

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilaksanakan dari bulan April sampai bulan Oktober 2013, bertempat di Laboratorium Kimia Makanan Jurusan Pendidikan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pendidikan Indonesia.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian antara lain, alat-alat gelas, autoklaf, *blender*, kompor gas, *laminar air flow*, makropipet, mikropipet, neraca analitik digital, pemanas listrik, spektrofotometer FTIR (Shimadzu, FTIR-8400), pembakar spirtus, *rotary evaporator vacum* (Buchi Rotavapor R-114), dan vakum (Buchi V-500).

3.2.2 Bahan

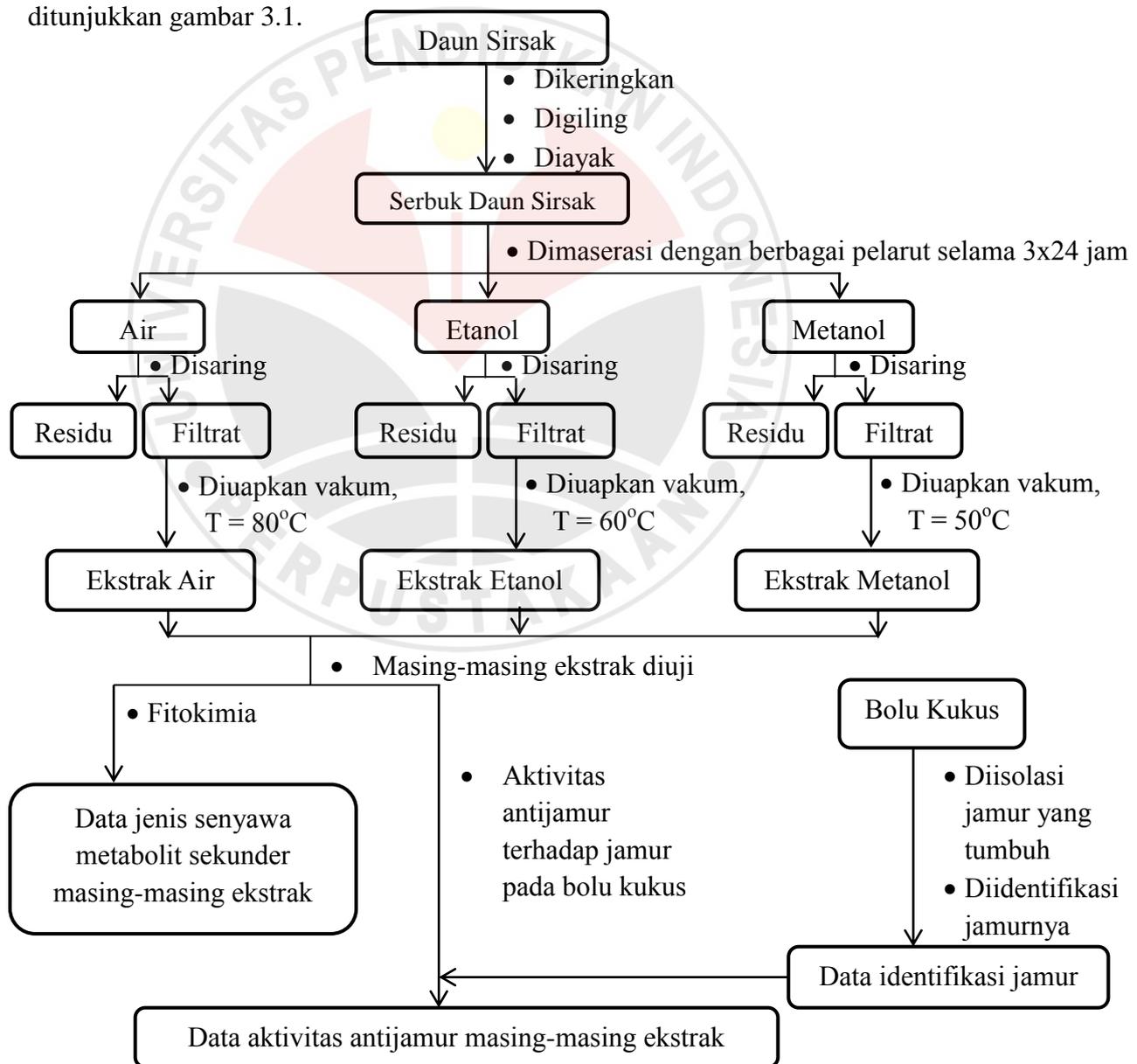
Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun sirsak muda (daun kesatu sampai daun kelima) yang diambil dari desa Legok Kihujan, Kabupaten Tasikmalaya. Bahan yang digunakan pada proses ekstraksi dan pengujian fitokimia, yaitu etanol, metanol, etil asetat, n-heksan, aquades, FeCl₃ 1%, kloroform, amoniak, H₂SO₄ 1M, pereaksi Mayer, pereaksi Wagner, pereaksi Lieberman-Burchad, asetat anhidrat, H₂SO₄ pekat, HCl pekat, n-amil alkohol, Magnesium, gelatin, dan NaOH. Bahan yang digunakan pada proses pembuatan bolu kukus sebagai sumber isolat jamur, yaitu telur, gula pasir, TBM, tepung terigu, susu bubuk, vanili, dan air soda. Bahan lain yang digunakan dalam penelitian ini yaitu kentang, aquades, gula pasir, agar, *chloramphenicol*, dan ketokonazol.

3.3 Alur Penelitian

Penelitian ini dilakukan dalam beberapa tahap, yaitu

1. Persiapan sampel daun sirsak.
2. Ekstraksi senyawa metabolit sekunder daun sirsak.
3. Uji fitokimia ekstrak daun sirsak.
4. Isolasi dan identifikasi jamur pada bolu kukus.
5. Uji aktivitas antijamur ekstrak daun sirsak terhadap jamur pada bolu kukus.

Tahapan-tahapan penelitian ini dapat dilihat pada bagan alir penelitian yang ditunjukkan gambar 3.1.



Gambar 3.1. Bagan Alir Penelitian

Siti Nurjanah, 2014

Isolasi Dan Penentuan Aktivitas Antijamur Ekstrak Daun Sirsak (*Annona Muricata*) Terhadap *Aspergillus Niger*

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Preparasi Sampel Daun Sirsak

Daun sirsak yang dipilih, yaitu daun kesatu sampai daun kelima. Daun sirsak kemudian dibersihkan dengan lap bersih dan dicuci dengan air mengalir, serta dikeringkan pada suhu kamar. Daun sirsak yang telah kering selanjutnya dipisahkan dari rantingnya dan dipotong kecil-kecil untuk kemudian dihaluskan menggunakan blender dan diayak sampai menjadi serbuk.

3.4.2 Ekstraksi Daun Sirsak

Serbuk daun sirsak sebanyak 50 g dimaserasi menggunakan pelarut metanol sebanyak 400 ml selama 3 x 24 jam dengan tiga kali penggantian pelarut. Maserat disaring, kemudian filtrat dipisahkan dan dipekatkan dengan *rotary evaporator vacuum* sampai didapatkan ekstrak kental. Langkah-langkah tersebut dilakukan kembali untuk maserasi menggunakan pelarut etanol dan air.

3.4.3 Uji Fitokimia

Uji fitokimia dilakukan untuk mengetahui secara kualitatif kandungan kimia tanaman. Kandungan kimia tanaman perlu diketahui untuk menduga komponen aktif yang menyebabkan suatu bahan tanaman memiliki aktivitas antijamur. Uji fitokimia yang dilakukan, yaitu

a. Uji golongan alkaloid

Ekstrak daun sirsak sebanyak 1 ml ditambahkan beberapa tetes NaOH, lalu dikocok kuat-kuat atau divorteks dan disaring dengan kertas saring Whatman No.1. Filtrat kemudian ditambahkan beberapa tetes H₂SO₄ pekat, lalu divorteks. Lapisan bening yang terbentuk dipermukaan kemudian diambil dan dipindahkan kedalam dua tabung reaksi yang lain. Masing-masing kemudian ditambahkan beberapa tetes pereaksi Mayer dan Wagner. Bila bereaksi membentuk endapan putih dengan pereaksi Mayer, maka berarti ekstrak mengandung senyawa golongan Alkaloid. Bila terbentuk warna coklat setelah ditambahkan pereaksi Wagner, maka berarti ekstrak mengandung senyawa dari golongan alkaloid (Houghton dan Raman, 1998).

b. Uji golongan fenol dan tanin

Ekstrak daun sirsak sebanyak 1 ml ditambahkan beberapa tetes FeCl_3 . Bila terbentuk warna hitam kehijauan, maka ekstrak berarti mengandung senyawa golongan fenol. Larutan kemudian ditambahkan gelatin. Bila terbentuk gel yang cukup stabil, maka ekstrak berarti mengandung senyawa dari golongan tanin (Houghton dan Raman, 1998).

c. Uji golongan flavonoid

Ekstrak daun sirsak sebanyak 1 ml ditambahkan beberapa tetes H_2SO_4 , lalu dikocok kuat-kuat atau menggunakan vorteks. Bila terbentuk warna kuning, maka berarti ekstrak mengandung senyawa golongan flavon dan flavonol. Bila yang terbentuk adalah warna jingga atau krem, maka berarti ekstrak mengandung senyawa golongan flavonoid. Bila yang terbentuk adalah warna krem atau merah tua, maka ekstrak mengandung senyawa golongan khalkon (Harborne, 1996).

d. Uji golongan saponin

Ekstrak daun sirsak sebanyak 1 ml ditambahkan air panas, kemudian dikocok kuat-kuat atau menggunakan vorteks, selama 10 detik. Bila kemudian terbentuk busa stabil yang tahan hingga lebih dari 10 menit, maka berarti ekstrak mengandung senyawa dari golongan saponin (Harborne, 1996).

e. Uji golongan terpenoid dan steroid

Ekstrak daun sirsak sebanyak 1 ml ditambahkan 2 ml kloroform. Kemudian ditambahkan beberapa tetes asam asetat glasial dan H_2SO_4 pekat. Larutan kemudian dikocok perlahan. Bila warna larutan berubah menjadi biru atau hijau, maka berarti ekstrak mengandung senyawa dari golongan steroid. Bila warna yang terbentuk adalah merah atau ungu, maka berarti ekstrak mengandung senyawa golongan terpenoid (Harborne, 1996).

3.4.4 Pembuatan Bolu Kukus

Telur sebanyak 2 butir, gula pasir sebanyak 250 g, dan TBM sebanyak 1 sendok teh, dikocok menggunakan mixer dengan kecepatan rendah. Setelah semua bahan tercampur rata, naikkan kecepatan mixer menjadi kecepatan tinggi, kocok terus sampai adonan mengembang. Setelah adonan mengembang, tambahkan

campuran tepung (tepung terigu 250 g, susu bubuk 12,5 g, dan vanili 1 bungkus) dan air soda sebanyak 175 ml secara bertahap sambil diaduk rata menggunakan spatula. Adonan kemudian dimasukkan kedalam cetakan dan dikukus selama 15 menit menggunakan panci pengukus yang telah panas.

3.4.5 Pembuatan Media

Terdapat dua jenis media yang digunakan untuk pertumbuhan jamur dalam penelitian ini, yaitu

a. Media *Potato Sucrose Agar* (PSA)

Kentang sebanyak 200 g yang telah diiris menjadi sebesar potongan dadu direbus dengan 800 ml aquades sampai kentang lunak. Air rebusan tersebut disaring dan ditambahkan sukrosa 20 g, agar-agar 14 g, dan aquades sampai 1 L, lalu dipanaskan hingga mendidih. Tambahkan *chloramphenicol* sebanyak 500 mg untuk 1 L medium. Media kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit (Sari dan Achmad, 2009).

b. Media *Potato Sucrose Liquid* (PSL)

Kentang sebanyak 200 g yang telah diiris menjadi sebesar potongan dadu direbus dengan 800 ml aquades sampai kentang lunak. Air rebusan tersebut disaring dan ditambahkan sukrosa 20 g dan aquades sampai 1 L, lalu dipanaskan hingga mendidih. Tambahkan *chloramphenicol* sebanyak 500 mg untuk 1 L medium. Media kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit (Sari dan Achmad, 2009).

3.4.6 Sterilisasi

Sterilisasi bahan dilakukan pada waktu pembuatan media dengan menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm. Alat-alat yang akan dipergunakan terlebih dulu juga perlu disterilisasi, seperti cawan petri, Erlenmeyer, jarum ose dan kapas. Cawan petri dan Erlenmeyer yang akan dipergunakan disterilisasi dengan autoklaf selama 20 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm. Sedangkan jarum ose disterilisasi pada saat akan, selama dan setelah pemakaian, dengan cara dipanaskan dengan menggunakan api bunsen hingga membara. Untuk kapas disterilisasi dengan cara disimpan dalam oven pada

suhu 47°C selama 24 jam. Sterilisasi alat ini dilakukan untuk mencegah agar tidak ada mikroorganisme yang menempel pada alat-alat tersebut, sehingga dalam melakukan kegiatan inokulasi tidak terjadi kontaminasi.

Kebersihan lingkungan kerja dapat dijaga dengan membatasi orang-orang yang memasuki ruangan serta membersihkan ruangan dengan desinfektan. Sebelum, selama dan setelah digunakan permukaan tempat kerja (*laminar air flow*) dibersihkan dengan alkohol 70% menggunakan *sprayer* dan dibersihkan dengan menggunakan tisu. *Blower* atau peniup udara pada *laminar air flow* dinyalakan sebelum dan selama pemakaian untuk menghindari kontaminan. Selain itu, sebelum pemakaian *laminar air flow* dapat disterilisasi dengan menggunakan lampu UV yang dinyalakan selama beberapa menit.

3.4.7 Isolasi Jamur

Jamur yang akan digunakan dalam penelitian adalah jamur yang diisolasi dari sampel bolu kukus. Sebanyak 1 g bolu kukus dihaluskan menggunakan lumpang dan alu, kemudian dilarutkan dengan 9 ml aquades sehingga didapatkan suspensi dengan pengenceran 10^{-1} . Kemudian sebanyak 1 ml suspensi dengan pengenceran 10^{-1} dilarutkan kedalam 9 ml aquades sehingga didapatkan suspensi dengan pengenceran 10^{-2} dan diteruskan sampai mendapatkan suspensi dengan pengenceran 10^{-6} . Masing-masing suspensi diambil sebanyak 0,1 ml kemudian diinokulasikan ke dalam media PSA. Biakan jamur dalam media diinkubasi pada suhu kamar selama 3 hari. Setelah 3 hari, koloni jamur yang tumbuh diisolasi dalam media agar yang baru untuk mendapatkan isolat murni. Kemudian diinkubasi lagi selama 3 hari untuk selanjutnya diamati secara makroskopis dan mikroskopis, serta untuk digunakan dalam uji selanjutnya.

3.4.8 Pengujian Aktivitas Antijamur

Sebelum pengujian aktivitas antijamur ekstrak, dilakukan uji pendahuluan optimasi jumlah jamur yang akan digunakan. Biakan jamur dibuat terlebih dahulu, yaitu dari satu ose jamur yang telah diisolasi kemudian diinokulasi kedalam media PSL 100 ml dan diinkubasi selama 3 hari. Biakan jamur tersebut diambil sebanyak 1 μ l, 5 μ l, 10 μ l, 50 μ l, dan 100 μ l, kemudian masing-masing

dicampurkan dengan 10 ml media PSA dan dimasukkan ke dalam cawan petri, serta dibiarkan sampai memadat. Setelah memadat, di atas media masing-masing cawan petri diletakkan cakram kertas berdiameter 6 mm. Kemudian tiap cakram kertas diinjeksikan kontrol positif ketokonazol 3000 ppm sebanyak 10 µl dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 3 hari. Zona bening yang tampak di sekeliling cakram kertas kemudian diukur menggunakan jangka sorong.

Uji aktivitas antijamur dilakukan dengan metode difusi agar. Biakan jamur dengan volume hasil uji pendahuluan dicampurkan dengan media PSA sebanyak 10 ml ke dalam cawan petri dan dibiarkan sampai memadat. Satu cawan petri dibagi menjadi enam bagian dengan dibuat garis pada bagian bawah cawan. Pada enam bagian tersebut masing-masing diletakkan satu cakram kertas. Tiap cakram kertas diinjeksikan larutan yang berbeda. Larutan yang diinjeksikan, yaitu ekstrak metanol, ekstrak etanol, ekstrak air, kontrol positif ketokonazol dan kontrol negatif pelarut yang digunakan. Masing-masing volume larutan yang diinjeksikan adalah 10 µl. Ekstrak metanol, ekstrak etanol, ekstrak air, dan kontrol positif ketokonazol dibuat dalam berbagai variasi konsentrasi, yaitu 3000 ppm, 4000 ppm, 6000 ppm dan 8000 ppm. Pengujian dilakukan triplo untuk tiap konsentrasi. Zona bening yang tampak di sekeliling cakram kertas kemudian diukur menggunakan jangka sorong.