

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Disain Penelitian

Disain penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental murni laboratoris secara *in vitro*.

B. Populasi dan Sampel

1. Bahan uji yang digunakan adalah ekstrak etanol dan fraksi air tanaman *Myrmecodia pendans* Merr. & Perry dengan 5 konsentrasi yaitu 3.125%, 6.25%, 12.5%, 25%, dan 50%.
2. Bahan yang digunakan sebagai kontrol positif adalah nistatin, sedangkan kontrol negatifnya yaitu akuades.
3. Bakteri uji yang digunakan adalah bakteri *Candida albicans* dengan konsentrasi 10^8 CFU/ml.

C. Waktu dan Tempat Penelitian

1. Tempat Penelitian
 - a. Tanaman *M. pendans* adalah tanaman yang diperoleh dari Papua, Indonesia.
 - b. Pembuatan ekstrak etanol dan fraksi tanaman *M. pendans* dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.
 - c. Pembuatan sampel kultur jamur *C. albicans* dilakukan di Balai Laboratorium Kesehatan Yogyakarta.

d. Pelaksanaan uji aktivitas antijamur ekstrak etanol dan fraksi air tanaman *M. pendans* dilakukan di Balai Laboratorium Kesehatan Yogyakarta.

2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Agustus 2017 sampai dengan bulan November 2017.

D. Variabel dan Definisi Operasional

a. Variabel

1. Variabel Pengaruh

Ekstrak etanol dan fraksi air tanaman *M. pendans* dengan konsentrasi 3.125%, 6.25%, 12.5%, 25%, dan 50%.

2. Variabel Terpengaruh

Kadar Hambat Minimal (KHM) jamur *C. albicans*.

3. Variabel Terkendali

a. Ekstrak etanol dan fraksi air tanaman *M. pendans*.

b. Kontrol positif

c. Kontrol negatif

d. Suhu inkubator 37°C

e. Waktu inkubasi 18-24 jam

f. Konsentrasi larutan *C. albicans* (10^8 CFU/ml)

g. Jenis medium pembiakan bakteri BHI

h. Media pertumbuhan bakteri

i. Konsentrasi ekstrak etanol dan fraksi air tanaman *M. pendans*

- j. Tanaman *M. pendans* yang digunakan berasal dari tempat yang sama

b. Definisi Operasional

1. Ekstrak etanol tanaman *M. pendans* adalah hasil ekstraksi tanaman *M. pendans* dengan metode maserasi menggunakan etanol 96%.
2. Fraksi *M. pendans* adalah hasil fraksinasi tanaman *M. pendans* yang didapat dengan metode fraksinasi menggunakan corong pisah.
3. *Candida albicans* adalah jamur patogen dari rongga mulut yang didapat dari Balai Laboratorium Kesehatan Yogyakarta.
4. Kadar Hambat Minimal adalah konsentrasi minimal yang dibutuhkan ekstrak etanol dan fraksi air tanaman *M. pendans* untuk menghambat pertumbuhan jamur *C. albicans*.
5. Uji Daya Antijamur adalah uji daya antijamur tanaman *M. pendans* terhadap *C. albicans* dengan metode difusi.

E. Alat dan Bahan

1. Alat penelitian :
 - a. Tabung erlenmeyer
 - b. Corong *buncher*
 - c. Alat penyerbuk
 - d. Oven
 - e. *Vacum rotary evaporator*
 - f. Cawan petri
 - g. Ose
 - h. Lampu spiritus

- i. Tabung reaksi
- j. Rak
- k. Kertas saring steril
- l. Mikropipet 50 μ l
- m. Pipet
- n. *Perforator* diameter 6
mm
- o. *Sliding caliper*
- p. Inkubator
- q. DensiChek digital
- r. Masker dan sarung
tangan
- s. Neraca timbangan
- t. Waterbath
- u. Kertas saring
- v. *Magnetic Stirrer*

2. Bahan penelitian :

- a. Jamur *Candida albicans* dari Balai Laboratorium Kesehatan Yogyakarta
- b. Tanaman *Myrmecodia pendans* Merr. & Perry dari Papua
- c. Etanol 96%
- d. Aquades steril
- e. Pelarut heksan
- f. Pelarut n-heksan
- g. Pelarut etilasetat

F. Jalannya penelitian

1. Penyusunan proposal penelitian

Proposal penelitian mulai disusun sejak bulan Maret 2017. Setelah penyusunan proposal dan sebelum penelitian dilakukan, peneliti harus mengajukan ijin penelitian serta etik penelitian (*ethical clearance*) terlebih dahulu.

2. Persiapan Penelitian

Penyiapan alat dan bahan serta sterilisasi alat dan diri.

3. Identifikasi Tanaman

Tanaman *M. pendans* yang telah dikumpulkan diambil beberapa sampel untuk di ekstrak.

4. Pembuatan ekstrak etanol dan fraksi air tanaman *M. pendans*

Pembuatan ekstrak etanol dan fraksi air tanaman *M. pendans* dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

a. Pembuatan Ekstrak

Tanaman *M. pendans* dipilih dan diambil sebanyak 1000 gram kemudian dicuci dengan air mengalir dan dipotong menjadi beberapa bagian. Lalu potongan *M. pendans* dikeringkan dengan oven pada suhu 50°C selama 5 jam. Setelah kering tanaman dijadikan serbuk dengan cara digiling menggunakan mesin penyerbuk hingga halus. Sebelum dilakukan proses maserasi, tanaman *M. pendans* yang sudah berbentuk serbuk ini dilakukan proses penyaringan lemak terlebih dahulu dengan cara merendamnya dalam *petroleum eter* agar tidak mengganggu proses penyairan.

Proses maserasi dilakukan selama 24 jam dengan 3 kali pengulangan menggunakan pelarut etanol 96%. Hasil maserasi lalu disaring sebanyak 3 kali menggunakan corong *buncher* sehingga didapat filtrat I. Filtrat I kemudian diuapkan dengan *waterbath*, sedangkan ampasnya kembali dimaserasi menggunakan pelarut yang sama selama 24 jam. Kemudian filtrat disaring sehingga didapatkan filtrat II dan ampasnya di maserasi lagi untuk mendapatkan filtrat III. Untuk memperoleh ekstrak kental dengan

konsentrasi 100%, filtrat I, filtrat II, dan filtrat III dicampur kemudian diuapkan menggunakan *vaccum rotary evaporator* pada suhu 60-70⁰ C.

b. Pembuatan Fraksi

Sebagian ekstrak kental yang sudah dibuat akan digunakan sebagai bahan uji, sedangkan sebagian lainnya difraksinasi untuk mendapatkan fraksi yang diinginkan. Untuk mendapatkan fraksi heksan, ekstrak etanol ditambahkan sedikit pelarut etanol 96% lalu diaduk sampai larut, tambahkan akuades, kemudian fraksinasi dengan pelarut heksan, kocok dan didiamkan hingga terbentuk 2 lapisan yaitu lapisan fraksi heksan dan lapisan residu fraksi heksan. Pisahkan fraksi heksan dan fraksinasi kembali menggunakan pelarut heksan beberapa kali hingga diperoleh fraksi heksan yang jernih. Kemudian lapisan residu heksan ditambahkan dengan pelarut n-heksan (prosedur sama dengan fraksinasi heksan) hingga diperoleh fraksi n-heksan yang jernih (tidak memberikan hasil positif terhadap pereaksi Lieberman-Burchard). Setelah itu, lapisan residu n-heksana ditambahkan dengan pelarut etilasetat (prosedur sama dengan fraksinasi n-heksana) hingga diperoleh fraksi etilasetat yang jernih (tidak memberikan hasil positif terhadap pereaksi FeCl₃), sisa dari fraksinasi etilasetat adalah fraksi air. Hasil fraksi heksan, n-heksan, etilasetat, dan fraksi air selanjutnya

diuapkan menggunakan *rotary evaporator* dan di *freeze dryer* (-40°C) hingga diperoleh ekstrak kering dari fraksi-fraksi tersebut.

c. Pembuatan Konsentrasi

Ekstrak etanol dan fraksi air tanaman *M. pendans* diencerkan sesuai konsentrasi yang diinginkan yaitu 3.125%, 6.25%, 12.5%, 25%, dan 50%.

Pengenceran ekstrak etanol diperoleh menggunakan akuades steril, dengan konsentrasi :

- Konsentrasi 3.125% = 31.25 mg ekstrak kental + 1 ml akuades kemudian divortex sampai homogen
- Konsentrasi 6.25% = 62.5 mg ekstrak kental + 1 ml akuades kemudian divortex sampai homogen
- Konsentrasi 12.5% = 125 mg ekstrak kental + 1 ml akuades kemudian divortex sampai homogen
- Konsentrasi 25% = 250 mg ekstrak kental + 1 ml akuades kemudian divortex sampai homogen
- Konsentrasi 50% = 500 mg ekstrak kental + 1 ml akuades kemudian divortex sampai homogen

Pengenceran fraksi air juga dengan menggunakan akuades, sebagai berikut :

- Konsentrasi 3.125% = 31.25 mg fraksi air kental + 1 ml akuades kemudian divortex sampai homogen

- Konsentrasi 6.25% = 62.5 mg fraksi air kental + 1 ml akuades kemudian divortex sampai homogen
- Konsentrasi 12.5% = 125 mg fraksi air kental + 1 ml akuades kemudian divortex sampai homogen
- Konsentrasi 25% = 250 mg fraksi air kental + 1 ml akuades kemudian divortex sampai homogen
- Konsentrasi 50% = 500 mg fraksi air kental + 1 ml akuades kemudian divortex sampai homogen.

5. Pemiakan Jamur *Candida albicans*

Koloni jamur *C. albicans* di subkultur pada lempeng agar *saboraud dextrose agar* (SDA) pada suhu 37⁰C selama 24 jam. Ambil beberapa koloni dengan menggunakan ose steril kemudian dimasukkan ke dalam NaCl, kemudian standarisasi sesuai standar 0.5 McFarland dengan menggunakan DensiChek.

6. Hitung jumlah pengulangan sesuai rumus Federer (1977), supaya data yang didapat valid :

$$(r-1)(t-1) \geq 15$$

r = banyak pengulangan

t = perlakuan

Penelitian ini menggunakan sampel ekstrak etanol dan fraksi air dengan konsentrasi masing-masing 3.125%, 6.25%, 12.5%, 25%, dan 50%. Sehingga $t = 2 \times 5 = 10$.

$$(r-1)(t-1) \geq 15$$

$$= (r-1)(10-1) \geq 15$$

$$= (r-1)(9) \geq 15$$

$$= 9r - 9 \geq 15$$

$$= 9r \geq 15 + 9$$

$$= 9r \geq 24$$

$$= r \geq 2.67$$

Jadi banyak pengulangan yang harus dilakukan sesuai dengan rumus Federer (1977), yaitu lebih dari sama dengan 3 kali.

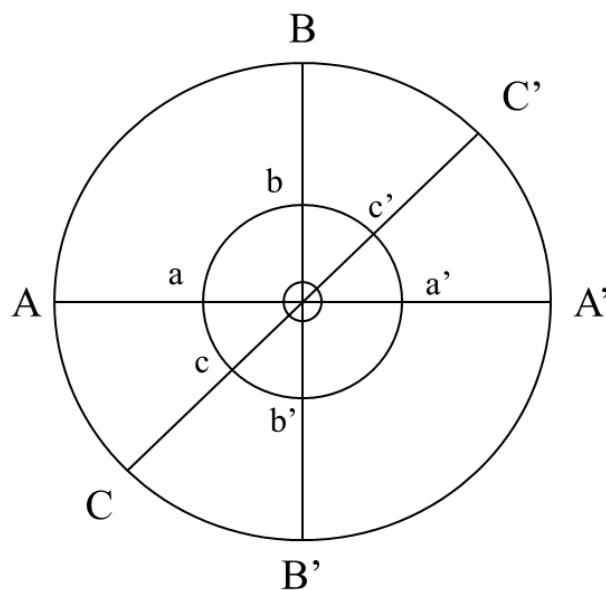
Berdasarkan hasil perhitungan diatas, peneliti akan melakukan pengulangan sebanyak 3 kali.

7. Uji Daya Antijamur secara *in vitro*

Uji daya antijamur ekstrak etanol dan fraksi air tanaman *M. pendans* dengan metode difusi sumuran, sebagai berikut :

1. Tuangkan 28-30 ml media Mueller Hinton (MH) ke dalam cawan petri dengan diameter 100 mm dan kedalaman sekitar 4 mm, diamkan sampai membeku.
2. Suspensi *C. albicans* yang sudah sesuai dengan standar 0.5 McFarland diambil menggunakan kapas lidi steril dan aplikasikan secara merata pada lempeng agar.
3. Lubang sumuran dibuat dengan menggunakan perforator yang sebelumnya sudah disterilkan dengan dipanaskan pada spiritus, buat 5 lubang pada masing-masing cawan petri.

4. Ekstrak etanol dan fraksi air tanaman *M. pendans* diambil sebanyak 50 μ l menggunakan mikropipet dan masukkan ke dalam sumuran.
5. Kontrol positif yaitu nistatin dan akuades sebagai kontrol negatif juga diambil sebanyak 50 μ l menggunakan mikropipet dan masukkan ke dalam cawan petri yang sudah dibuat 2 sumuran.
6. Inkubasi selama 24 jam pada suhu 37⁰C.
7. Zona hambat yang terbentuk di sekeliling sumuran diukur menggunakan *sliding caliper*.
8. Pengukuran Zona Hambat



Gambar 4. Cara Pengukuran Zona Hambat

Keterangan :

Titik O = Titik pusat lubang sumuran

Garis A-A', B-B', C-C' = Zona hambat yang terbentuk

Garis a-a', b-b', c-c' = Diameter lubang sumuran

Cara pengukuran :

Pengukuran I = (AA' - aa')

Pengukuran II = (BB' - bb')

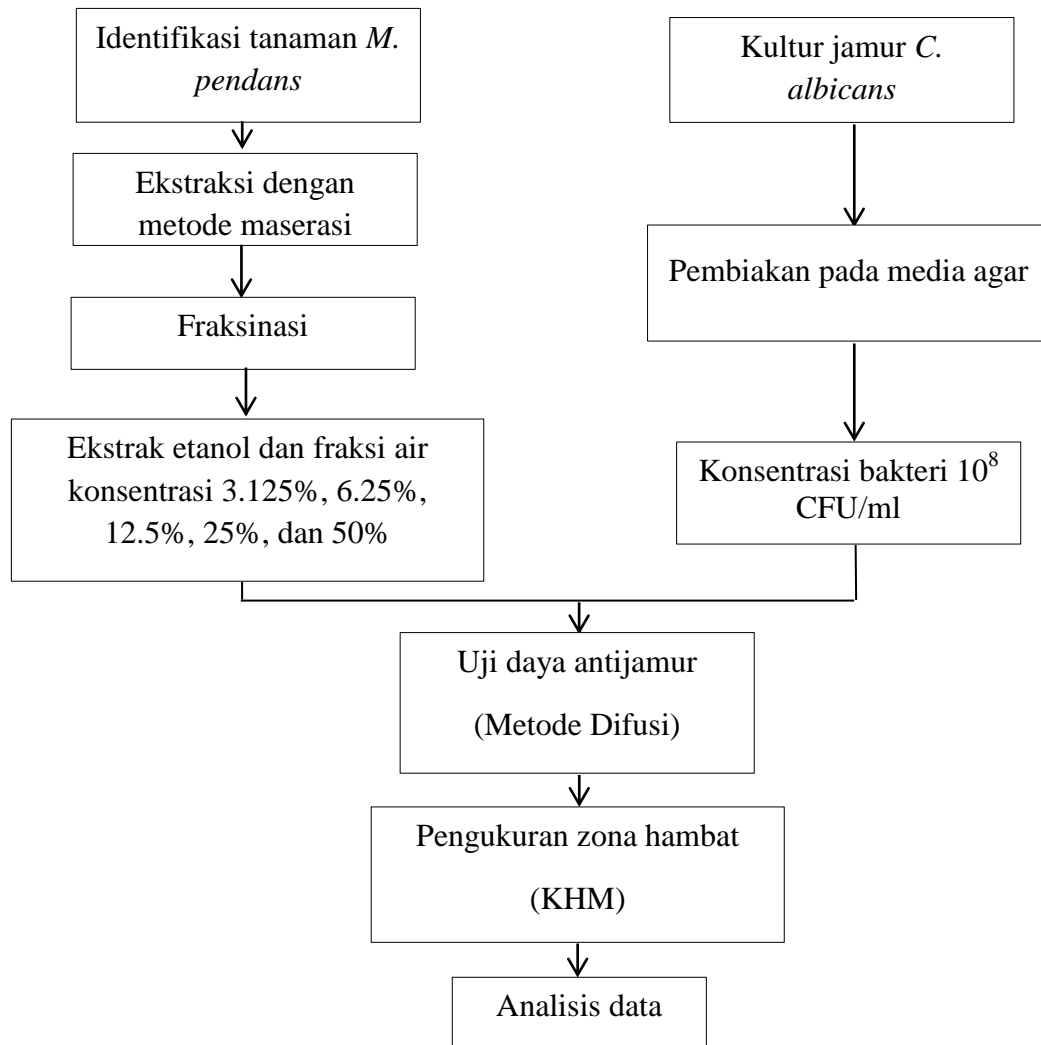
Pengukuran III = (CC' - cc')

$$\text{Zona hambatan} = \frac{\text{Pengukuran I} + \text{II} + \text{III}}{3}$$

Pengukuran zona hambatan dilakukan dengan mengambil 3 garis yang melalui titik pusat lubang sumuran. Diameter daerah hambatan (A - A', B - B', dan C - C') diukur dengan menggunakan *sliding caliper* kemudian masing-masing dikurangi dengan diameter lubang sumuran (a - a', b - b', dan c - c') sehingga didapat hasil pengukuran I, II, dan III. Zona hambatan diperoleh dengan menghitung rata-rata dari ketiga perhitungan. Pengukuran dilakukan minimal sebanyak 2 kali.

8. Uji statistik dan analisis data.

G. Alur Penelitian



Gambar 5. Alur Penelitian

H. Analisis Data

Data dilakukan uji normalitas dengan metode *Shapiro-Wilk* karena jumlah sampel <50 . Jika data terdistribusi normal, analisis data menggunakan metode *One-way ANOVA*. Data yang terdistribusi tidak normal dianalisis menggunakan metode *Kruskal-wallis*.