

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental dengan pendekatan *Post Test Only Control Group Design* di mana ada 2 kelompok yang dipilih secara acak. Kelompok pertama diberi perlakuan oleh peneliti lalu dilakukan pengukuran sedangkan kelompok kedua digunakan sebagai kelompok kontrol yang tidak diberikan perlakuan tetapi hanya dilakukan pengukuran saja. Dalam penelitian ini peneliti melakukan perlakuan dengan menguji aktivitas antijamuri ekstrak etanolik putri malu (*Mimosa pudica* Linn) terhadap *Candida albicans* kepada 1 atau lebih kelompok eksperimen, kemudian hasil dibandingkan dengan kelompok kontrol pembandingnya (Sastroasmoro, 2008).

B. Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta, Laboratorium Mikrobiologi FKIK UMY dan Laboratorium Penelitian FKIK UMY Yogyakarta. Penelitian dilakukan kurang lebih selama 5 bulan, dimulai dari September 2014 - Januari 2015.

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi pada penelitian ini adalah jamur *Candida albicans*. Jamur *Candida albicans* diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi FKIK UMY Yogyakarta.

2. Sampel Penelitian

Ekstrak etanolik tumbuhan putri malu (*Mimosa pudica* Linn). Tumbuhan putri malu (*Mimosa pudica* Linn) pada penelitian ini diperoleh di daerah sekitar kampus Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

D. Identifikasi Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

1. Variabel Penelitian

a. Uji Aktivitas Antijamur

Variabel bebas : Ekstrak kental etanolik tumbuhan putri (*Mimosa pudica* Linn) malu dengan berbagai rentang konsentrasi yakni 70%, 80%, 90%, 95% v/v.

Variabel tergantung : Pertumbuhan jamur *Candida albicans* pada media SDA (*Sabouroud Dekstrosa Agar*) diukur dengan berbagai diameter zona hambat yang terbentuk dalam milimeter.

b. Analisis Kandungan Kimia Metode KLT

Variabel bebas : ekstrak etanolik tumbuhan putri malu (*Mimosa pudica* Linn).

Variabel tergantung : Nilai Rf pada lempeng KLT.

2. Definisi Operasional

Penelitian ini memiliki 2 macam variabel, yaitu variabel bebas dan variabel tergantung. Variabel bebas merupakan variabel yang mempengaruhi hasil dari variabel tergantung. Definisi operasional variabel bebas dan tergantung dapat dilihat dalam Tabel 2.

Tabel 1. Defenisi operasional penelitian

No.	Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
1.	Zona hambat <i>C. albicans</i>	Zona bening di sekeliling kertas cakram yang tidak ditemukan adanya pertumbuhan <i>C. albicans</i>	Penggaris	Diameter zona hambat (mm)	Rasio
2.	Ekstrak kental putri malu	Ekstrak kental putri malu yang sudah dilarutkan dengan aquadest dengan berbagai konsentrasi yang telah ditentukan	Mikro pipet	Jumlah larutan sesuai konsentrasi pada setiap tabung	Rasio
3.	Larutan kontrol positif	Larutan kontrol positif berisi ketokonazol tablet setara dengan 14 mg/ml	Mikro pipet	Jumlah larutan sebanyak 10 ml	Rasio
4.	Larutan kontrol negatif	Larutan kontrol negatif berisi 1 ml suspensi jamur + media BHI	Mikro pipet	Jumlah larutan sebanyak 10 ml	Rasio

E. Instrumen Penelitian

1. Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah batang pengaduk (Stainless Steel), pisau (Hb Stainless), Erlenmeyer (Pyrex), oven (Shimadzu), penggaris (Brand), gelas beker (Pyrex), propipet (Glasfirn), *rotary evaporator* (Heidolph), *incubator* (Memmert), *Laminar Air Flow* (LAF) (Labconco), *blender* (Philip), tabung reaksi (Pyrex), timbangan elektrik (Casbee), *aluminium foil* (Brand), kertas perekat (Brand), *centrifuge* (Sorvall), pinset, kertas cakram, mortir, stempler, lidi kapas steril, gelas bejana, ose steril, rak tabung reaksi.

2. Bahan Penelitian

Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah etanol 70% (Mandiri Surya/ Grade Teknis), aquadest (Bratachem/ Grade Teknis), ketokonazol tablet 200 mg (PT. Hexpharm Jaya), putri malu, lempeng KLT silika gel GF₂₅₄, asam asetat (Bratachem/ Grade Teknis), n-butanol (Bratachem/ Grade Teknis), kloroform (Bratachem/ Grade Teknis), metanol (Merck/ Grade Teknis), suspensi *Candida albicans*, media *Sabouraud Dextrosa Agar* (SDA), BHI (*Brain Heart Infusion*) cair.

F. Cara kerja

1. Determinasi Tumbuhan

Determinasi tumbuhan putri malu (*Mimosa Pudica* Linn) dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

2. Pembuatan Simplisia

Tumbuhan putri malu (*Mimosa pudica* Linn) yang sudah didapatkan segera dicuci hingga bersih dengan air mengalir, tujuannya untuk menghilangkan kotoran yang melekat. Kemudian tumbuhan putri malu dikeringkan dengan cara dioven pada suhu 60°C selama 4 hari, hal ini dilakukan untuk mencegah terjadinya pembusukan tumbuhan oleh bakteri dan agar lebih mudah untuk dihaluskan dengan *blender* menjadi serbuk halus. Tumbuhan putri malu (*Mimosa pudica* Linn) yang sudah kering kemudian dihaluskan menjadi serbuk halus dengan cara diblender.

3. Ekstraksi

Pembuatan ekstrak etanolik tumbuhan putri malu (*Mimosa pudica* Linn) dilakukan dengan menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70% selama 2 hari. Maserasi dilakukan dengan cara merendam 1.037,80 gram serbuk halus simplisia ke dalam 7 liter etanol 70% dengan perbandingan 1:7 b/v dalam bejana yang tertutup rapat selama 2 hari dan dibiarkan terlindung dari cahaya matahari sambil berulang-ulang diaduk secara periodik. Selanjutnya setelah 2 hari, sari dikerai dan ampasnya diperas menggunakan kain flanel. Filtrat yang telah diperoleh tersebut, kemudian diuapkan dengan *rotary evaporator* hingga terbentuk ekstrak kental dan sudah tidak terdapat lagi bau dari pelarut yang digunakan dalam ekstrak kental tersebut.

4. Analisis Kandungan Kimia Metode KLT

Uji analisis kualitatif terhadap ekstrak etanolik putri malu (*Mimosa pudica* Linn) pada penelitian ini dilakukan terhadap golongan senyawa tanin dan saponin yang berperan aktif sebagai agen antijamur. Uji kromatografi lapis tipis pada penelitian ini menggunakan fase diam lempeng silika gel GF₂₅₄ dengan ukuran 2 x 10 cm. Ekstrak dilarutkan terlebih dahulu dengan etanol, kemudian ditotolkan menggunakan pipa kapiler pada jarak 1 cm dari tepi bawah lempeng silika dengan ukuran penotolan yang sekecil mungkin agar tidak menimbulkan bercak yang menyebar. Siapkan bejana yang telah terjenuhi dengan fase gerak yang telah disesuaikan dan masukkan lempeng dengan ukuran 2 x 10 cm ke dalam bejana. Lempeng silika yang berada di dalam bejana didiamkan hingga pelarut mampu mengelusi lempeng silika hingga jarak 8 cm. Selanjutnya lempeng KLT dikeluarkan dari dalam bejana dan didiamkan hingga pelarutnya mengering. Hasil diamati dengan cara melihat warna bercak dan nilai R_f yang terbentuk pada lempeng dan dibandingkan dengan pembanding yang telah diketahui di bawah sinar ultraviolet (UV) 254 nm dan 366 nm, bercak dapat diperjelas dengan reaksi penyemprotan. Rumus untuk menghitung R_f adalah sebagai berikut :

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

Analisis kandungan senyawa dengan kromatografi lapis tipis (KLT) terhadap ekstrak putri malu dilakukan dengan ketentuan seperti berikut ini :

a. Tanin

Fase diam : silika gel GF₂₅₄

Fase gerak : n-butanol : asam asetat : air (4:1:5)

Deteksi : Sinar UV 254, UV 366, FeCl₃

b. Saponin

Fase diam : silika gel GF₂₅₄

Fase gerak : kloroform : metanol (95:5)

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

5. Uji Aktivitas Antijamur

a. Persiapan Alat

Semua alat yang digunakan untuk uji antijamur harus bebas dari mikroorganisme pengganggu, agar tidak mempengaruhi hasil akhir pengujian. Cara untuk membebaskan alat-alat dari mikroorganisme pengganggu adalah dengan cara disterilkan terlebih dahulu sebelum digunakan untuk keperluan pengujian. Alat-alat gelas disterilkan dengan menggunakan oven pada suhu 170°C selama 2 jam dan media agar disterilkan dengan pemanasan basah pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit. Penghitungan waktu mulai setelah suhu mencapai 121°C. Pinset dan ose sebelum digunakan disterilkan dengan cara dipanaskan menggunakan bunsen hingga memijar. Piring petri disterilkan dalam keadaan terbungkus kertas koran atau kertas payung. Alat-alat yang akan digunakan untuk uji antijamur harus ditunggu sampai suhu kamar dan sudah kering karena biasanya peralatan yang sudah disterilkan dan

langsung diangkat keluar dari autoklaf akan banyak mengandung air, dan air ini dapat mengganggu proses pengujian.

b. Preparasi Media

1) Media *Sabouraud Dextrosa Agar* (SDA)

Sebanyak 65 gram bahan media dilarutkan dalam 1 liter aquadest, kemudian dipanaskan hingga mendidih. Media dalam Erlenmeyer yang tertutup disterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Kemudian media SDA tersebut dituangkan pada 12 cawan petri dalam kondisi aseptik dalam *Laminar Air Flow*. Media yang tidak segera digunakan disimpan dalam lemari pendingin supaya tidak ditumbuhi jamur dan tidak terkontaminasi.

2) Media *Brain Heart Infusion* (BHI)

Media BHI dibuat dengan komposisi yakni 200 gram *brain infusion*, *beef heart infusion* 250 gram, *proteosea* 10 gram, NaCl 5 gram dan Na₂PO₄ 2,5 gram. Semua bahan ini selanjutnya dilarutkan dalam aquadest hingga 1 liter. Media cair ini selanjutnya ditempatkan di dalam tabung reaksi dalam kondisi aseptik dalam *Laminar Air Flow*. Media yang tidak segera digunakan disimpan dalam lemari pendingin supaya tidak ditumbuhi jamur dan tidak terkontaminasi.

3) Pembuatan Kadar Konsentrasi Larutan Uji

Ekstrak kental etanolik dari putri malu (*Mimosa pudica* Linn) terlebih dahulu dibuat larutan induk dengan konsentrasi 100% dengan cara melarutkan 35 gram ekstrak kental dengan aquadest hingga volume 35 ml.

Larutan uji dibuat sebanyak 4 macam variasi konsentrasi yakni 70%, 80%, 90% dan 95% v/v. Pembuatan 4 macam variasi konsentrasi ini dilakukan dengan cara mengambil larutan sebanyak 7 ml, 8 ml, 9 ml, dan 9,5 ml dari larutan induk lalu masing-masing larutan konsentrasi dilarutkan dengan aquadest hingga volume 10 ml.

4) Pembuatan Kontrol Positif

Kontrol positif yang digunakan pada penelitian ini adalah ketokonazol tablet sediaan 200 mg. Tablet ketokonazol sediaan 200 mg ini memiliki bobot total 340 mg. Untuk mendapatkan larutan kontrol positif ketokonazol setara dengan 140 mg ketokonazol, maka 1 tablet ketokonazol digerus hingga halus. Kemudian serbuk halus tersebut ditimbang sebanyak 238 mg. Serbuk ketokonazol yang telah ditimbang selanjutnya dimasukkan ke dalam gelas ukur dan ditambahkan dengan aquadest hingga 10 ml.

c. Uji Antijamur Ekstrak Etanolik Putri Malu (*Mimosa Pudica* Linn)

1) Penyiapan Suspensi Jamur Uji

Jamur *Candida albicans* diambil sebanyak 1 koloni tunggal dengan menggunakan ose steril dan dimasukkan ke dalam aquadest sebanyak 2 ml dan inkubasi selama 48 jam. Setelah itu larutan suspensi jamur tersebut diambil sebanyak 0,1 ml dan ditambahkan dengan nutrisi BHI dengan perbandingan 0,1 : 9,9 sambil dihomogenkan. Perlakuan tersebut dilakukan dalam kondisi aseptis dalam *Laminar Air Flow*. Larutan suspensi ini dijadikan sebagai larutan stock untuk keperluan pengujian antijamur dengan metode dilusi cair dan difusi agar selanjutnya.

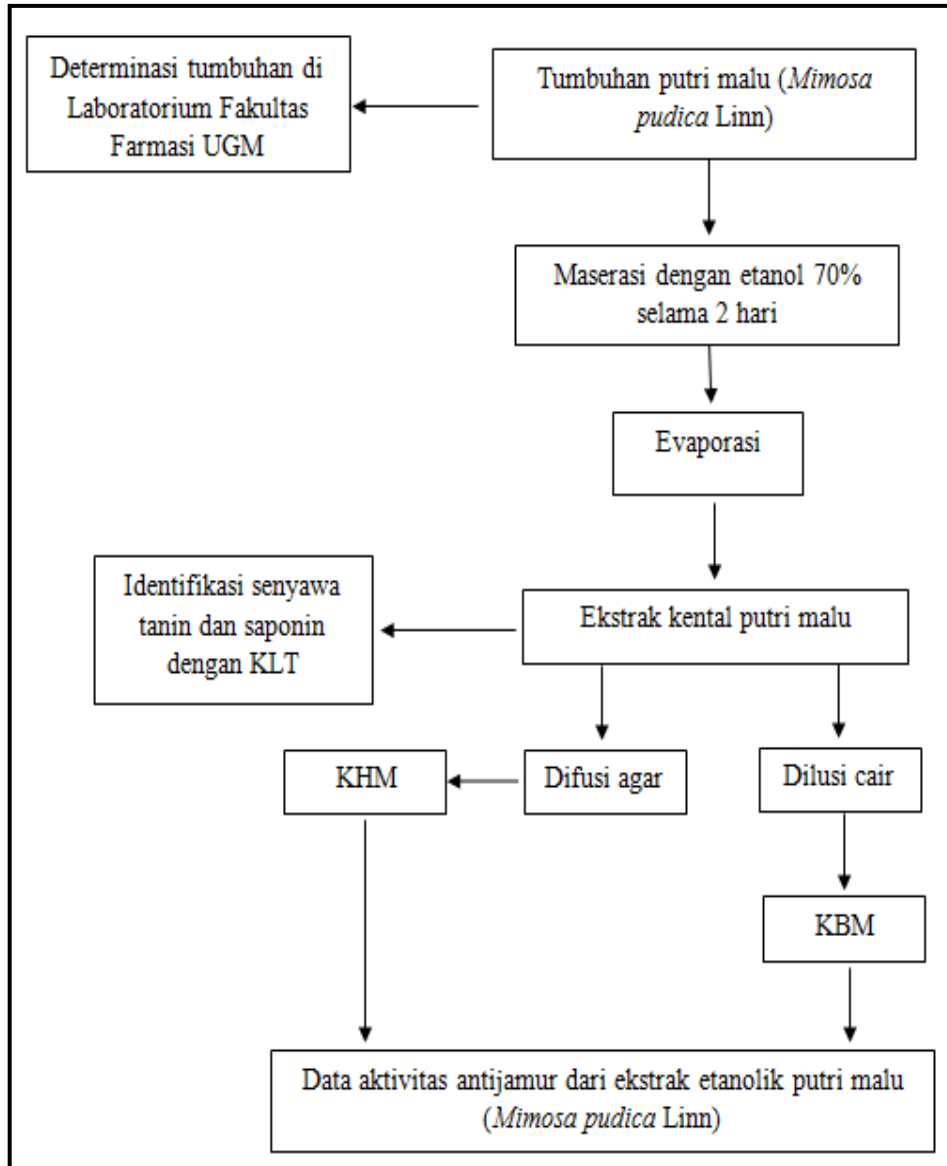
2) Uji Pendahuluan Metode Dilusi Cair

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 ekstrak etanolik putri malu (*Mimosa pudica* Linn) dengan konsentrasi 70%, 80%, 90%, 95% v/v di dalam tabung reaksi dan divortek. Sebagai kontrol positif berisi 0,5 ml suspensi jamur + media BHI dan 0,5 ml larutan ketokonazol, dan kontrol negatif berisi 1 ml suspensi jamur + media BHI. Semua perlakuan dilakukan dalam *Laminar Air Flow* dan direplikasi sebanyak 3 kali. Setelah itu, diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Nilai KHM dapat diperoleh dengan cara mengamati 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. Nilai KBM diperoleh dengan cara mengambil sebanyak 1 ose dari masing-masing tabung reaksi yang ditetapkan sebagai KHM. Kemudian digoreskan pada media SDA tanpa penambahan mikroba uji dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam, lalu diamati konsentrasi terendah yang masih terlihat bening setelah diinkubasi (Pratiwi, 2008). Hal ini ditandai dengan tidak terdapat sama sekali pertumbuhan jamur pada bekas goresan di media tumbuh SDA.

6. Uji Aktivitas Antijamur Metode Difusi Agar

Media SDA (*Sabouraud Dextrosa Agar*) yang telah dibuat diinokulasi dengan 0,1 ml suspensi jamur *Candida albicans* pada permukaan media agar secara merata menggunakan kapas lidi steril. Kertas cakram saring yang telah disterilisasi direndam ke dalam larutan uji dengan berbagai konsentrasi yaitu 70%, 80%, 90%, 95% v/v, dan larutan ketokonazol 14 mg dalam 1 ml aquadest sebagai kontrol positif. Selanjutnya kertas cakram saring diletakkan pada permukaan media SDA yang telah terdapat jamur *Candida albicans*, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Setiap uji dilakukan replikasi sebanyak 3 kali dan dilakukan dalam kondisi aseptik dalam *Laminar Air Flow*. Pengamatan dilakukan dengan cara mengukur diameter daerah hambatan yang terbentuk di sekitar kertas cakram menggunakan penggaris.

G. Skema Langkah Kerja



Gambar 1. Skema langkah kerja

H. Analisis Data

1. Analisis kandungan kimia metode KLT diidentifikasi dengan cara membandingkan kesesuaian warna bercak antara sampel uji pada ekstrak dengan senyawa pembanding dan nilai Rf antara sampel uji dan senyawa pembanding pada lempeng KLT setelah elusi. Pengamatan lempeng KLT dilakukan di bawah sinar UV λ 245 nm dan λ 366 nm dengan pereaksi semprot.
2. Pada uji aktivitas antijamur terhadap *Candida albicans* dengan metode dilusi cair menunjukkan positif adanya aktivitas antijamur jika larutan uji jernih dan hasil penggoresan pada media agar tidak terdapat pertumbuhan jamur.
3. Pada uji aktivitas antijamur terhadap *Candida albicans* dengan metode difusi agar menunjukkan positif adanya aktivitas antijamur jika terbentuk zona hambatan berupa daerah jernih di sekitar kertas cakram.