

BAB 3

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan dari bulan Januari hingga Mei tahun 2025 di laboratorium Bahan Alam dan Mikrobiologi Farmasi, Program Studi Farmasi S-1 Universitas Bhamada Slawi.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu tabung reaksi, rak tabung reaksi, batang pengaduk, bunsen, penjepit tabung, plat tetes, cawan petri, gelas beker, erlenmeyer, gelas ukur, pipet tetes, jarum ose, pinset, cawan porselen, oven, blender, ayakan no 80 mesh, waterbath, *moisture analyzer*, krus porselen, tanur, eksikator, LAF (*Laminar Air Flow*), autoklaf, inkubator, kompor listrik, dan kawat kasa.

3.2.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu rimpang lengkuas, rimpang blenyeh, etanol 96%, CH_3COOH , H_2SO_4 , reagen Mayer, reagen Wagner, reagen Dragendorff, HCl 2N, serbuk Mg, aquades, HCl pekat, HCl 1N, CHCl_3 , CH_3COOH anhidrat, FeCl_3 1%, serbuk PDA, serbuk NA, stik pH universal, H_2SO_4 1%, BaCl_2 1%, NaCl_2 0,9%, DMSO 10%, aluminium foil, kertas saring, plastik *wrap*, kapas, ketokonazol, klindamisin, jamur *Candida albicans*, dan bakteri *Propionibacterium acnes*.

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan menggunakan berbagai variasi konsentrasi kombinasi ekstrak rimpang lengkuas (*Alpinia galanga*) dan rimpang temu blenyeh (*Curcuma purpurascens* Bl.) yang bertujuan untuk mengetahui aktivitas antimikroba dan variasi konsentrasi kombinasi ekstrak rimpang lengkuas dan rimpang temu blenyeh terbaik dalam menghambat pertumbuhan Jamur *Candida albicans* dan Bakteri *Propionibacterium acnes*.

3.3.1 Variabel Bebas

Pada penelitian ini variabel bebas yang digunakan adalah variasi konsentrasi pada kombinasi ekstrak rimpang lengkuas (*Alpinia galanga*) dan rimpang temu blenyeh (*Curcuma purpurascens* Bl.).

3.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah uji aktivitas antimikroba terhadap Jamur *Candida albicans* dan Bakteri *Propionibacterium acnes*.

3.3.3 Variabel Terkontrol

Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah penimbangan, pengambilan sampel, sifat fisik, dan metode uji antimikroba.

3.4 Prosedur Penelitian

Pada penelitian uji aktivitas antimikroba kombinasi ekstrak rimpang lengkuas (*Alpinia galanga*) dan rimpang temu blenyeh (*Curcuma purpurascens* Bl.) terhadap *Candida albicans* dan *Propionibacterium acnes* meliputi :

3. 4. 1 Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Bahan Alam Prodi Farmasi S-1, Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Bhamada Slawi.

3. 4. 2 Pembuatan Serbuk Simplisia

Simplisia yang digunakan pada penelitian ini adalah rimpang lengkuas (*Alpinia galanga* L.) dan rimpang temu blenyeh (*Curcuma purpurascens* Bl.), masing-masing simplisia ditimbang sebanyak 5 kg. Kemudian simplisia dilakukan sortasi basah dengan cara mencucinya dengan air bersih yang mengalir untuk menghilangkan bahan pengotor lainnya yang melekat pada simplisia. Selanjutnya simplisia dirajang tipis dengan cara melintang atau membujur dengan ketebalan 3-5 mm, untuk mempermudah proses pengeringan dan penggilingan. Kemudian simplisia dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 50°C (Nurhayatina & Maulana, 2023). Setelah kering simplisia diblender sampai menjadi serbuk, kemudian diayak dengan ayakan ukuran 80 mesh (Christina et al., 2018).

3. 4. 3 Pembuatan Ekstrak

Pembuatan ekstrak rimpang lengkuas dan ekstrak rimpang temu blenyeh dilakukan secara terpisah, dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Ekstrak rimpang lengkuas dan ekstrak temu blenyeh dibuat dari serbuk simplisia sebanyak 300 g dan ditambahkan 1500 mL etanol 96%, dengan perbandingan

serbuk simplisia dan penyari 1:5 . Kemudian didiamkan selama 3 x 24 jam dalam wadah tertutup, dan sesekali diaduk. Kemudian dilakukan penyaringan dengan kertas saring, dipisahkan residu dan filtratnya. Filtrat diuapkan dengan *waterbath* pada suhu 60°C hingga mendapat ekstrak kental (Safutri et al., 2024), kemudian ekstrak kental ditimbang dan dihitung rendemen ekstrak dengan rumus (Falestin et al., 2024) :

$$\% \text{Rendemen} = \frac{\text{Bobot ekstrak kental (g)}}{\text{Bobot serbuk simplisia yang diekstrak (g)}} \times 100\%$$

3. 4. 4 Standarisasi Ekstrak

a. Uji Parameter Spesifik

Uji parameter spesifik dilakukan secara organoleptis yang menggunakan panca indra untuk mengamati warna, bentuk, bau, dan rasa dari ekstrak rimpang lengkuas dan ekstrak rimpang temu blenyeh (Depkes RI, 2000).

b. Uji Parameter Non Spesifik

Uji parameter non spesifik meliputi :

1. Uji Penetapan Kadar Air

Uji penetapan kadar air dilakukan dengan ditimbang sebanyak 1 g masing-masing ekstrak rimpang lengkuas dan ekstrak rimpang temu blenyeh. Kemudian diletakkan di letakkan di masing-masing piring alumunium *moisture analyzer* yang telah di atur pada suhu 105°C, setelah itu di tutup. Alat akan otomatis mulai memanaskan ekstrak

hingga kadar air konstan. Setelah lampu alat mati dan otomatis angka muncul di alat berupa %. Batas kadar air yang baik menurut Depkes RI (2000) adalah kurang dari 10%.

2. Uji Kadar Abu Total

Uji kadar abu total ekstrak rimpang lengkuas dan ekstrak rimpang temu blenyeh dilakukan secara terpisah. Uji ini dilakukan dengan cara ditimbang 1 g masing-masing ekstrak, dan diletakkan di masing-masing krus porselen yang sudah ditimbang sebelumnya. Kemudian dipijarkan di alat tanur pada suhu 600°C hingga terbentuk abu, selanjutnya diletakkan di eksikator hingga dingin, kemudian ditimbang dan catat hasilnya. Kemudian kadar abu total dihitung yang dinyatakan dalam % (b/b) dengan rumus (Marpaung et al., 2020) :

$$\text{Kadar abu total} = \frac{\text{Bobot abu (g)}}{\text{Bobot ekstrak (g)}} \times 100\%$$

3. 4. 5 Skrining Fitokimia

a. Uji Alkaloid

Uji alkaloid ekstrak rimpang lengkuas dan ekstrak rimpang temu blenyeh dilakukan secara terpisah. Uji ini dilakukan dengan metode Mayer, Wagner, dan Dragendorff. Sebanyak 0,5 g ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi ditambahkan 1 mL HCl dan 9 mL aquades, kemudian dikocok hingga homogen. Dipanaskan selama 15 menit, setelahnya

disaring dan dibagi menjadi 3 tabung dengan ditandai A, B, dan C. Setelah itu ditambahkan 2-3 tetes reagen Mayer ke tabung A, reagen Wagner ke tabung B, dan reagen Dragendorff ke tabung C. Hasil positif mengandung alkaloid jika pada penambahan reagen Mayer terbentuk endapan putih, penambahan reagen Wagner terbentuk endapan cokelat, dan penambahan reagen Dragendorff terbentuk endapan jingga (Safutri et al., 2024).

b. Uji Flavonoid

Uji flavonoid ekstrak rimpang lengkuas dan ekstrak rimpang temu blenyeh dilakukan secara terpisah. Uji flavonoid dilakukan dengan cara ekstrak sebanyak 0,5 mg ditambahkan 2,5 mL aquades, 3 tetes HCl, 0,5 mg serbuk Mg dan dikocok hingga homogen. Selanjutnya dipanaskan selama 10 menit. Hasil positif mengandung flavonoid ditandai dengan adanya warna kuning, biru, jingga maupun merah (Triwahyuno & Hidajat, 2020).

c. Uji Saponin

Uji saponin ekstrak rimpang lengkuas dan ekstrak rimpang temu blenyeh dilakukan secara terpisah. Uji saponin dilakukan dengan cara ekstrak 1 mg dimasukkan ke tabung reaksi, ditambahkan 5 mL aquades dan dikocok selama 1 menit. Jika terbentuk buih, maka ditambahkan 4 tetes HCl 1N. Jika tidak terdapat buih, maka dilakukan pemanasan selama

kuran lebih 3 menit. Kemudian diamkan larutan hingga dingin, lalu dikocok kuat-kuat. Hasil positif ekstrak mengandung saponin jika terbentuk buih yang stabil selama kurang lebih 10 menit (Utami & Jariah, 2023).

d. Uji Steroid dan Terpenoid

Uji steroid dan terpenoid ekstrak rimpang lengkuas dan ekstrak rimpang temu blenyeh dilakukan secara terpisah. Uji ini dilakukan dengan 0,5 mg ekstrak ditambahkan 2,5 mL aquades, 0,5 mL kloroform (CHCl_3), dan 0,5 mL asam asetat anhidrat (CH_3COOH anhidrat). Kemudian ditambahkan 1 mL H_2SO_4 , dan dikocok hingga homogen. Hasil positif ekstrak mengandung steroid jika terbentuk warna hijau kebiruan, dan jika mengandung terpenoid terbentuk warna merah jingga (Safutri et al., 2024).

e. Uji Tanin

Uji tanin ekstrak rimpang lengkuas dan ekstrak rimpang temu blenyeh dilakukan secara terpisah. Uji tanin dilakukan dengan cara melarutkan 1 mg ekstrak dengan etanol secukupnya, kemudian dipanaskan di *waterbath*. Kemudian larutan disaring, dan filtrat ditambahkan dengan 3 tetes FeCl_3 1%. Hasil positif ekstrak mengandung tanin jika terjadi perubahan warna larutan menjadi biru tua atau hitam kehijauan. FeCl_3 digunakan untuk mendeteksi keberadaan gugus fenol, jika senyawa mengandung gugus tersebut maka

kemungkinan terdapat tanin, karena tanin merupakan senyawa polifenol (Utami & Jariah, 2023).

f. Uji Minyak Atsiri

Uji kandungan minyak atsiri yang terkandung dalam ekstrak rimpang lengkuas dan ekstrak rimpang temu blenyeh dilakukan secara terpisah. Uji ini dilakukan dengan 0,5 mg ekstrak dilarutkan dengan etanol sebanyak 1 mL dalam cawan porselen. Kemudian dipanaskan di atas kompor listrik hingga tersisa residu. Hasil positif mengandung minyak atsiri jika terdapat bau khas tanaman pada residu (Sari et al., 2024)

3. 4. 6 Uji Aktivitas Antimikroba Pada Ekstrak

a. Sterilisasi Alat

Sterilisasi alat yang akan digunakan sebelumnya sudah dicuci dan dikeringkan. Kemudian cawan petri, *beaker glass*, erlenmeyer, gelas ukur, tabung reaksi, dan pipet ditutup dengan kapas kemudian dibungkus menggunakan kertas koran. Selanjutnya alat-alat tersebut di autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit (Najmah et al., 2024). Sterilisasi untuk jarum ose dan pinset dengan teknik pemijaran yaitu dilakukan dengan cara membakar alat di atas nyala api secara langsung (Sambuaga et al., 2018).

b. Pembuatan Media *Potato Dextrose Agar* (PDA)

Pembuatan media PDA dibuat dengan cara ditimbang serbuk media PDA sebanyak 7,8 g dimasukkan ke erlenmeyer,

kemudian ditambahkan aquades 200 mL dan dipanaskan hingga mendidih dan larutan homogen. Setelah homogen larutan diukur pH media dengan stik pH, pH media PDA yang baik untuk jamur antara 4,5 – 5,5. Jika pH media kurang asam ditambahkan HCl 0,01 N ke media, dan jika media kurang basa ditambah NaOH 0,01 N. Kemudian media disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelahnya media dituang ke tabung reaksi sebanyak 5 mL, untuk membuat media miring sebagai media peremajaan jamur (Azzahra et al., 2020).

c. Pembuatan Media *Nutrient Agar* (NA)

Pada pembuatan media NA dibuat dengan cara sebanyak 5 g serbuk media NA disuspensikan dalam 250 mL aquades (Cempakasari et al., 2024), kemudian dipanaskan hingga mendidih dan diaduk sampai homogen atau media tersuspensi sempurna. Setelah homogen media disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Media yang sudah steril kemudian dituang pada tabung reaksi sebanyak 5 mL dalam kondisi hangat, lalu tabung reaksi dimiringkan pada kemiringan 30-45°. Kemudian tabung reaksi ditutup dengan kapas dan dibalut dengan plastik wrap (Widhorini & Rafianti, 2019).

d. Peremajaan Jamur dan Bakteri

Peremajaan jamur *Candida albicans* menggunakan media miring PDA dan bakteri *Propionibacterium acnes* menggunakan media miring NA. Peremajaan jamur dan bakteri dilakukan dengan cara mengambil masing-masing satu koloni dari jamur dan bakteri menggunakan jarum ose steril, kemudian digoreskan pada media agar miring. Selanjutnya media yang sudah digores diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Azizah et al., 2020).

e. Pembuatan Larutan Standar Mc Farland

Pembuatan larutan standar MC. Farland 0,5 dilakukan dengan cara sebanyak 9,95 mL H₂SO₄ 1% dimasukkan ke tabung reaksi, kemudian ditambahkan BaCl₂ 1% sebanyak 0,5 mL lalu dikocok hingga homogen dan terbentuk larutan keruh. Larutan ini digunakan sebagai pembanding kekeruhan suspensi biakan jamur *Candida albicans* dan bakteri *Propionibacterium acnes* (Rosmania & Yanti, 2020a).

f. Pembuatan Suspensi Jamur dan Bakteri

Pembuatan suspensi jamur *Candida albicans* dan bakteri *Propionibacterium acnes* dilakukan secara terpisah. Suspensi ini dilakukan dengan cara diambil satu ose koloni biakan jamur dan bakteri, kemudian dimasukkan ke tabung reaksi dan ditambahkan NaCl 0,9%. Kemudian larutan dikocok hingga

homogen dan dibandingkan kekeruhannya dengan larutan standar Mc Farland 0,5 (Rosmania & Yanti, 2020a).

g. Pembuatan Variasi Konsentrasi Kombinasi Ekstrak

Pembuatan variasi kombinasi ekstrak rimpang lengkuas dan ekstrak rimpang temu blenyeh dilakukan untuk mengetahui pada variasi konsentrasi kombinasi berapa ekstrak dapat menghambat jamur *Candida albicans* dan *Propionibacterium acnes* yang paling kuat. Pembuatan variasi konsentrasi yang dikategorikan menjadi A, B, C, D dan E pada 5 kombinasi ekstrak ini dibuat yang masing-masing kombinasi dilarutkan dengan DMSO 10% dalam labu ukur 10 mL. Berikut variasi konsentrasi kombinasi ekstrak rimpang lengkuas dan ekstrak temu blenyeh :

Tabel 3. 1 Variasi Konsentrasi Kombinasi Ekstrak Rimpang Lengkuas dan Ekstrak Rimpang Temu Blenyeh

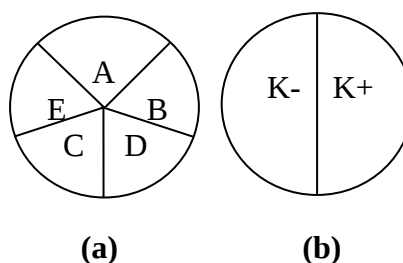
Kategori	Ekstrak rimpang lengkuas (%)	Ekstrak rimpang temu blenyeh (%)
A	0	100
B	25	75
C	50	50
D	75	25
E	100	0

h. Pengujian Aktivitas Antimikroba

1. Uji Aktivitas Antimikroba *Candida albicans*

Media PDA yang sudah disterilkan dituangkan ke dalam cawan petri. Kemudian setelah memadat ditambahkan suspensi jamur *Candida albicans* yang telah dibuat, dan diratakan dengan tabung L. Kemudian kertas

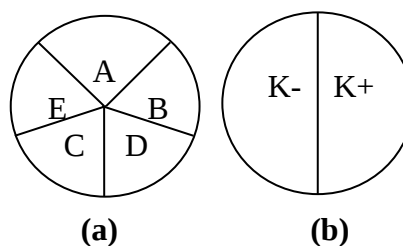
cakram yang telah direndam larutan variasi kombinasi ekstrak rimpang lengkuas dan ekstrak rimpang temu blenyeh, kontrol positif (ketokonazol 1%), dan kontrol negatif (DMSO 10%) selama 15 menit diletakkan di atas media. Ketokonazol digunakan sebagai kontrol positif karena merupakan obat antijamur yang dapat mengobati infeksi akibat jamur atau ragi, dan mampu menghambat pertumbuhan *Candida albicans* (Wisnianti et al., 2024). Selanjutnya cawan petri di inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C, dan dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali untuk didapatkan nilai rata-rata aktivitas daya hambat jamur *Candida albicans* (Rahmawati et al., 2021). Setelah di inkubasi, dilakukan pengukuran zona bening disekitaran kertas cakram untuk mengukur diameter daya hambat ekstrak (Bahri et al., 2023). Berikut gambar pengujian aktivitas antimikroba ekstrak terhadap jamur *Candida albicans* di cawan petri :



Gambar 3. 1 (a) Uji konsentrasi A, B, C, D dan E terhadap *Candida albicans*; (b) Kontrol positif, dan Kontrol negatif *Candida albicans*.

2. Uji Aktivitas Antimikroba *Propionibacterium acnes*

Media NA yang telah disterilisasi dituangkan ke dalam cawan petri. Kemudian setelah memadat ditambahkan suspensi bakteri *Propionibacterium acnes*, dan diratakan. Selanjutnya kertas cakram yang telah direndam di larutan variasi kombinasi ekstrak rimpang lengkuas dan ekstrak rimpang temu blenyeh, kontrol positif (klindamisin 1%), dan kontrol negatif (DMSO 10%) selama 15 menit diletakkan di atas media. Klindamisin digunakan sebagai kontrol positif karena merupakan obat antibiotik untuk jerawat, memiliki aktivitas bakteristatik, dan mampu menghambat pertumbuhan *Propionibacterium acnes* (Hikmah & Hasanah, 2023). Kemudian cawan petri di inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Pengukuran zona bening diukur dengan penggaris (Hitijahubessy et al., 2023). Berikut gambar pengujian aktivitas antimikroba ekstrak terhadap jamur *Propionibacterium acnes* di cawan petri :



Gambar 3. 2 (a) Uji konsentrasi A, B, C, D dan E terhadap *Propionibacterium acnes*; (b) Kontrol positif, dan Kontrol negatif *Propionibacterium acnes*

i. Pengukuran Zona Hambat

Pengukuran zona hambat dilihat dari zona bening yang terbentuk akibat aktivitas antimikroba dari ekstrak yang diuji di sekitar kertas cakram. Zona hambat yang terbentuk diukur dengan diameter vertikal dan diameter horizontal dengan satuan milimeter menggunakan penggaris (Toy et al., 2015). Pengukuran zona hambat dapat menggunakan rumus berikut : (Magvirah et al., 2019)

$$\frac{(D_v - D_c) + (D_h - D_c)}{2}$$

Keterangan :

D_v : Diameter Vertikal

D_h : Diameter Horizontal

D_c : Diameter Cakram

Hasil dari pengukuran diameter zona hambat yang dapat diartikan semakin besar diameter zona hambat maka efektivitas dalam menghambat mikroba semakin besar (Putri et al., 2023). Kategori zona hambat mikroba, sebagai berikut :

**Tabel 3. 2 Kategori Zona Hambat Mikroba
(Morales et al., 2003)**

Diameter zona hambat (mm)	Aktivitas antimikroba
< 5	Lemah
> 5 – 10	Sedang
> 10- 20	Kuat
> 20	Sangat kuat

3.5 Analisis Data

Data yang diperoleh dikumpulkan dan di analisis menggunakan data statistik SPSS. Data pada penelitian di uji normalitas menggunakan Uji *Shapiro Wilk* dan kemudian Uji *Homogeneity* untuk melihat homogenitas data penelitian. Syarat data terdistribusi normal dan homogen adalah jika nilai $p > 0,05$. Apabila data yang diperoleh tidak memenuhi syarat terdistribusi normal dan homogen maka data di analisis menggunakan uji non parametik *Kruskall Wallis*. Jika data yang diperoleh memenuhi syarat terdistribusi normal dan homogen maka data di analisis menggunakan uji parametik *One Way Anova*.