu ekstrak etanol 96% daun tembakau dan fraksi *n-heksana*, fraksi etil asetat, dan fraksi air

Variabel utama kedua pada penelitian ini yaitu aktivitas anti jamur fraksi *n-heksana*, fraksi etil asetat, dan fraksi air ekstrak etanol 96% terhadap jamur *Candida albicans*

##### **2. Klasifikasi variabel utama**

Variabel utama yang diidentifikasi terdahulu dapat dikelompokkan dalam berbagai macam Variabel yaitu Variabel bebas, Variabel terkendali dan Variabel tergantung.

Variabel bebas adalah Variabel yang sengaja direncanakan oleh peneliti terhadap Variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian berupa konsentrasi ekstrak etanol daun tembakau, fraksi *n-heksana*, fraksi etil asetat dan fraksi air ekstrak daun tembakau (*Nicotiana tabacum L*).

Variabel tergantung adalah Variabel yang faktornya diamati dan diukur untuk menentukan pengaruh yang disebabkan oleh Variabel bebas. Pada

penelitian ini Variabel tergantung adalah aktivitas anti jamur fraksi *n-heksana*, etil asetat, dan fraksi air ekstrak daun tembakau (*Nicotiana tabacum L*) yang diukur dalam pengujian anti jamur terhadap jamur *Candida albicans*.

Variabel terkendali adalah Variabel yang akan mempengaruhi Variabel tergantung sehingga harus ditetapkan kualifikasinya agar tidak Variabel tergantung tidak dipengaruhi Variabel harus dinetralisir atau ditetapkan kualifikasi agar hasil yang akan didapat tidak tersebar dan dapat diulangi oleh peneliti lain secara tepat. Variabel terkendali pada penelitian ini adalah kondisi laboratorium, kondisi jamur *Candida albicans*, waktu, dan lama inkubasi.

### **3. Definisi operasional variabel utama**

Pertama Daun tembakau yang merupakan dari tembakau yang memiliki warna hijau muda hingga hijau dengan kondisi daun yang segar, tidak memiliki penyakit, dan bersih diperoleh dari Petani tembakau di Boyolali Jawa Tengah pada bulan Januari 2023.

Kedua serbuk simplisia adalah serbuk yang didapatkan dari pengeringan di oven dengan suhu 50° C, dan diperkecil ukuran partikelnya serta diayak dengan ayakan mesh 40.

Ketiga ekstrak etanol daun tembakau adalah hasil ekstrak dari proses maserasi serbuk daun tembakau dengan menggunakan etanol 96%, lalu diuapkan dengan rotary evaporator hingga menjadi ekstrak kental.

Keempat fraksi *n-heksana* adalah hasil fraksi yang diperoleh dari fraksinasi ekstrak daun tembakau menggunakan pelarut *n-heksan* untuk menarik senyawa *non-polar*, kemudian dikumpulkan dan dipekatkan.

Kelima fraksi etil asetat adalah hasil fraksi yang di peroleh dari residu fraksi *n-heksana* setelah fraksinasi, setelah itu residu hasil fraksi *n-heksana* difraksinasi lagi dengan menggunakan pelarut etil asetat untuk menarik senyawa semipolar, kemudian dikumpulkan dan dipekatkan

Keenam fraksi air adalah hasil fraksi yang diperoleh dari residu fraksi etil asetat, kemudian dikumpulkan dan dipekatkan.

Ketujuh Metode difusi adalah pengujian anti jamur dengan menggunakan kertas cakram

Ketujuh uji aktivitas anti jamur adalah pengujian anti jamur dengan menggunakan metode difusi cakram menggunakan kontrol positif berupa nystatin dan kontrol negatif berupa fraksi *n-heksana*, fraksi etil asetat dan fraksi air.

### C. Instrumen Penelitian

#### 1. Alat

Alat yang digunakan berupa tabung reaksi, timbangan analitik, corong, botol kaca berwarna gelap, pengayak dengan nomor mesh 40, kertas saring, *rotary evaporator*, blender, rak tabung reaksi, pipet tetes, sendok tanduk, blender, jangka sorong, kertas timbang, seperangkat alat fraksinasi, cawan petri, kertas cakram, lemari pendingin, *oven*, *laminar air flow*, *Baker glass*, lemari inkubator, jarum ose, kapas lidi, cawan petri, chamber glass, lampu uv 254nm 366nm.

#### 2. Bahan

Bahan yang digunakan pada Daun tembakau yang diperoleh dari petani tembakau di Boyolali Jawa Tengah, *n-heksana* etil asetat, *aquadestilata*, Etanol 96%, jamur *Candida albicans*, media *Sabouraud Dextrosa Broth*(SDB), media *Potato Dextrosa Agar* (PDA), pewarna *Lactophenol Cotton Blue* (LCB) (Laboratorium Universitas Setia Budi Surakarta), silika gel G 60 F254, Nystatin, pereaksi *Bouchardat*, pereaksi *Mayer*, Tween 80, pereaksi *Dragendroff*, H<sup>2</sup>SO<sup>4</sup> pekat, asam asetat, amil alkohol, alkohol dan spiritus,

## **D. Jalannya Penelitian**

### **1. Determinasi daun tembakau**

Determinasi daun tembakau yang bertujuan untuk menetapkan kebenaran tanaman berdasarkan dengan ciri-ciri makro dan mikroskopis sesuai pedoman yang ada. Determinasi dilakukan di Laboratorium Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi, Surakarta.

### **2. Pengambilan bahan**

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah daun tembakau yang muda hingga cukup tua dengan kondisi segar, tidak memiliki penyakit dan bersih yang diperoleh dari petani tembakau di Pati Jawa Tengah.

### **3. Pembuatan serbuk daun tembakau**

Daun tembakau yang diperoleh dari petani tembakau di Boyolali Jawa Tengah dikumpulkan, disortasi dan dibersihkan dengan air mengalir setelah di bersihkan ditiris anginkan setelah itu dirajang kemudian daun tembakau yang telah dirajang dikeringkan dengan cara dimasukkan kedalam oven dengan suhu 50° C sampai kering. Setelah dioven dan kering lalu dimasukkan kedalam blender hingga berbentuk serbuk. Lalu serbuk diayak dengan nomor mesh 40.

### **4. Pembuatan ekstrak daun tembakau**

Serbuk daun tembakau diekstraksi menggunakan metode maserasi. diambil 700 gram serbuk daun tembakau dilakukan maserasi dengan pelarut etanol 96% sebanyak 7000 mL dimaserasi selama 18 jam, digojok sesekali dalam kurun waktu 6jam sekali hingga filtrat berwarna kecoklatan. Kemudian hasil maserasi disaring diambil filtratnya lalu ampas sisa yang telah disaring dilakukan remaserasi dengan pelarut etanol 96 % dengan perbandingan setengah bagian pelarut (3500 mL). Setelah dilakukan remaserasi disaring hasil remaserasi lalu diambil filtratnya kemudian dicampurkan hasil filtrat yang di dapatkan dari

maserasi dan remaserasi setelah itu filtrat dipekatkan di *rotary evaporator* dengan suhu 60°C(FHI II. 2017)

#### **5. Uji kadar air terhadap ekstrak daun tembakau**

Uji kadar air dapat dilakukan dengan cara membuat toluen jenuh air menggunakan prinsip ECC dengan corong pisah. Perbandingan yang digunakan yaitu toluene jenuh air, gojok lalu biarkan sampai memisah dan tampung toluen jenuh air yang diperoleh. Timbang ekstrak sebanyak 20 gram kemudian masukan ke dalam labu alas bulat. Tambahkan batu didih. Toluene jenuh air dimasukan ke dalam labu kurang lebih sebanyak 200 mL, kemudian rangkai alat panaskan selama 15 menit. Volume air dibaca setelah air dan toluen memisah secara sempurna kemudian hitung kadar air menggunakan rumus % v/b. dengan kadar air  $\leq 10\%$  (Kemenkes, 2010).

#### **6. Uji bebas etanol**

Tujuan pengujian bebas etanol 96% terhadap ekstrak daun tembakau yaitu untuk melihat ekstrak kental daun tembakau bebas dari etanol 96% dengan reaksi esterifikasi. Tabung reaksi yang berisi ekstrak ditambahkan asam sulfat pekat dan asam asetat, lalu panaskan. Ekstrak masih mengandung etanol 96% apabila tercium bau ester khas alkohol.

#### **7. Identifikasi metabolit sekunder dalam ekstrak daun tembakau dengan uji skrining fitokimia**

Senyawa aktif suatu bahan dapat dideteksi menggunakan uji skrining fitokimia. Uji skrining fitokimia dilakukan dengan tujuan untuk memastikan ada tidaknya senyawa aktif pada pada suatu bahan.

##### **a. Senyawa flavonoid**

Ambil sampel ekstrak daun tembakau sebanyak 0,5g ditambahkan 1-2 mL etanol 95%, kemudian dipanaskan lalu disaring. Filtrat yang didapat ditambahkan 2mL HCl, 0,1gram serbuk Mg dan 1mL amil alkohol, lalu kocok hingga larutan

memisah. Flavonoid dapat dideteksi ketika berbentuk warna kuning hingga merah pada larutan amil alkohol.

**b. Identifikasi senyawa alkaloid**

Ambil sampel ekstrak daun tembakau sebanyak 0,5 gram ditambahkan 1-2 mL HCl 2 N, kemudian ditambahkan 9 mL aquadestilata panaskan. Setelah itu dinginkan dan saring. Filtrat yang didapat dibagi menjadi 3 tabung. Filtrat pada tabung pertama ditambahkan 1-2 tetes pereaksi *Bouchardat*. Filtrat pada tabung kedua ditambahkan 1-2 tetes pereaksi *Meyer*. Filtrat pada tabung ketiga ditambahkan 1-2 tetes pereaksi *Dragendroff*. Pada tabung yang ditambahkan pereaksi *Bouchardat* jika pada endapan memiliki warna coklat kehitaman maka ekstrak memiliki senyawa alkaloid. Pada tabung yang ditambahkan pereaksi *Meyer* jika terdapat endapan berwarna kuning maka ekstrak memiliki senyawa alkaloid. Pada tabung yang ketiga pada pereaksi *Dragendroff* jika endapan terbentuk dan berwarna jingga hingga kecoklatan maka ekstrak memiliki senyawa alkaloid. Kemudian jika 2 dari 3 tabung dari setiap pereaksi memiliki reaksi positif maka sampel akan dinyatakan memiliki senyawa alkaloid

**c. Identifikasi senyawa triterpenoid dan steroid**

Ambil sampel ekstrak daun tembakau sebanyak 0,5 gram letakkan di atas plat tetes, kemudian tambahkan 5 tetes asam asetat glasial dan 2 tetes H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, jika menunjukkan warna merah atau ungu menandakan mengandung triterpenoid. Terbentuknya warna biru atau hijau menandakan mengandung steroid, sedangkan jika menunjukkan warna merah atau ungu menandakan mengandung triterpenoid.

**d. Identifikasi senyawa tannin**

mengambil ekstrak kental masukan ke dalam tabung reaksi tambahkan 10 mL air panas, kemudian saring. Encerkan filtrat menggunakan akuades hingga tak berwarna. 2 mL filtrat dimasukan pada tabung reaksi dan tambahkan 1-2 tetes pereaksi FeCl<sub>3</sub>. Jika terbentuk warna biru tua atau hijau kehitaman maka sampel yang diuji mengandung senyawa tanin.

## **8. Pembuatan fraksi dari ekstrak daun tembakau**

Ekstrak etanol daun tembakau sebanyak 10 gram dilarutkan dengan Etanol 96% sebanyak 10mL kemudian disuspensikan dengan aquad estilata sebanyak 65mL dan setelah dilarutkan ekstrak dilakukan fraksinasi dengan menggunakan pelarut *n-heksana* sebanyak 75mL menggunakan corong pisah, dan difraksinasi menggunakan ekstraksi cair-cair

Setelah di lakukan fraksinasi dengan menggunakan pelarut *n-heksana* hasil dari pemisahan didapatkan residu air yang di dapatkan dari fraksinasi *n-heksana* pisahkan *n-heksana* dan residu air, kemudian residu air difraksinasi lagi dengan corong pisah, dengan *n-heksana* yang baru lagi hal ini dilakukan sebanyak 3kali. setelah dilakukan replikasi 3kali kumpulkan fraksi *n-heksana* menjadi satu. fraksi air yang di dapatkan dari fraksinasi sebelumnya difraksinasi lagi fraksi air tersebut dilakukan fraksinasi dengan menggunakan pelarut etil asetat 75mL Dilakukan dengan menggunakan corong pisah dengan pengulangan sebanyak 3kali sama seperti saat fraksinasi menggunakan *n-heksana*..

Untuk mendapat fraksi etil asetat yang optimal lakukan pengulangan hingga senyawa etil asetat berwarna jernih. Setelah dilakukan sebanyak 3kali pisahkan fraksi etil asetat kumpulkan seluruh fraksi etil yang didapatkan mennjadi satu. Sisa dari fraksinasi yang terakhir adalah fraksi air.

Kemudian setelah di dapatkan fraksi *n-heksana*, fraksi etil asetat, dan fraksi air dikumpulkan pekatkan masing-masing fraksi dengan rotary evaporator untuk mengentalkan fraksi *n-heksana*, fraksi air dan fraksi etil asetat, setelah didapatkan fraksi *n-heksana*, fraksi etil asetat, dan fraksi air yang telah mengental kemudian dikeringkan dengan menggunakan waterbath hingga kering, setelah didapatkan disimpan lalu akan dilakukan pengujian anti jamur.

## **9. Uji kualitatif fraksi terstandar dengan metode KLT**

Pengujian secara kualitatif dimaksudkan untuk mengkonfirmasi adanya senyawa flavonoid dalam fraksi yang diduga sebagai pemberi aktivitas anti-jamur. Setiap sampel fraksi yang sudah dilarutkan ditotolkan dalam fase diam plat KLT

GF 254 aktif dengan pembanding rutin dan dikembangkan pada fase gerak *n-heksana* etil asetat(8:2;7:3;dan6:4).

Hasil positif menunjukkan pemisahan yang sempurna dan bercak yang muncul pada Rf yang sama dengan Rf marker pembanding, pengamatan secara visual, di bawah lampu UV 254 nm dan 366 nm. Selanjutnya uji kualitatif terhadap golongan senyawa dilanjutkan dengan penyemprotan menggunakan dragendorff karena terdapat bercak yang spotnya besar dengan flourosensi pada panjang Warna merah menunjukkan bahwa adanya alkaloid (Markham .1988)

## **10. Identifikasi jamur *Candida albicans***

### **a. Identifikasi mikroskopis jamur *Candida albicans***

Identifikasi mikroskopis jamur candida dapat dilakukan dengan cara menggunakan pewarnaan *Lactophenol Cotton Blue* (LCB). Pada pewarnaan *Lactophenol Cotton Blue* terdapat beberapa bahan yaitu *phenol*, gliserol, dan *cotton blue*. Masing-masing bahan memiliki fungsi tersendiri *Phenol* berfungsi untuk membunuh jamur, gliserol berfungsi untuk memperpanjang masa simpan preparat dan mengurangi presipitasi dari cat, sedangkan *cotton blue* berfungsi sebagai pewarna (biru). Metode pewarnaan ini dilakukan dengan cara menggabungkan bahan-bahan pewarnaan LCB yaitu *phenol* 20 g, *lactic acid* 20 mL, gliserol 40 g, dan *cotton* 0,05 gram. kemudian setelah bahan-bahan tercampur. Teteskan sebanyak 2 tetes pewarna LCB dengan menggunakan jarum ose yang telah dipanaskan terlebih dahulu ke atas *deck glass*. Setelah itu panaskan kembali jarum ose kemudian dinginkan, ambil jamur dengan menggunakan jarum ose campurkan dengan pewarna LCB yang diletakkan di atas *deck glass*, tutup *deck glass* kemudian amati di atas mikroskop (Pohan 2013). Secara mikroskopis bisa juga dilakukan *germ tube* dengan cara tabung reaksi yang mengandung mengandung 1-2 mL media cair (putih telur) diinkubasi dengan suhu 37oC selama 15-30 menit kemudian koloni *Candida albicans* yang akan digunakan untuk uji germ tube diambil menggunakan jarum ose lalu masukkan kedalam tabung yang berisi media cair hingga terlihat jamur terurai. Tabung reaksi kemudian diinkubasi dalam inkubator selama 1-2 jam. Objek kaca kemudian diperlakukan dengan 1



teuji koloni, yang kemudian dilihat di bawah mikroskop dengan lensa objektif 10x dan 40x.

**b. Identifikasi makroskopis *Candida albicans***

Untuk mengidentifikasi *Candida albicans* secara makroskopis dapat dilakukan dengan cara mengoleskan satu ose jamur *Candida albicans* pada media *Potato Dextrose Agar* (PDA) selama 5x24 jam, kemudian amati bentuk, tepian, tekstur permukaan, dan warna. Apabila koloni berwarna krem, berlendir, dan berbau ragi yang artinya positif jamur *Candida albicans*.

**11. Pembuatan suspensi *Candida albicans***

Untuk membuat suspensi *Candida albicans* dapat dilakukan dengan mengambil biakan subkultur *Candida albicans* menggunakan ose steril ke dalam 25 mL media *Sabaroud Dextrose Broth* (SDB) lalu media diinkubasi dengan suhu 37°C selama 24 jam. Dari stok kultur bakteri yang telah tumbuh diambil dengan jarum ose steril lalu disuspensikan dalam tabung yang berisi 10 ml NaCl 0,9% sampai diperoleh kekeruhan yang sama dengan larutan *McFarland*. Dipipet 0,1 ml dari larutan tersebut diatas kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 10 ml ditambah larutan NaCl 0,9% sampai garis tanda dimana konsentrasi bakteri menjadi 10<sup>6</sup> CFU/ml (Haro, 2011).

**12. Uji aktivitas anti jamur ekstrak daun tembakau terhadap jamur *Candida albicans***

Metode yang digunakan adalah difusi cakram. Pengujian dilakukan menggunakan 30 mL media SGA (*Sabourud glucose Agar*) padat, kemudian tuang pada cawan petri dalam keadaan panas lalu media dibiarkan sampai dingin dan memadat. Bagi cawan petri menjadi 9 bagian dengan jarak yang sama dan beri label untuk membedakan.

Jamur diambil dari media *Sabaroud Dextrose Broth* (SDB) yang berisi suspensi jamur dengan kapas lidi steril kemudian dioleskan pada cawan petri yang berisi media SGA (*Sabourud glucose Agar*) dan ditunggu sampai jamur berdifusi pada media selama ± 10 menit. Letakkan kertas cakram steril (6 mm) yang telah

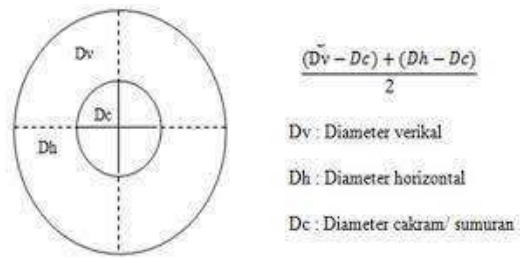
ditetes dengan  $\pm 50 \mu\text{L}$  ekstrak etanol daun tembakau (*Nicotiana tabacum* L), yang telah dibuat dalam berbagai konsentrasi (25%, 50%, dan 75% mg/mL), kemudian diikuti kontrol positif dan kontrol negatif dalam waktu 30 menit. Letakkan kertas cakram di atas permukaan media menggunakan pinset dan sedikit ditekan.

Media diinkubasi 24-48 jam dengan suhu  $37^\circ\text{C}$ . Menggunakan kontrol positif yaitu nystatin. Kontrol negatif yang digunakan adalah Tween 80. Setelah 48 jam diamati ada atau tidaknya zona bening yang terbentuk. Hal ini mengindikasikan adanya zona bening pada sekeliling kertas cakram menunjukkan adanya aktivitas anti jamur. Zona bening yang terbentuk diukur diameternya dengan jangka sorong.

### **13. Uji aktivitas anti jamur fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi air ekstrak daun tembakau terhadap jamur *Candida albicans***

Metode yang digunakan pada uji aktivitas antijamur fraksi ekstrak etanol daun tembakau terhadap jamur *Candida albicans* sama dengan pengujian antijamur pada ekstrak etanol daun tembakau. Pada fraksi letakkan kertas cakram steril (6 mm) yang telah ditetes dengan  $\pm 50 \mu\text{L}$  fraksi *n*-heksana ekstrak etanol daun tembakau yang telah dibuat dalam berbagai konsentrasi (25%, 50%, dan 75% mg/mL), (*Nicotiana tabacum* L) diikuti dengan fraksi etil asetat, fraksi air kontrol positif dan kontrol negatif. kemudian letakkan kertas cakram di atas permukaan media menggunakan pinset dan sedikit ditekan, tempatkan pada kertas cakram sesuai dengan cawan petri yang telah di tandai.

Media diinkubasi 24-48 jam dengan suhu  $37^\circ\text{C}$ . Menggunakan kontrol positif yaitu nystatin. Kontrol negatif yang digunakan adalah Tween 80. Setelah 48 jam diamati ada atau tidaknya zona bening yang terbentuk. Hal ini mengindikasikan adanya zona bening pada sekeliling kertas cakram menunjukkan adanya aktivitas anti jamur. Zona bening yang terbentuk diukur diameternya dengan jangka sorong. Untuk pengukuran daya hambat dapat di lihat pada gambar di bawah ini.



Gambar 5. Rumus Perhitungan Diameter Zona Hambat (Harti, 2015)  
 Penentuan respon hambat pertumbuhan dapat dilihat pada tabel 2.1.

| Diameter zona bening | Respon hambatan pertumbuhan |
|----------------------|-----------------------------|
| $\leq 10$ mm         | Lemah                       |
| 11-15 mm             | Sedang                      |
| 16-20 mm             | Kuat                        |
| $> 20$ mm            | Sangat kuat                 |

Tabel 1 Klasifikasi respon hambat pertumbuhan jamur (Puthera et al, 2007)

### E. Analisis data

Data hasil penelitian uji anti jamur fraksi ekstrak etanol 96% terhadap jamur *Candida albicans* dianalisis menggunakan program SPSS 21.0. Pertama dilakukan uji *Kolmogorov-Smirnov* untuk melihat apakah data terdistribusi normal atau tidak. Data terdistribusi normal ( $\text{sig} > 0,05$ ) maka dilakukan uji *One-Way ANOVA*, kemudian jika memberikan hasil yang signifikan akan dilanjutkan dengan uji *Tukey* untuk melihat perbedaan daya hambat jamur tiap kelompok. Data tidak terdistribusi normal maka dilakukan uji *Kruskal Wallis* ( $\text{sig} < 0,05$ ), kemudian dilanjutkan uji *Kruskal-Wallis* menggunakan uji *Mann Whitney* untuk melihat apakah ada perbedaan daya hambat jamur pada semua kelompok pengujian.