BAB III
METODE PENELITIAN

A. Jenis Dan Desain Penelitian

Penelitian ini termasuk penelitian eksperimental laboratorik. Dalam penelitian ini mempunyai beberapa tahapan yaitu: determinasi sampel, ekstraksi sampel dengan maserasi menggunakan pelarut metanol dan infundasi menggunakan air, serta uji efektifitas antijamur hasil ekstrak sampel pada *Candida albicans*.

B. Waktu Dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan dari bulan Juli 2015 sampai bulan Februari 2017 di Laboratorium Penelitian Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

C. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas : ekstrak metanol daun sirsak (*Annona muricata*) dengan konsentrasi 1%, 3%, 5%, 7%, 9% b/v dan infundasi daun sirsak (*Annona muricata*) dengan konsentrasi 1%, 3%, 5%, 7%, 9% b/v.
2. Variable tergantung : Diameter zona hambat yang terbentuk di sekitar kertas cakram.

D. Definisi Operasional

1. Variabel bebas adalah ekstrak daun sirsak yang diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan pelarut metanol dan infundasi menggunakan air. Daun sirsak yang

digunakan adalah daun sirsak lembar ketiga sampai keenam dari pucuk yang diambil dari beberapa pohon di daerah Banguntapan, Bantul, Yogyakarta.

2. Variabel tergantung adalah pertumbuhan *Candida albicans*. Jamur *Candida albicans* diperoleh dari biakan yang tersedia di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

E. Bahan Dan Alat

Bahan penelitian pada penelitian ini diantaranya adalah daun sirsak telah dideterminasikan di laboratorium Unit II bagian Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Gajah Mada. Selain itu digunakan juga media cair media *Sabouraud Dekstrosa Agar* (SDA), aquades (Bratachem®), suspensi *Candida albicans* (UMY), metanol (Bratachem®) dan Ketokonazol tablet (Hexpharm Jaya®). Sedangkan alat yang digunakan yaitu pengaduk (Stainless steel®), penggaris (Brand®), *incubator* (Memert®), oven (Shidmazu®), toples, timbangan analitik (Casbee®), *autoklaf* (All american®), propipet (Glasfirn®), *rotary evaporator (*IKA® RV 10), *alumunium foil* (Brand), *Laminar air flow* (LAF) (Labconco®), vortex, kompor listrik (Cimarec®), kain flanel, lidi kapas steril, kertas cakram, kertas perekat (Brand®), gelas beker (Pyrex®), tabung reaksi (Pyrex®) dan rak tabung reaksi.

F. Cara Kerja

1. Ekstraksi Daun Sirsak

Daun sirsak yang sudah dipetik, dicuci dengan air yang mengalir hingga bersih dari tanah dan debu. Kemudian dikeringkan pada suhu kamar dengan cara diangin-anginkan. Daun sirsak yang telah kering lalu di potong kecil-kecil untuk kemudian dihaluskan menggunakan blender dan diayak dengan ayakan 60 mesh hingga menjadi serbuk. Serbuk daun sirsak diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan pelarut metanol dan infundasi menggunakan air.

Pembuatan ekstrak metanol, dilakukan dengan menimbang serbuk daun sirsak 50 g dan dimasukkan kedalam toples. Serbuk di dalam toples direndam dengan larutan metanol sebanyak 400 ml. Perendaman dilakukan selama 3 x 24 jam dengan diaduk dan diremaserasi setiap 1 x 24 jam. Hasil yang diperoleh disaring dan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* sehingga didapatkan ekstrak kental.

Pembuatan ektrak air dilakukan untuk mendapatkan infusa 9% b/v. Serbuk daun sirsak ditimbang sebanyak 9 g dimasukkan ke dalam panci infus kemudian dibasahi dengan air sebanyak dua kali bobot sampel, lalu didiamkan selama 15 menit. Setelah itu ditambah dengan air 100 ml. Panci infus dipanaskan selama 15 menit terhitung suhu sejak mencapai 90ºC sambil sekali-kali diaduk. Infus diserkai selagi panas melalui kain flanel dan bila infus yang diperoleh kurang dari 100 ml maka ditambahkan air panas secukupnya melalui ampasnya hingga diperoleh 100 ml. Prosedur yang sama dilakukan untuk infus 1%, 3%, 5% dan 7 % dengan ditimbang 1 g, 3 g, 5 g, dan 7 g serbuk daun sirsak. (Rumakey, 2014).

2. Sterilisasi

Alat-alat yang tahan pemanasan disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121˚C selama 15 menit dan alat-alat yang terbuat dari gelas disterilkan dengan menggunakan oven suhu 180˚C selama 2 jam, sedangkan alat-alat logam disterilkan dengan dipijarkan menggunakan bunsen.

3. Pengujian Aktivitas Antijamur

a. Preparasi Sampel

1) Media *Sabouraud Dekstrosa 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^{o}C selama 15 menit. Kemudian media SDA tersebut dituangkan pada 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) Pembuatan Kadar Konsentrasi Larutan Uji

Ekstrak kental metanolik dari daun sirsak terlebih dahulu dibuat larutan induk dengan konsentrasi 100% dengan cara melarutkan 10 gram ekstrak kental dengan aquadest hingga volume 10 ml. Larutan uji dibuat sebanyak 5 macam variasi konsentrasi yakni 1%, 3%, 5% 7 % dan 9% b/v. Pembuatan 5 macam variasi konsentrasi ini dilakukan dengan cara mengambil larutan dengan menggunakan mikropipet sebanyak 0,1 ml, 0,3 ml, 0.5 ml, 0,7 ml, dan 0,9 ml dari larutan induk lalu masing-masing larutan konsentrasi dilarutkan dengan aquadest hingga volume 10 ml.

3) Pembuatan Larutan 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 labu takar 10 ml kemudian ditambahkan aquadest 5 ml dan dikocok lalu ditambahkan aquadest sampai batas 10 ml pada labu takar.

b. Uji Antijamur Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata*)

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 menggunakan mikropipet dan ditambahkan dengan nutrien 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 Aktivitas Antijamur Metode Difusi Agar

Media SDA (*Sabouraud Dekstrosa 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 ekstrak metanolik daun sirsak dengan berbagai konsentrasi yaitu

1%, 3%, 5%, 7 %, 9% b/v, infus daun sirsak dengan berbagai konsentrasi yaitu 1%, 3%, 5%, 7 %, 9% b/v dan larutan ketokonazol kontrol positif. Selanjutnya kertas cakram saring diletakkan pada permukaan media SDA yang telah terdapat jamur *Candida albicans*, kemudian diinkubasi pada suhu 37^{o}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.

4. Analisis Data

Pengaruh ekstrak metanol dan ekstrak air daun sirsak terhadap pertumbuhan *Candida albicans* masing-masing akan dimasukan ke dalam perangkat lunak SPSS lalu diuji melalui uji normalitas dengan metode Shapiro-Wilk untuk menilai distribusinya. Jika terdistribusi normal, maka akan dilanjutkan dengan Analisis Varians (ANOVA) Satu-Arah, yaitu menguji perbedaan rata-rata antar keempat kelompok perlakuan. Adapun jika hasil uji ANOVA menunjukkan hasil yang bermakna, maka diuji statistik lanjutan dengan menggunakan Uji Duncan yaitu Posthoc untuk melihat signifikansi antar kelompok.

Jika tidak terdistribusi normal, maka akan dilanjutkan dengan uji non parametrik dengan menggunakan metode *Kruskall-Wallis*. Adapun jika hasil uji *Kruskall-Wallis* menunjukkan hasil yang bermakna, maka diuji statistik lanjutan dengan menggunakan Uji *Mann-whitney* yaitu untuk melihat signifikansi antar kelompok. Sedangkan uji korelasi dilakukan dengan *Spearman correlation test.*