

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Desain Penelitian**

Desain penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratoris.

#### **B. Tempat dan Waktu Penelitian**

##### **1. Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Penelitian FKIK UMY dan Laboratorium Mikrobiologi FKIK UMY

##### **2. Waktu Penelitian**

Penelitian dilakukan pada bulan Agustus 2016 – Mei 2017. Rancangan jadwal kegiatan dapat dilihat pada lampiran.

#### **C. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional**

##### **1. Variable Penelitian**

Variabel Bebas : Variasi konsentrasi uji pada masing-masing fraksi pelarut ekstrak etanolik pelepah pisang Ambon (*Musa paradisiaca*).

Variabel Tergantung : Kadar Hambat Minimum (KHM) dan Kadar Bunuh Minimum (KBM) pada masing-masing fraksi pelarut dari ekstrak etanolik pelepah pisang (*Musa paradisiaca*)

Variabel Terkendali : Media pertumbuhan jamur

## 2. Definisi Operasional

- a) Konsentrasi ekstrak dan fraksi pelepah tanaman pisang Ambon adalah ekstrak dan fraksi pelepah yang diencerkan menggunakan aquades dan ditambahkan suspensi bakteri, dinyatakan dalam mg/ml.
- b) Kadar Hambat Minimum (KHM) adalah konsentrasi terendah dari antijamur yang dapat menghambat pertumbuhan jamur. Penentuan nilai KHM didasarkan pada kadar konsentrasi terendah dari masing-masing konsentrasi fraksi yang masih mampu untuk menghambat pertumbuhan jamur pada media agar dibandingkan dengan kontrol negatif.
- c) Kadar Bunuh Minimum (KBM) adalah konsentrasi terendah dari antijamur yang dapat membunuh jamur. Penentuan nilai KBM didasarkan pada kadar konsentrasi yang benar-benar jernih dan tidak ditumbuhi jamur pada media agar dibandingkan dengan kontrol positif.

## D. Instrumen Penelitian

### 1. Alat Penelitian

Penelitian ini dilakukan menggunakan alat-alat yaitu bejana (*Stainless steel*), pisau (HB Stainless ®), blender, *rotary evaporator* (Heidolp ®), penangas (Akebonno ®), penggaris (Brand ®), oven (Shimadzu ®), inkubator (Memmert ®), autoklaf (All American ®), propipet (Glasfirm ®), mikropipet (Gilson ®), timbangan analitik (Casbee ®), alat-alat gelas (Pyrex ®), kertas label (Brand ®), kain hitam, centrifuge (Digisystem Laboratory Instrument®), *Laminal Air Flow*, kapas lidi, ose steril, aluminium foil, pinset, dan seperangkat computer (Acer).

## 2. Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang akan digunakan adalah Pelepah pisang Ambon diambil di Kecamatan Kencong – Kabupaten Jember, ketokonazol 10%, pelarut Dimetil Sulfoksida (DMSO) (Merck ®), etanol 96% (Brataco ®), etilasetat (Brataco ®), *n*-heksan (Brataco ®), koloni *Candida albicans*, NaCl fisiologis, BHI, media agar SDA dan aquades (Brataco ®).

## E. Cara Kerja

### 1. Determinasi

Determinasi pelepah tanaman pisang Ambon dilakukan di Laboratorium Farmasi Universitas Gajah Mada

### 2. Ekstraksi Pelepah Pisang Ambon

Dalam penelitian ini peneliti menggunakan metode ekstraksi maserasi. Pertama adalah pengambilan pelepah diambil pada pelepah nomor 3-6. Pengambilan pelepah 5 cm dari batang pohon pisang. Bagian pelepah yang sudah diambil ditimbang sebanyak 5 kg. Pelepah dipotong kira kira dengan ukuran 0,5x0,5 cm. Pelepah yang sudah dipotong kemudian dijemur sampai kering dengan ditutup kain hitam. Pelepah pisang yang sudah kering dihaluskan hingga menjadi serbuk. Selanjutnya, setiap bagian serbuk direndam dalam tabung erlenmeyer dengan alkohol 96% dengan perbandingan 1 : 5 selama 3 hari. Kemudian rendaman serbuk diaduk tiap kali menambahkan pelarut. Hasil rendaman di evaporasikan dengan *rotary evaporator* dan dilakukan penguapan dengan pemanasan di

bawah 60°C sampai didapatkan ekstrak kental. Hasil ekstraksi disimpan didalam lemari pendingin dengan suhu 4°C.

### **3. Fraksinasi Pelepah Pisang Ambon**

Ekstrak kental yang sudah didapatkan, kemudian akan dilakukan fraksinasi dengan metode ekstraksi cair-cair menggunakan pelarut etanol, *n*-heksan dan etilasetat. Mula-mula dilakukan fraksinasi dengan pelarut *n*-heksan, kemudian dilanjutkan dengan melakukan fraksi etilasetat, dan sisanya dipekatkan hingga mendapatkan fraksi etanol. Fraksinasi dilakukan dari pelarut dengan tingkat kepolaran yang rendah atau nonpolar bertujuan agar proses pengikatan senyawa bertahap dan agar seluruh senyawa tidak ditarik oleh pelarut polar yang bersifat menarik seluruh senyawa (Edawati 2012). Kemampuan mengikat senyawa oleh tingkat kepolaran tersebut menyebabkan fraksinasi dengan pelarut polar dilakukan paling akhir.

#### **a. Pembuatan fraksi *n*-heksan**

Sejumlah 10 g ekstrak etanol kental dilarutkan sedikit demi sedikit kedalam 30 ml etanol destilat dan air 2 ml dibantu dengan ultraturax agar larut sempurna, masukkan ke dalam beker gelas diaduk sampai homogen. Kemudian ditambahkan *n*-heksan perbandingan 1:1 dengan etanol destilat yaitu 30 ml, gojok pelan-pelan menggunakan corong pisah. Kemudian diamkan hingga terbentuk dua lapisan yaitu lapisan atas (fase *n*-heksan) dan lapisan bawah (fase etanol). Simpan fase *n*-heksan yang diperoleh. Fase etanol dimasukkan kembali kemudian

ditambahkan *n*-heksan 30 ml untuk dilakukan partisi. Partisi dilakukan sebanyak enam kali dengan menambahkan 30 ml *n*-heksan pada setiap kali melakukan partisi. Masing-masing fase cair yang diperoleh yaitu fase *n*-heksan dan fase etanol. fase *n*-heksan kemudian dilakukan pemekatan menggunakan penguap berputar pada suhu 40°C, kecepatan 50 rpm, dan vakum 200 mBar hingga diperoleh fraksi *n*-heksan kental (fraksi non-polar). Simpan fase etanol yang diperoleh, selanjutnya akan kita tambahkan untuk proses pembuatan fraksi etilasetat.

#### **b. Pembuatan fraksi etilasetat**

Fase etanol yang didapatkan dari proses pembuatan fraksi *n*-heksan tadi ditambahkan dengan 30 ml etilasetat dan air 2 ml dibantu dengan ultraturax agar larut sempurna, kemudian dimasukkan ke dalam beker gelas aduk sampai homogen, gojok pelan-pelan menggunakan corong pisah. Kemudian diamkan hingga terbentuk dua lapisan yaitu lapisan atas (fase etilasetat) dan lapisan bawah (fase etanol). Simpan fase etilasetat yang diperoleh. Fase etanol dimasukkan kembali kemudian ditambahkan etilasetat 30 ml untuk dilakukan partisi. Partisi dilakukan sebanyak enam kali dengan menambahkan 30 ml etilasetat redistilasi pada setiap kali melakukan partisi. Masing-masing fase cair yang diperoleh yaitu fase etilasetat dan fase etanol kemudian dilakukan pemekatan menggunakan penguap berputar pada suhu 40°C, kecepatan 50 rpm, dan vakum 200 mBar hingga diperoleh fraksi etilasetat kental (fraksi semipolar) dan fraksi etanol kental (fraksi polar).

#### 4. Skrining Fitokimia

##### a. Uji Forth

Uji Forth adalah uji yang bertujuan untuk membuktikan adanya senyawa saponin yang terdapat pada ekstrak. Langkah pertama sampel ekstrak diambil 2 mg dan ditambahkan aquades 2 ml, diaduk hingga larut, kemudian ditambahkan aquades lagi hingga 10 ml, dikocok selama 30 detik dengan ditambahkan HCL akan timbul busa (Suyono, 2005).

##### b. Uji Kromatografi Lapis Tipis

Uji analisis kualitatif terhadap fraksi etanol, fraksi etilasetat, dan fraksi *n*-heksan ekstrak etanolik pelepah pisang Ambon pada penelitian ini dilakukan terhadap golongan senyawa saponin, tanin, dan flavonoid yang berperan aktif sebagai agen antijamur. Uji kromatografi lapis tipis pada penelitian ini menggunakan fase diam lempeng silika gel GF<sub>254</sub> dengan ukuran 3 x 10 cm dan fase gerak *n*-heksan dan etilasetat dengan perbandingan 1 : 2. Hasil diamati dengan dengan cara melihat warna bercak yang timbul dibawah sinar ultraviolet (UV) 254 nm dan 366 nm, bercak dapat diperjelas dengan rekasi penyemprotan. Kemudian dihitung Rf nya dengan rumus sebagai berikut:

$$Rf = \frac{\text{jarak yang ditempuh oleh sampel}}{\text{jarak yang ditempuh oleh pelarut}}$$

Analisis kandungan senyawa dengan KLT terhadap fraksi etanol, fraksi etilasetat, dan fraksi *n*-heksan ekstrak etanolik pelepas pisan Ambon dilakukan dengan ketentuan seperti berikut ini:

a. Saponin

Fase diam : silika gel GF<sub>254</sub>

Fase gerak : *n*-heksan : etilasetat (1 : 2)

Deteksi : Sinar UV 254, 366, *Liebermann-Burchard*

b. Tanin

Fase diam : silika gel GF<sub>254</sub>

Fase gerak : *n*-heksan : etilasetat (1 : 2)

Deteksi : Sinar UV 254, 366, FeCl<sub>3</sub>

c. Flavonoid

Fase diam : silika gel GF<sub>254</sub>

Fase gerak : *n*-heksan : etilasetat (1 : 2)

Deteksi : Sinar UV 254, 366, Sitroborat

## 5. Uji Aktivitas Antijamur

### a. Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan dilakukan sterilisasi terlebih dahulu. Alat-alat gelas disterilkan menggunakan oven dengan suhu 170°C selama 2 jam. Ose dan pinset disterilkan dengan menggunakan Bunsen. Sampel yang telah dibuat seri konsentrasi, semua alat, dan bahan kecuali suspensi bakteri sebelum dilakukan pengujian disterilisasi menggunakan lampu UV selama 30 menit.

**b. Pembuatan standart McFarland 0,5 %**

McFarland adalah standart uji yang memungkinkan perbandingan visual dari kepadatan bakteri atau jamur. McFarland dibuat dengan mencampurkan 0,05 mL BaCl<sub>2</sub> 1,175% dengan 9,95 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1%. Tutup dengan rapat menggunakan aluminium foil, kocok menggunakan vortex, lalu simpan pada suhu ruang di tempat gelap. Standart McFarland digunakan sebagai dasar perbandingan pembuatan suspensi jamur *Candida albicans* dengan cara membandingkan kekeruhan secara visual.

**c. Pembuatan suspensi jamur**

Jamur *C. albicans* dikembangkan dulu dengan cara mengambil beberapa koloni lalu dioleskan pada media SDA inkubasi selama 2 hari. Ambil 4 koloni *C. albicans* masukkan ke tabung yang sudah diisi dengan BHI 0,5 ml, lalu ditambahkan NaCl 0,9% hingga tingkat kekeruhan yang sama dengan standart McFarland yaitu 12 ml kemudian dibandingkan secara visual menggunakan latar belakang garis horizontal hitam putih. Inkubasi selama 4 jam suhu 37°C.

**d. Pembuatan Seri Konsentrasi**

Untuk pembuatan konsentrasi ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan, dan fraksi etilasetat ekstrak etanolik pelepah pisang Ambon ditimbang sebanyak 200 mg larutkan dengan 2 ml aquades, kemudian dari larutan 200 mg/2ml bagi menjadi 2 bagian, bagian

pertama sebagai seri konsentrasi 100 mg/ml dan bagian yang lain dibuat pengenceran 50 mg/ml, 25 mg/ml, 12,5 mg/ml, dan 6,25 mg/ml.

**e. Pembuatan Kontrol Positif**

Kontrol positif menggunakan tablet ketokonazol 200 mg dengan konsentrasi 10% memakai pelarut DMSO. Mula-mula ketokonazol digerus dan ditimbang mendapatkan berat total 340 mg. Untuk menghasilkan larutan uji dengan konsentrasi tersebut, maka dilakukan konversi dosis yaitu dosis yang diminta dibagi dosis ketokonazol kemudian dikali dengan berat sesungguhnya. Dari penghitungan itu didapatkan berat ketokonazol 170 mg dilarutkan dalam 1 ml DMSO.

**f. Pembuatan Kontrol Negatif**

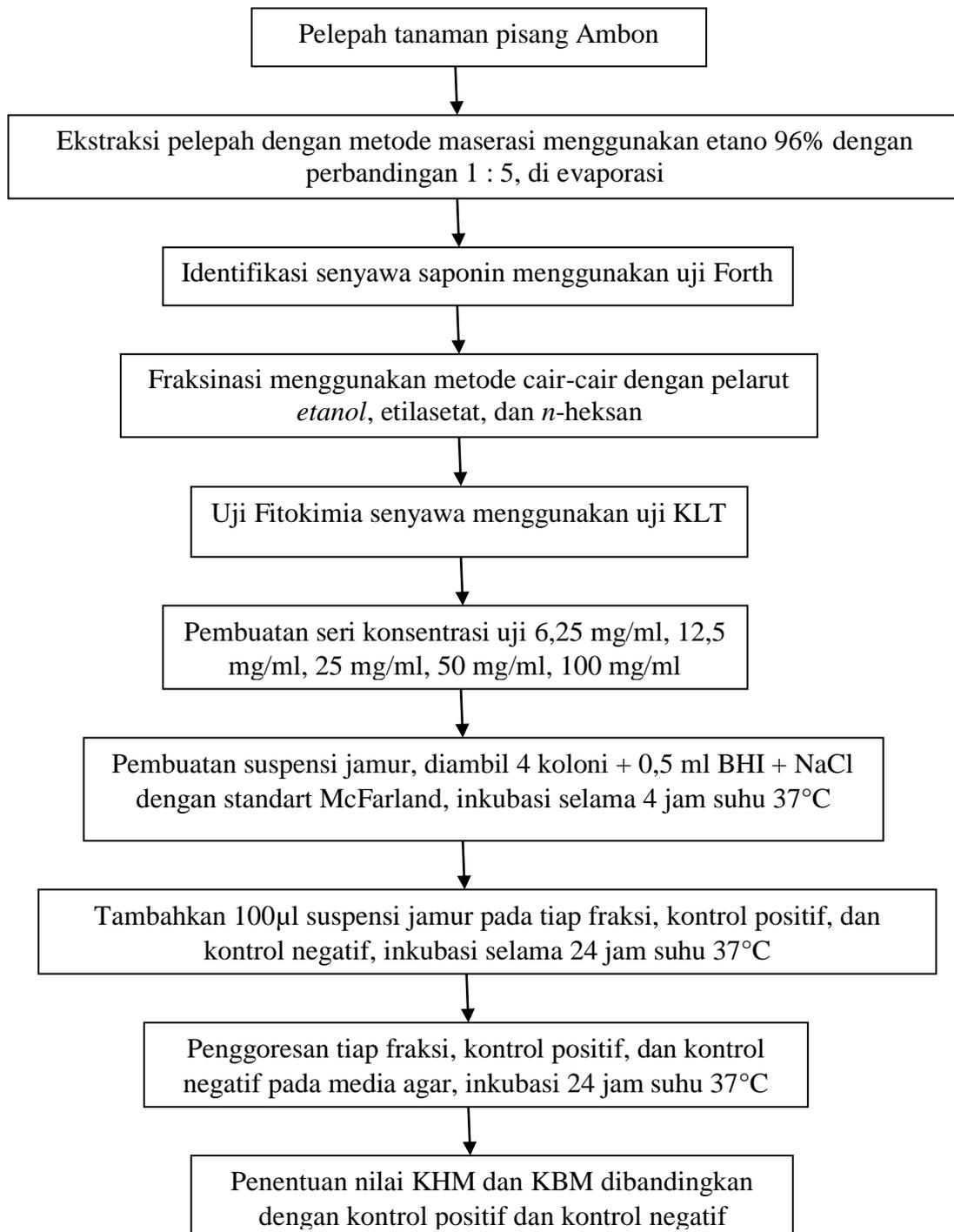
Kontrol negatif dari 100  $\mu$ L suspensi bakteri ditambahkan 0,5 mL BHI, dan pelarut ekstraknya yaitu DMSO. Ditambahkan DMSO untuk membuktikan bahwa DMSO tidak mempengaruhi aktivitas jamur *C. albicans*.

**g. Uji Daya Antijamur Terhadap *C. albicans***

Uji ini dilakukan untuk mengetahui Kadar Hambat Minimum (KHM) dan Kadar Bunuh Minimum (KBM) dari setiap kadar ekstrak yang akan diuji. Uji dilusi cair dilakukan dengan cara mengambil suspensi jamur yang telah dibuat + media BHI

sebanyak 0,5 ml lalu dimasukkan ke dalam 1 ml masing-masing seri kadar fraksi etanol, fraksi etilasetat, dan fraksi *n*-heksan pelepah pisang Ambon (*Musa paradisiaca*) dengan konsentrasi 6,25 mg/ml, 12,5 mg/ml, 25 mg/ml, 50 mg/ml, dan 100 mg/ml b/v di dalam tabung reaksi dan divortek. Sebagai kontrol positif berisi 100 µl suspensi jamur + media BHI 0,5 ml dan ketokonazol 10 %, dan kontrol negatif berisi 100 µl suspensi jamur + media BHI 0,5 ml dan DMSO 1 ml. Semua perlakuan dilakukan dalam Laminar Air Flow dan direplikasi sebanyak 3 kali. Setelah itu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Kemudian diamati ada atau tidaknya kekeruhan pada tabung uji secara visualisasi, hal ini dilakukan untuk mengetahui ada atau tidak jamur yang tumbuh di dalam tabung reaksi setelah diinkubasi. Setelah diinkubasi kemudian dilakukan penggoresan untuk penegasan pengamatan dengan cara mengambil sebanyak 1 ose dari masing-masing tabung reaksi kemudian digoreskan pada media SDA tanpa penambahan mikroba uji dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Nilai KHM didapatkan dari pengamatan konsentrasi terendah yang sudah bisa menghambat jamur *Candida albicans* dibandingkan dengan kontrol negatif dan nilai KBM didapatkan dari pengamatan konsentrasi terendah yang sudah tidak terdapat jamur *Candida albicans* pada media agar SDA dibandingkan dengan kontrol positif (Pratiwi, 2008).

### G. Alur Penelitian



**Gambar 4.** Alur Penelitian

## H. Analisis Data

1. Analisis kandungan senyawa saponin, tanin, dan flavonoid pada sampel dilakukan menggunakan metode KLT dengan cara membandingkan kesesuaian warna bercak yang dilakukan dibawah sinar UV 254 nm, UV 366 nm, dan sinar tampak dengan menggunakan pereaksi semprot.
2. Analisis hasil uji antijamur dilakukan dengan cara melihat koloni yang tumbuh pada media nutrient setelah dioles sampel uji yang sudah diberikan suspensi jamur *Candida albicans*. Penentuan nilai KHM didasarkan pada kadar konsentrasi terendah dari masing-masing konsentrasi fraksi yang masih mampu untuk menghambat pertumbuhan jamur pada media nutrient dibandingkan dengan kontrol negatif. Penentuan nilai KBM didasarkan pada kadar konsentrasi yang benar-benar jernih dan tidak ditumbuhi jamur pada media nutrient dibandingkan dengan kontrol positif.