

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimental laboratoris dengan analisis deskriptif kuantitatif. Tahap pertama yang ditempuh bertujuan untuk mengetahui zona hambat; tahap kedua untuk mengetahui Konsentrasi Hambat Minimum (KHM); dan tahap ketiga mengetahui Kadar Bunuh Minimum (KBM).

B. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada dan Balai Laboratorium Kesehatan dan Kalibrasi Dinas Kesehatan Daerah Istimewa Yogyakarta pada bulan Januari-Februari 2019.

C. Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi penelitian ini adalah koloni jamur *Candida albicans* yang didapat dari koleksi Balai Laboratorium Kesehatan dan Kalibrasi Dinas Kesehatan Daerah Istimewa Yogyakarta.

1. Perhitungan Sampel

Penelitian eksperimen dengan rancangan acak lengkap, acak kelompok, atau faktorial, menurut Supranto J. (2000), secara sederhana dapat dirumuskan sebagai berikut:

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

dengan: t = banyaknya kelompok perlakuan

r = jumlah replikasi.

Jika jumlah perlakuan ada 7 macam, maka jumlah ulangan untuk tiap

perlakuan dapat dihitung:

$$(7 - 1) (r-1) \geq 15$$

$$(r-1) \geq 15/6$$

$$r \geq 3,5$$

Dari perhitungan tersebut diperoleh besar sampel minimal yang diperlukan penelitian ini adalah 3,5 kali atau dibulatkan menjadi 4 kali pengulangan.

2. Ekstrak Etanol Daun Sirsak (*Annona muricata*)

Daun sirsak (*Annona muricata*) yang masih muda sebanyak 2 kg diambil di daerah Pundong, Bantul, Yogyakarta untuk dijadikan ekstrak etanol dengan konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100%.

D. Variabel Dalam Penelitian

1. Variabel Pengaruh

Ekstrak etanol daun sirsak pada konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, 100% (Widiana, 2012).

2. Variabel Terpengaruh

Diameter zona hambat *Candida albicans*.

2. Variabel Terkendali

- a. Suhu pengeraman 37°C (Purwatresna, 2012)
- b. Waktu inkubasi 24 jam (Purwatresna, 2012)
- c. Media pembiakan *sabouroud agar*
- d. Diameter sumuran 6 mm
- e. Banyaknya larutan ekstrak 500 ml
- f. Sterilisasi alat dan bahan sebelum pembiakan.

E. Instrumen Penelitian

1. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol daun sirsak konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100%, sediaan jamur *Candida albicans* 10^6 CFU/ml, antijamur nistatin sebagai kontrol positif, media *Sabaroud Dextrose Agar* (SDA), *Sabaroud Dextrose Broth* (SDB), standar 0,5 McFarland, etanol 70%, NaCl 0,85%, akuades steril, spiritus.

2. Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah alat-alat untuk proses ekstraksi maserasi dan penguapan yaitu blender, baskom, loyang, toples, cawan penguap, oven, neraca analitik, spatula, corong, erlenmeyer vakum, pompa vakum, batang pengaduk, gelas beker, tabung reaksi, pisau, kertas saring, pipet ukur, pipet tetes, erlenmeyer, waterbath, termometer, dan seperangkat alat *rotary vacuum evaporator*. Alar-alat untuk uji aktivitas antijamur, uji KHM dan KBM yaitu almari pengeraman, cawan petri, erlenmeyer, kawat ose, autoklaf, spektroskopi uv-vis, vortex, inkubator, alumunium foil, alat pembuat sumuran (*boor proof*), pinset, mikropipet, jangka sorong, bunsen spiritus, korek api, hair dryer, kapas, tisu, kain kasa.

F. Definisi Operasional

1. Efek Antijamur

Hasil yang ditimbulkan oleh suatu zat yang dapat menekan pertumbuhan jamur (Kumala, *et al.*, 1998 dalam Hasanah, 2012). Efek antijamur diuji dengan metode dilusi.

2. Ekstrak Etanol Daun Sirsak

Merupakan hasil ekstraksi daun sirsak menggunakan etanol 70% melalui proses maserasi dan penguapan menghasilkan cairan kental berwarna hijau pekat.

3. *Candida albicans*

Jamur *Candida albicans* merupakan anggota flora normal di kulit, membran mukosa, dan saluran pencernaan. Jamur tersebut tumbuh sebagai sel-sel ragi bertunas dan oval diameter 3-6 μm . Biasanya dijumpai *Clamydospora* yang membedakan dengan spesies lain, yaitu spora terbentuk karena hifa, pada tempat-tempat tertentu membesar, membulat dan dinding menebal, letaknya di terminal, lateral. *Candida albicans* merupakan jamur oportunistik dan paling patogen menyerang permukaan kulit, makrosa mulut, dan vagina (Brooks, 2005 dan Jawetz, 2004 dalam Mutammima, 2017).

4. Metode Difusi

Metode difusi untuk menentukan aktivitas agen antijamur. Piringan yang berisi agen antijamur diletakkan pada media agar yang telah ditanami mikroorganisme yang akan berdifusi pada media agar tersebut. Area jernih mengindikasikan adanya hambatan pertumbuhan mikroorganisme oleh agen antijamur pada permukaan media agar (Hudzicki, 2009 dan Parija, 2009).

5. Kontrol Positif

Kontrol positif yang digunakan adalah nistatin sebagai standar pembanding yang dapat menghambat pertumbuhan jamur *Candida albicans*.

Nistatin merupakan antibiotik polien makrolida yang dihasilkan oleh *Streptomyces noursei* dan *S. albidus*. Obat ini berupa bubuk warna kuning hingga coklat terang dengan bau khas, serta sukar larut dalam kloroform, etanol, dan eter. Larutannya mudah terurai dalam air atau plasma. Nistatin bersifat higroskopis dan mudah teroksidasi sehingga harus terlindung dari cahaya dan disimpan dalam wadah kedap udara dengan suhu 2-8°C (Watson, 2011). Tersedia dalam sediaan tablet 100.000 unit/tablet, suspensi oral 100.000 unit/ml, dan krim 100.000 unit/gram (Ganda, 2008).

6. Kontrol Negatif

Kontrol negatif adalah pembanding yang tidak diberi perlakuan yaitu menggunakan akuades.

G. Jalannya Penelitian

1. Pembuatan Ekstrak Daun Sirsak

Daun sirsak muda dipetik hingga sebanyak 2 kg kemudian dicuci, dipotong-potong, dan dikeringkan menggunakan oven bersuhu 50°C selama 24 jam. Daun selanjutnya dimasukkan ke mesin penggiling untuk dihancurkan menjadi serbuk. Maserasi dilakukan dengan merendam serbuk daun sirsak dalam pelarut etanol 70% selama 24 jam kemudian disaring. Perendaman residu diulang 2 kali agar komponen bahan aktif pada daun sirsak dapat terambil dengan baik. Maserat yang diperoleh kemudian dikumpulkan dan pelarutnya diuapkan menggunakan rotavapor dengan suhu 50°C hingga diperoleh ekstrak kental. Suhu ini digunakan agar ekstrak tidak kehilangan senyawa aktif yang tidak tahan panas (Restasari, 2008 dan Sarker,

et al., 2006). Ekstrak pekat yang dihasilkan kemudian ditimbang dan dihitung rendemennya dengan persamaan:

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak kasar yang diperoleh}}{\text{Berat sampel yang digunakan}} \times 100\%$$

Agar diperoleh konsentrasi ekstrak daun sirsak 20%, 40%, 60%, 80% maka dilakukan penambahan akuades sebagai berikut.

20 gram ditambah akuades 100 ml : 20%

40 gram ditambah akuades 100 ml : 40%

60 gram ditambah akuades 100 ml : 60%

80 gram ditambah akuades 100 ml : 80%

2. Pembuatan Suspensi *Candida albicans*

Jamur *Candida albicans* dari biakan murni diregenerasi dengan cara diinokulasikan ke media SDA lalu diinkubasi selama 24 jam suhu 37°C. Jamur hasil biakan diambil dengan ose steril dari lima koloni berbeda berdiameter sekitar 1 mm kemudian disuspensi dalam 5 mL larutan NaCl 0,85%. Larutan diencerkan hingga diperoleh absorbansi setara 0,5 standar McFarland pada λ 520-625 nm menghasilkan 1×10^6 cfu/mL sampai 5×10^6 cfu/mL suspensi jamur (NCCLS, 2004).

3. Uji Aktivitas Antijamur Ekstrak Etanol Daun Sirsak

Biakan dibagi menjadi 7 sektor dan masing-masing disiapkan media *sabaroud agar*, kemudian bagian bawah plate dibuat garis-garis pembagi menggunakan spidol dan dilabeli. Uji daya antifungi ekstrak daun sirsak terhadap pertumbuhan jamur *Candida albicans* dilakukan sebanyak 4 kali

pengulangan sesuai dengan hasil perhitungan estimasi besar sampel. Masing-masing bagian dibuat sumuran dengan diameter 6 mm dan kedalaman 3 mm, lalu plate diolesi secara merata dengan jamur *Candida albicans*. Selanjutnya, tiap sumuran diteteskan 50 µl ekstrak daun sirsak pada konsentrasi berbeda, nistatin untuk kontrol positif, dan akuades steril untuk kontrol negatif. Media diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Adanya daerah bening di sekeliling sumuran menunjukkan adanya aktivitas antijamur. Potensi mikroba diukur dengan melihat zona hambat menggunakan jangka sorong dalam satuan millimeter (mm) (Ernst dan Rogers, 2005).

$$\text{Zona hambat} = \text{Diameter zona bening} - \text{Diameter sumuran}$$

4. Uji Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Uji Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) Ekstrak Etanol Daun Sirsak

Uji Konsentrasi Hambar Minimum (KHM) dilakukan dengan metode dilusi tabung atau pengenceran dengan cara penanaman jamur pada media SDB di tabung reaksi. Uji Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dilakukan dengan metode dilusi agar yaitu penanaman jamur pada media SDA di cawan petri. Disiapkan 20 tabung reaksi untuk percobaan dan 2 tabung reaksi untuk kontrol yang diisi 1 tabung dengan 1 mL SDB dan 1 mL suspensi jamur *Candida albicans* pada kontrol positif, sedangkan pada kontrol negatif berisi 1 gram ekstrak daun sirsak dan 1 mL SDB. Tabung reaksi yang lain diisi dengan 9 mL SDB steril dan ditambahkan 0,5 mL suspensi jamur *Candida albicans* dan 0,5 mL ekstrak etanol daun sirsak dengan konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100%. Masing-masing konsentrasi dibuat pada 4 tabung

yakni untuk empat kali pengulangan. Diambil 3 mL secara aseptis untuk dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 600 nm. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, divortex, lalu diukur nilai absorbansinya kembali. KHM dihitung dengan cara:

$$\text{KHM} = \text{OD setelah inkubasi} - \text{OD sebelum inkubasi}$$

Konsentrasi terendah yang dapat menghambat jamur ditunjukkan dengan tidak adanya kekeruhan setelah inkubasi ($\text{OD} \leq 0$). Uji KBM dilakukan dengan menumbuhkan kultur pada tabung positif KHM secara *pour plate* pada media SDA steril. Diambil 1 mL dari konsentrasi yang menunjukkan positif KHM, ditumbuhkan pada media SDA secara *pour plate*, dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. KBM ditunjukkan dengan tidak adanya koloni jamur yang tumbuh pada media (Atlas, *et al.*, 1984; Pratiwi, 2008 dalam Mutammima, 2017).

H. Analisis Data

Dari penelitian ini, diperoleh data berupa pengukuran diameter zona hambat dimasukkan dalam tabel dengan bentuk data kuantitatif berskala rasio. Data tersebut diuji normalitas terlebih dahulu menggunakan One Way Sample Kolmogorov-Smirnov untuk mengetahui apakah sebaran data tersebut normal, kemudian dilanjutkan dengan uji statistik parametrik yaitu uji One-Way ANOVA untuk mengetahui apakah ada pengaruh yang signifikan konsentrasi ekstrak daun sirsak terhadap zona hambat *Candida albicans* pada tingkat signifikansi 95%. Jika sebaran data hasil penelitian tidak normal, maka digunakan uji nonparametrik Kruskal-Wallis.