### BAB III

### METODE PENELITIAN

#### 3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian dilakukan dengan metode penelitian eksperimental, dimana variabel bebas pada penelitian ini yaitu simplisia daun kubis (*Brassica oleracea* L.), ekstrak daun kubis (*Brassica oleracea* L.), nanopartikel ekstrak daun kubis (*Brassica oleracea* L.), dan uji aktivitas antijamur difusi dan dilusi. Variabel terikat pada penelitian ini yaitu pemeriksaan karakterisasi simplisia, skrining fitokimia, karakteristik nanopartikel ekstrak daun kubis (*Brassica oleracea* L.), uji aktivitas antijamur terhadap *Malassezia furfur* dan analisis data. Rancangan meliputi pengumpulan dan pengolahan sampel, skrining fitokimia, pemeriksaan karakterisasi simplisia pembuatan ekstrak daun kubis (*Brassica oleracea* L.), pembuatan nanopartikel ekstrak daun kubis (*Brassica oleracea* L.) dan uji aktivitas antijamur.

#### 3.1.1 Variabel Penelitian

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pembuatan simplisia dan ekstrak daun kubis (*Brassica oleracea* L.), pembuatan nanopartikel ekstrak daun kubis (*Brassica oleracea* L.), dan aktivitas antijamur terhadap *Malassezia furfur*, sedangkan variabel terikat dalam penelitian ini adalah uji karakteristik, skrining fitokimia, karakteristik nanopartikel daun kubis (*Brassica oleracea* L.), dan uji aktivitas antijamur terhadap *Malassezia furfur.*

#### 3.1.2 Parameter Penelitian

Parameter pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Parameter karakteristik dari serbuk simplisia daun kubis meliputi makroskopik, mikroskopik, kadar abu, kadar sari larut dalam air, kadar sari larut dalam etanol, kadar abu total, dan kadar abu tidak larut asam.
2. Parameter skrining fitokimia metabolit sekunder dari ekstrak etanol daun kubis meliputi adanya senyawa flavonoid, alkaloid, saponin, tannin, steroid/ triterpenoid dan glikosida serta pengujian KHM dan KBM untuk melihat nilai KHM dan KBM.
3. Parameter karakteristik ekstrak dan nanopartikel ekstrak etanol daun kubis dengan menggunakan uji *Particle Suze Analyzer* (PSA).

#### 3.2 Jadwal dan lokasi penelitian

#### 3.2.1 Jadwal Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan pada januari 2024 - juli 2024.

#### 3.2.2 Lokasi Penelitian

Penelitian akan dilakukan di Laboratorium Farmasi Terpadu Universitas Muslim Nusantara Al-Washliyah Medan dan Herbarium Medanense ( MEDA) Universitas Sumatera Utara Medan.

#### 3.3 Bahan dan Peralatan

#### 3.3.1 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan meliputi: aquadest,ekstrak daun kubis, Potato Dextrose Agar (PDA), etanol 96%, Potato Dextrose Broth (PDB), jamur *Malassezia furfur*, HCL 2N, FeCl3 1%, Kloralhidrat, Bouchardat, Dragendorff, Mayer, Kloroform, asam asetat, DMSO (Dimetil Sulfoksida), anhidrat larutan standard Mcfarland 0,5, NaCl steril 0,9%, BaCl2.2H2O, H2SO4 1%, aquadest, ketoconazol.

#### 3.3.2 Peralatan Penelitian

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu wadah maserasi, rotary evaporator,batang pengaduk,lumpang dan alu,gelas kimia,gelas ukur,sendok tanduk, timbangan digital, autoklaf, Bunsen, jangka sorong, jarum ose, pipet tetes, cawan petri,dan *laminar air flow* (LAF), incubator, *Particle Size Analyzer* (PSA), Homogenizer, ayakan, tabung reaksi, oven.

#### 3.4 Persiapan Bahan

#### 3.4.1 Determinasi Sampel

Determinasi sampel dilakukan oleh Herbarium Medanense ( MEDA) Universitas Sumatera Utara terhadap daun kubis.

#### 3.4.2 Pengambilan Sampel

Tanaman daun kubis *(Brassica oleracea* L*.)* diperoleh dari pajak limun yang berada di Medan Sumatra Utara.

#### 3.4.3 Pengumpulan Sampel

Pengumpulan sampel dilakukan secara purposif yaitu mengambil tanaman dengan sengaja dari suatu tempat tanpa membandingkan dengan hasil dari daerah yang lain.

#### 3.4.4 Pengolahan Sampel

Sebelum dilakukan penyarian atau maserasi, terlebih dahulu daun kubis di sortasi basah. Sortasi basah merupakan suatu proses pemisahan sampel yang kualitasnya kurang baik seperti buah yang sudah busuk dan daun yang sudah layu. Setelah proses soratsi basah, kemudian sampel di cuci dengan menggunakan air yang bersih dan mengalir. Proses pencucian bertujuan untuk menghilangkan kotoran yang menempel, setelah proses pencucian kemudian sampel di angina- anginkan tanpa terkena matahari langsung karena dapat merusak kandungan dalam daun kubis (Depkes RI, 2008).

#### 3.4.5 Pembuatan Larutan Preaksi

1. **Bouchardat**

Iodide ditimbang sebanyak 4 gram, dilarutkan dalam air suling secukupnya, lalu ditambahkan 2 gram iodium sedikit demi sedikit secukupnya dengan air suling hingga 100 ml (Depkes RI, 1995).

#### Pereaksi Dragendorff

Bismuth (III) nitrat sebanyak 0,8 gram dilarutkan dalam asam nitrat 20 ml kemudian dicampurkan dengan 50 ml kalium iodide sebanyak 27,2 gram dalam 50 ml air suling. Didiamkan sampai memisah sempurna, selanjutnya diambil lapisan jernih nya, diencerkan dengan air hingga diperoleh 100 ml (Depkes RI, 1995).

#### Pereaksi Mayer

Raksa (II) klorida sebanyak 1,569 gram dilarutkan dengan air suling hingga 60 ml. Pada wadah lain 5 gram kalium iodide dilarutkan dalam 10 ml air suling. Kedua larutan dicampur, ditambahkan air suling hingga 100 ml (Depkes RI, 1995).

#### Asam klorida 2 N

Asam klorida pekat sebanyak 17 ml ditambahkan air suling sampai volume 100 ml (Depkes RI, 1995).

#### FeCI3 1%

Besi klorida ditimbang 1 gram, kemudian dilarutkan dengan air suling di dalam labu tentukur 100 ml hingga tanda batas (Depkes RI, 1989).

#### 3.4.6 Pembuatan Media Potato Dextrose Agar (PDA)

Potato Dextrose Agar (PDA) yaitu: Media PDA sebanyak 39 g dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan dilarutkandengan1000 mL aquades, kemudian dipanaskan hingga mendidih dan homogen, setelah homogen dibiarkan sehingga suhu larutan media menurun hingga suhu 36-37 °C, lalu pHmedia diukur(4.5-5.5) jika pH media kurang asam. Erlenmeyer ditutup dengan kapas dan kasa, kemudian media disterilkan di dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit (Azzahra et al., 2020).

#### 3.4.7 Pembuatan Potato Dextrose Broth (PDB)

Media PDB dibuat dengan cara Potato Dextrose Broth ditimbang sebanyak 7,8 gram. PDB di masukkan ke dalam erlenmeyer lalu ditambah aquadest sebanyak 200 ml. Larutan tersebut kemudian dipanaskan di atas hot plate dan diaduk hingga homogen dan larut. Setelah larut sempurna mulut Erlenmeyer disumbat dengan kapas lalu disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121℃ (Firmansyah dan nurul mukhlisa,2019).

#### 3.5 Prosedur Penelitian dan Pengumpulan Data

#### 3.5.1 Karakteristik Simplisia

Pemeriksaan karakteristik simplisia meliputi pemeriksaan makroskopik, mikroskopik, penetapan kadar air, penetapan kadar sari larut dalam air, penetapan kadar sari larut dalam etanol, penetapan kadar abu total, dan penetapan kadar abu tidak larut asam.

#### 3.5.2 Pemeriksaan makroskopik

Pemeriksaan makroskopik dilakukan dengan mengamati bentuk luar dari kubis meliputi warna, bentuk, bau, rasa dan ukuran daun (Ditjen POM, 1979).

#### 3.5.3 Pemeriksaan Mikroskpik

Pemeriksaan mikroskopik dilakukan terhadap serbuk simplisia daun kubis. Serbuk simplisia daun kubis diletakkan di atas kaca objek kemudian ditetesi dengan larutan kloralhidrat kemudian dipanaskan sebentar di atas api Bunsen dan ditutupi dengan cover gelas dan diamati di bawah mikroskop (Ditjen POM, 1979).

#### 3.5.4 Penetapan Kadar Air

Toluen dimasukkan kedalam labu alas bulat sebanyak 200 ml dan akuades 2 ml. Destilasi selama 2 jam, sampai seluruh air terdestilasi diperoleh toluen jenuh setelah itu toluen didinginkan dan disisihkan sedikit untuk pembilasan, volume air pada tabung penerima dibaca sebagai volume air awal dengan ketelitian 0,05 ml. Kemudian dimasukkan 5 gram serbuk simplisia daun kubis yang telah ditimbang seksama kedalam masing-masing labu yang berisi toluen jenuh, lalu dipanaskan hati-hati selama 15 menit. Setelah toluen mendidih, kecepatan tetesan diatur kurang lebih 2 tetes tiap detik sampai sebagian besar air tersuling. Kemudian kecepatan penyulingan dinaikkan hingga 4 tetes tiap detik. Setelah semua air tersuling, bagian dalam pendingin dibilas dengan toluen jenuh. Destilasi dilanjutkan selama 5 menit. Kemudian tabung penerima dibiarkan dingin sampai suhu kamar. Setelah air dan toluen memisah sempurna volume air dibaca sebagai volume air akhir dengan ketelitian 0,05 ml sebagai volume air akhir. Selisih kedua volume ini dibaca dan diperhitungkan kandungan air yang terdapat dalam bahan yang diperiksa dalam persen (Depkes RI, 1989).

$$\% Kadar air simplesia=\frac{\left(Volume akhir air-Volume awal air\right)}{erat Sampel (gram)}×100\%$$

#### 3.5.5 Penetapan Kadar Sari Larut dalam Air

Sebanyak 5 gram serbuk simplisia daun kubis dimaserasi selama 24 jam dalam 100 ml campuran air dan kloroform (2,5 kloroform dalam air sampai 1000 ml) dalam labu bersumbat sambil sesekali dikocok selama 6 jam pertama, kemudian dibiarkan selama 18 jam. Disaring, sejumlah 20 ml filtrat diuapkan sampai kering dalam cawan dangkal berdasar rata dan telah ditara, sisanya dipanaskan pada suhu 105° sampai bobot tetap. Kadar sari larut dalam air dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Depkes RI, 1989).

#### 3.5.6 Penetapan Kadar Sari Larut dalam Etanol

Sebanyak 5 gram serbuk simplisia daun kubis dimaserasi selama 24 jam dalam 100 ml etanol 96% dalam labu bersumbat sambil dikocok sesekali selama 6 jam pertama, kemudian dibiarkan selama 18 jam. Kemudian disaring, 20 ml filtrat diuapkan sampai kering dalam cawan berdasar rata yang telah ditara dan sisanya dipanaskan pada suhu 105°sampai bobot tetap. Kadar sari larut dalam etanol dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan (Depkes RI, 1989).

$$\% Kadar sari larut dalam etanol=\frac{Berat Sari Larut Air (gr)}{Berat sampel (gr)}+\frac{100}{20}×100\%$$

#### 3.5.7 Penetapan Kadar Abu Total

Sebanyak 2 gram serbuk simplisia daun kubis ditimbang seksama dimasukkan dalam kurs porselin yang telah dipijar dan ditara, kemudian diratakan. Kurs dipijar perlahan-lahan, kemudian naikkan suhu secara bertahap hingga 600°C sampai arang habis, jika arang masih tidak dapat dihilangkan, ditambahkan air panas, saring melalui kertas saring bebas abu. Pijarkan sisa dan kertas saring dalam kurs yang sama. Masukkan filtrat ke dalam kurs, uapkan, pijarkan hingga bobot tetap, timbang. Kadar abu dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan (Depkes RI, 1989).

#### 3.5.8 Penetapan Kadar Abu Tidak Larut Asam

Abu yang diperoleh dalam penetapan kadar abu total dididihkan dalam 25 ml asam klorida 2N selama 5 menit, bagian yang tidak larut dalam asam dikumpulkan, disaring melalui kertas saring bebas abu dan dicuci dengan air panas, dipijarkan kemudian didinginkan dan ditimbang sampai bobot tetap. Kadar abu yang tidak larut dalam asam dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan (Depkes RI, 1989).

#### 3.6 Pembuatan Ekstrak

Simplisia daun kubis 500g di maserasi dengan 3750ml etanol 96% dalam bejana tertutup dan di biarkan pada suhu kamar salaam 5 hari, terlindung dari cahaya matahari dan sesekali di aduk. Setelah itu, campuran itu disaring dan diperas ( menghasilkan maserat 1). Maserat dipisahkan dari ampas, yang kemudian dicuci dengan 1250ml etanol 96%, disaring, dan dipindahkan ke dalam bejana tertutup (maserat 2). Maserat 1dan maserat 2 di gabungkan dan di diamkan selama 2hari. Setelah itu, ekstraknya dokomsentrasi dengan menggunakan rotary evaporator pada suhu 60°C, menghasilkan ekstrak cair. Kemudian ekstrak ini diuapkan kembali di atas waterbath hingga diperoleh ekstrak yang kental (Depkes RI, 1979).

#### 3.7 Skrining Fitokimia

#### 3.7.1 Identifikasi Senyawa Flavanoid

1 g ekstrak pekat ditempatkan dalam cawan porselin, yang ditambahkan 2 mg bubuk magnesium sulfat dan 3 tetes HCl pekat. Tempatkan sampel dalam tabung reaksi, kocok dan amati perubahan yang terjadi. Terbentuknya warna merah, kuning atau jingga pada larutan menunjukkan adanya senyawa flavonoid (Yulianti et al., 2023).

#### 3.7.2 Identifikasi Senyawa Saponin

2 g ekstrak pekat ditempatkan dalam tabung reaksi. Ditambahkan 10 mL air panas kemudian dikocok secara vertikal selama ± 10 detik yang menunjukkan adanya buih pada sampel. Kemudian ditambahkan 1 tetes HCL 2N dan dikocok secaravertikal selama 10 detik. Terbentuknya buih setinggi 1-10 cm yang stabil selama minimal 10 menit (busa tidak hilang) menunjukkan adanya saponin (Yulianti et al., 2023).

#### 3.7.3 Identifikasi Senyawa Tanin

Ekstrak pekat sebanyak 1 g dimasukkan ke dalam gelas cawan porselin, ditambahkan 2 tetes larutan besi klorida 1%, kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi, diamati perubahan warnanya menjadi biru tua atau hitam kehijauan. Terjadi, hal ini menunjukkan adanya tannin (Yulianti et al., 2023).

#### 3.7.4 Identifikasi Senyawa Triterpenoid dan steroid

2 g ekstrak pekat diuapkan dalam cawan porselin yang dipanaskan dalam penangas air untuk membentuk residu. Residu kemudian dilarutkan dalam 0,5 mL kloroform, 0,5 mL asam asetat anhidrat dan 2 mL asam sulfat pekat ditambahkan melalui dinding tabung. Terbentuknya cincin berwarna kecoklatan atau ungu pada tepi larutan menunjukkan adanya triterpenoid, sedangkan adanya cincin berwarna biru kehijauan menunjukkan adanya steroid (Yulianti et al., 2023).

#### 3.7.5 Identifikasi Senyawa Alkaloid

2 g ekstrak pekat diuapkan di atas cawan porselin dalam penangas air untuk menghasilkan residu. Residu kemudian dilarutkan dalam 5 mL HCl 2N. Larutan yang dihasilkan dibagi menjadi 3 tabung reaksi. 3 tetes HCl 2N ditambahkan ke tabung reaksi pertama. 3 tetes reagen Bouchardat ditambahkan ke tabung kedua dan 3 tetes reagen Mayer ke tabung ketiga. Terbentuknya endapan jingga pada tabung kedua dan terbentuknya endapan kuning pada tabung ketiga menunjukkan adanya alkaloid (Yulianti et al., 2023).

#### 3.7.6 Identifikasi Senyawa Glikosida

1 g ekstrak etanol pekat ditimbang .5 ml asam asetat anhidrat dan 10 tetes asam sulfat ditambahkan dan ditempatkan dalam cawan porselin. Warna biru atau hijau yang dihasilkan menunjukkan adanya glikosida (Yulianti et al., 2023).

**3.7.7 Pembuatan Nanopartikel Ekstrak Etanol Kubis *(Brassica oleracea* L*.)***

Реmbuatan nanopartikel ekstrak daun kubis dibuat dengan metode *top down* dengan teknik *high speed Homogenization* (HSH) untuk operasi unit seperti penghancuran, pencampuran, dan stabilisasi padatan. Dengan menimbang 15g ekstrak kental daun kubis, kemudian di homogenizer 2000 rpm selama 5 jam. Setelah di homogenizer kemudian di ultrasonic cleaner selama 1 jam.

#### 3.8 Karakteristik Nanopartikel Ekstrak Kubis

#### 3.8.1 Distribusi Ukuran Partikel

Nanopartikel kitosan ekstrak dan natos dikarakterisasi menggunakan Particle Size Analyzer (PSA) untuk mengetahui ukuran partikel yang dihasilkan (Nataya, 2018). Pada karakterisasi ukuran partikel dengan PSA, spesimen dilarutkan dalam 3 ml etanol. Kemudian larutan tersebut dimasukkan ke dalam tabung dengan ketinggian larutan maksimum 15 mm. Kemudian distribusi diameter spesimen diukur menggunakan VASCO Nano Particle Analyzer. Pemeriksaan ini dilakukan berdasarkan metode *Dynamic Light Scattering* (DLS) menggunakan Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments).

#### 3.9 Penyiapan Uji Aktivitas antijamur

#### 3.9.1 Sterilisasi Alat

Sebelum alat digunakan perlu dilakukan sterilisasi alat. Alat yang di sterilkan yaitu cawan petri, tabung reaksi, beaker glass, erlenmeyer, pipet volume, gelas ukur, dibungkus dengan kertas lalu dimasukkan kedalam autoklaf selama 15 menit dengan suhu 1210C. untuk alat seperti jarum ose disterilkan dengan cara dibakar langsung pada api Bunsen. Lalu untuk media yang di gunakan disterilkan menggunakan autoklaf selama 15 menit dengan suhu 1210C (Sari,*et al*.,2019).

#### 3.9.2 Sumber Isolat jamur

Isolat jamur *Malassezia furfur* berasal dari biakan murni yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Farmasi Universitas Sumatera Utara.

#### 3.9.3 Pembuatan Media Potato Dextrose Agar (PDA)

Potato Dextrose Agar (PDA) yaitu: Media PDA sebanyak 39 g dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan dilarutkandengan1000 mL aquades, kemudian dipanaskan hingga mendidih dan homogen, setelah homogen dibiarkan sehingga suhu larutan media menurun hingga suhu 36-37 °C, lalu pHmedia diukur (4.5-5.5) jika pH media kurang asam. Erlenmeyer ditutup dengan kapas dan kasa, kemudian media disterilkan di dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit (Azzahra et al., 2020).

#### 3.9.4 Pembuatan Larutan Standar McFarland 0,5

Standart McFarland 0,5 menunjukkan konsentrasi kekeruhan suspensi e.costa setara dengan 1,5x108 CFU/mL. Larutan H2SO4 1% sebanyak 9,95 mL dicampurkan dengan larutan BaCl2.2H2O 1,175% sebanyak 0,05 mL dalam erlenmeyer. Kemudian dikocok sampai terbentuk larutan yang keruh. Kekeruhan ini dipakai sebagai standar kekeruhan suspensi bakteri uji (Kumowal dkk., 2019).

#### 3.9.5 Peremajaan Jamur

Satu koloni biakan murni jamur *Malassezia furfur* diambil stok kultur isolat jamur dengan jarum ose steril lalu diinokulasikan pada permukaan media PDA cawan petri, kemudian dinkubasi pada suhu 28ºC selama 18-24 jam hingga di peroleh subkultur jamur yang berumur 24 jam . Hasil subkultur selanjutnya digunakan untuk pembuatan suspensi dan pengujian antijamur ( sanjaya et al., 2021).

**3.9.6 Pembuatan Suspensi Jamur *Malassezia furfur***

Koloni jamur *Malassezia furfur* diambil satu ose kemudian dimasukkan ke dalam 5 ml NaCl 0,9% dalam tabung reaksi lalu dikocok hingga homogen. Kemudian kekeruhannya disetarakan dengan 0,5 larutan Mc Farland (Gunarti et al., 2023).

#### 3.10 Pengujian Aktivitas Antijamur

#### 3.10.1 Metode Dilusi Cair

Metode yang digunakan ialah metode serial dilusi atau pengenceran bertingkat. Metode pengujian menggunakan turbidimetri. Sebanyak 10 tabung reaksi steril disiapkan. Setiap tabung dimasukkan media *Potato Dextrose Broth* (PDB) sebanyak 3,5 mL dan 0,5 mL jamur *Malassezia furfur* yang setara dengan standar Mc Farland 0,5. Setiap tabung uji diberi label 1- 8, kemudian tabung 9 diberi label K (+) yang merupakan kontrol positif, yaitu tabung yang berisi media dan jamur. Tabung 10 diberi label K(-) yang merupakan kontrol negatif, yaitu tabung berisi Media dan ekstrak. Tabung 1- 8 dimasukkan ekstrak daun kubis *(Brassica oleracea* L*.)* dengan konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5% dan 6,25%, 3,125%, 1,56%, 0,78% dan nanopartikel ekstrak daun kubis *(Brassica oleracea* L*.)* 10%, 5%, 2,5%, 1,25% dan 0,625%, 0,3125%, 0,156%, 0,078% masing masing sebanyak 1 mL dan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometri uv-vis.

Selanjutnya media tabung perlakuan diinkubasi selama 48 jam dan kemudian dilakukan kembali pengukuran absorbansi kembali menggunakan spektrofotometri uv-vis, semua tabung tersebut dilihat kekeruhannya secara visual, bila kekeruhan masing-masing tabung masih setara atau lebih keruh dari tabung K(+) yang berisi media dan jamur berarti jamur masih dapat bertumbuh, tetapi bila larutan dalam tabung terlihat mulai lebih jernih daripada tabung K(-) berarti pertumbuhan jamur mulai terhambat. Hal inilah yang menunjukkan konsentrasi hambat minimum (KHM). Kadar hambat minimum ditentukan dengan konsentrasi ekstrak terkecil pada tabung perlakuan yang sudah mulai menghambat pertumbuhan jamur.

#### 3.10.2 Metode Dilusi Padat

Sebanyak 25 mL PDA dituangkan ke dalam cawan petri steril dan dibiarkan selama beberapa menit sehingga menjadi padat. Kemudian dipipet sejumLah 0,1 mL dari tiap -tiap pengenceran kemudian disebarkan di atas media PDA steril. Selanjutnya dilakukan inkubasi selama 48 jam pada suhu 37℃ KBM ditentukan dengan pengamatan ada tidaknya pertumbuhan jamur dalam media agar setelah diinkubasi. Konsentrasi terendah yang memperlihatkan kematian jamur (tidak ada pertumbuhan) merupakan nilai KBM. Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif berupa konsentrasi terendah dari ekstrak yang mampu menghambat dan membunuh *Malassezia furfur*.

#### 3.11 Analisis Data

Data yang diperoleh pada pengujian aktivitas antijamur diolah secara statistik dengan metode one way ANOVA pada taraf kepercayaan 95% dengan menggunakan program SPSS.