

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi adalah semua obyek yang menjadi sasaran penelitian. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah rimpang lengkuas merah dan rimpang bangle yang diambil dari daerah Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah pada bulan Februari 2019.

2. Sampel

Sampel adalah sebagian kecil dari populasi yang digunakan dalam melakukan penelitian. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah rimpang lengkuas merah dan rimpang bangle yang diambil secara acak dari daerah Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah, pada bulan Februari 2019. Rimpang yang digunakan adalah rimpang yang siap panen, bersih, segar, dan bebas penyakit.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pertama penelitian ini adalah, kombinasi minyak atsiri rimpang lengkuas merah (*Alpinia purpurata* K. Schum) dan bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) terhadap jamur *Candida albicans* ATCC 10231 yang diinfeksi pada kulit punggung kelinci.

Variabel utama kedua penelitian ini adalah, sediaan gel kombinasi minyak atsiri rimpang lengkuas merah dan bangle dengan konsentrasi 2%; 4%; dan 8%.

Variabel utama ketiga penelitian ini adalah, aktivitas antijamur pada sediaan gel kombinasi minyak atsiri rimpang lengkuas merah dan bangle dengan konsentrasi 2%; 4%; 8% terhadap jamur *Candida albicans* ATCC 10231.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama diklasifikasikan ke dalam beberapa variabel yang bermacam-macam yaitu variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkendali.

Variabel bebas adalah variabel yang sengaja dan dapat dirubah dan direncanakan untuk diketahui pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi sediaan gel kombinasi minyak atsiri rimpang lengkuas merah dan rimpang bangle dalam gel berbasis carbopol 940.

Variabel tergantung adalah variabel yang dapat berubah karena variabel bebas. Variabel tergantung pada penelitian ini adalah adanya aktivitas antijamur pada kulit punggung kelinci yang dapat dilihat dari kesembuhan lukanya dan ada tidaknya jamur *Candida albicans* ATCC 10231.

Variabel terkendali adalah variabel yang berpengaruh terhadap variabel tergantung. Variabel terkendali pada penelitian ini adalah tempat tumbuh tanaman, kemurnian minyak atsiri rimpang lengkuas merah dan bangle, jamur *Candida albicans* ATCC 10231, pembuatan sediaan gel, wadah gel, dosis pengolesan, pembuatan suspensi jamur, pemilihan hewan uji kelinci (berat badan, kesehatan, kebersihan), sterilisasi, suhu, kondisi peneliti, serta kondisi laboratorium.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, rimpang lengkuas merah adalah bagian rimpang lengkuas merah yang diambil secara acak dari Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah, dengan ciri rimpang lengkuas merah yang siap panen, berumur 2,5-3 bulan setelah masa tanam.

Kedua, rimpang bangle adalah bagian rimpang bangle yang diambil secara acak dari Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah, dengan ciri rimpang bangle yang siap panen, berumur 10-12 bulan setelah masa tanam.

Ketiga, minyak atsiri rimpang lengkuas merah dan bangle adalah minyak atsiri hasil destilasi rimpang lengkuas merah dan bangle dengan alat destilator menggunakan pelarut air dengan metode destilasi uap-air.

Keempat, kombinasi minyak atsiri rimpang lengkuas merah dan bangle adalah campuran antara minyak atsiri hasil destilasi lengkuas merah dan bangle.

Kelima, konsentrasi sediaan adalah konsentrasi kombinasi minyak atsiri rimpang lengkuas merah dan bangle dalam penelitian sediaan gel adalah 2%; 4%; dan 8%.

Keenam, jamur yang digunakan dalam penelitian adalah *Candida albicans* ATCC 10231 dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi Surakarta.

Ketujuh, kelinci percobaan adalah kelinci jantan putih (*New Zealand white*) berumur \pm 3-5 bulan, berat kelinci 1,5-2 kg dan kulit punggung kelinci adalah bagian punggung kelinci yang sudah dicukur.

Kedelapan, aktivitas antijamur secara *in-vivo* adalah daya penyembuhan infeksi jamur *Candida albicans* ATCC 10231 yang diinfeksi melalui luka sayatan, kemudian dibalut perban steril dan dibiarkan selama 48 jam hingga terjadi infeksi kemudian dioleskan sediaan gel kombinasi minyak atsiri rimpang lengkuas merah dan bangle

Kesembilan, kesembuhan adalah proses sembuhnya kulit punggung kelinci dari hilangnya lesi, eritema, keringnya luka dalam hitungan hari, tumbuhnya bulu kelinci dan tidak adanya koloni jamur *Candida albicans*.

C. Bahan dan Alat

1. Bahan

1.1 Bahan sampel. Bahan sampel yang digunakan adalah kombinasi minyak atsiri rimpang lengkuas merah dan rimpang bangle yang bersih dan segar.

1.2 Bahan kimia. Bahan kimia yang digunakan yaitu carbopol 940, triethanolamin, propilenglikol, gliserin, metil paraben, aquades, alkohol 70%, NaCl fisiologis, *Lactophenol Cotton Blue* (LCB), KOH 10% dan ketoconazole gel 2%. Media yang digunakan SGA (*Sabourand Glukosa Agar*), SGC (*Sabourand Glucosa Cair*), dan media gula-gula.

1.3 Jamur. Jamur yang digunakan dalam penelitian adalah jamur *Candida albicans* ATCC 10231, yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi Surakarta.

1.4 Hewan uji. Hewan uji yang digunakan dalam penelitian adalah kelinci jantan (*New Zealand white*) berumur \pm 3 bulan, berat kelinci 1,5-2 kg dan diperoleh dari Laboratorium Farmakologi Universitas Setia Budi Surakarta.

2. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi alat untuk pembuatan minyak atsiri yaitu kondensor dan dandang besar. Peralatan untuk formulasi sediaan dan uji mikrobiologi yaitu timbangan digital, gelas ukur (10 ml/100 ml), Beaker glass (100 ml), Erlenmayer (250 ml), batang pengaduk, kertas saring, sudip, sendok tanduk, stamper, mortir, cawan petri, ose, pot salep, pipet tetes, sarung tangan, masker, tabung reaksi, tabung durham, rak tabung reaksi, piknometer, viskometer, pH meter, objek glass, spuid 1 ml, pisau steril dan Mikroskop.

D. Jalan Penelitian

1. Identifikasi determinasi tanaman

Langkah awal penelitian ini adalah, mengidentifikasi atau melakukan determinasi tanaman yaitu rimpang lengkuas merah dan rimpang bangle. Tujuannya untuk menetapkan kebenaran sampel tanaman, dengan mencocokkan morfologi yang ada pada lengkuas merah dan bangle, yang dilakukan di Laboratorium Morfologi dan Sistematik Tumbuhan, Fakultas MIPA, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

2. Pengambilan bahan

Bahan uji yang digunakan adalah lengkuas merah dan bangle yang diambil dari daerah Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah. Lengkuas merah dan bangle yang diambil untuk pengujian adalah bagian rimpang. Rimpang lengkuas merah dan bangle dilakukan sortasi, kemudian dibersihkan dari kotoran atau bahan pengotor seperti tanah, serangga, daun, rumput, dan akar yang telah rusak.

3. Isolasi minyak atsiri

Rimpang lengkuas merah dan bangle masing-masing telah dilakukan pemotongan menjadi bagian-bagian kecil, kemudian dimasukkan ke dalam alat destilasi berupa dandang dengan penyangga berlubang yang telah berisi air. Proses destilasi dilakukan diatas api hingga air mendidih. Uap air yang dihasilkan, dialirkan melalui pipa menuju kondensor dan mengalami proses kondensasi. Minyak atsiri akan terbawa bersama uap air. Penyulingan dihentikan setelah tidak

ada lagi penambahan minyak atsiri. Destilat yang tertampung kemudian diukur volume yang dihasilkan.

Destilat yang diperoleh dilakukan pemisahan fase air dan fase minyak menggunakan corong pisah dengan penambahan natrium sulfat anhidrat hingga jenuh, kemudian dipisahkan antara lapisan minyak dengan lapisan air dan dihitung kadarnya. Minyak atsiri rimpang lengkuas merah dan bangle yang telah diperoleh disimpan dalam wadah botol kaca gelap dan diletakkan di tempat yang sejuk, hal ini dimaksudkan untuk menghindari minyak atsiri yang didapat rusak dan teroksidasi (Nurchayati 2018).

4. Analisa minyak atsiri

4.1 Pengamatan organoleptis. Pengamatan organoleptis minyak atsiri dilakukan secara visual menggunakan indera meliputi warna, bentuk, serta aroma.

4.2 Identifikasi minyak atsiri. Pada keadaan murni minyak atsiri mudah menguap pada suhu kamar sehingga jika diteteskan pada selembar kertas maka ketika dibiarkan akan menguap, tidak meninggalkan bekas noda pada kertas tersebut.

4.3 Penetapan indeks bias minyak atsiri. Penetapan indeks bias dilakukan dengan menggunakan refraktometer dan dilakukan replikasi selama tiga kali. Bagian badan prisma dibuka dan dibersihkan menggunakan kapas yang dibasahi alkohol. Alat diatur sehingga garis dan skala tampak jelas, mencatat suhu ruang tempat bekerja, kemudian meneteskan cairan yang diukur pada prisma kemudian ditutup. Pemutar sebelah kanan diatur sehingga batas gelap dan terang pada garis dan skala dicatat indeks biasanya (Rochyani 2017).

4.4 Penetapan bobot jenis minyak atsiri. Penetapan bobot jenis dilakukan dengan menggunakan piknometer bersih dan kering. Mula-mula berat kosong ditimbang (W_1), diisi aquadest dan ditimbang beratnya (W_2), kemudian diisi minyak atsiri dan ditimbang beratnya (W_3). Penimbangan direplikasi tiga kali.

4.5 Penetapan kelarutan dalam alkohol. Penetapan kelarutan dalam alkohol dilakukan dengan mengukur sebanyak 1 ml minyak atsiri, kemudian dimasukkan ke dalam gelas ukur 10 ml, uji kelarutan minyak atsiri dalam alkohol

ditambah alkohol 70% dengan cara bertahap. Setiap penambahan alkohol kocok dan diamati kejernihannya.

4.6 Identifikasi dengan kromatografi lapis tipis. Masing-masing sampel minyak atsiri ditotolkan pada lempeng silica gel GF₂₅₄ sebagai fase diam. Fase gerak yang digunakan yaitu toluena-etil asetat (93:7). Pereaksi semprot yang digunakan adalah anisaldehyd asam sulfat dengan baku pembanding eugenol. Penampakan noda dilihat pada UV 254 nm dan UV 366 nm.

5. Rancangan formula sediaan gel

Pembuatan sediaan gel kombinasi minyak atsiri lengkuas merah dan bangle (3:1) basis Karbopol 940, dirancang dengan konsentrasi 2%, 4% dan 8%.

Tabel 1. Formula sediaan gel.

Bahan	Gel kombinasi minyak atsiri lengkuas merah dan bangle			Kontrol Negatif (basis gel)
	FI (2%)	FII (4%)	FIII (8%)	
Minyak atsiri rimpang lengkuas (g)	1,5	3	6	-
Minyak atsiri rimpang bangle (g)	0,5	1	2	-
Karbopol 940 (g)	2	2	2	2
Triethanolamin (g)	1	1	1	1
Glycerin (g)	2	2	2	2
Propilenglikol (g)	10	10	10	10
Methyl paraben (g)	0,04	0,04	0,04	0,04
Aquadest <i>ad</i> (g)	100	100	100	100

6. Pembuatan sediaan gel

Karbopol dikembangkan dengan sebagian aquadest panas. Kemudian triethanolamin dimasukkan tetes demi tetes kedalam karbopol yang telah dikembangkan (campuran A). Methyl paraben dan glycerin dilarutkan, tambahkan propilenglikol aduk hingga larut dan tambahkan sisa aquadest (campuran B). Kemudian masukkan campuran B ke dalam campuran A aduk hingga homogen dan tambahkan minyak atsiri aduk hingga bahan tercampur membentuk massa gel dan homogen (Manus 2016).

7. Pengujian mutu fisik dan stabilitas sediaan gel

7.1 Uji organoleptis. Pengujian organoleptik dilakukan secara visual menggunakan panca indera, meliputi konsistensi gel, bau, serta warna setiap

sediaan. Pengujian organoleptis dilakukan pada minggu pertama dan minggu ketiga setelah penyimpanan (Kurniawati *et al.* 2010).

7.2 Uji homogenitas. Pengujian homogenitas dilakukan dengan mengoleskan setiap sediaan pada empat buah gelas obyek kemudian diratakan dan diamati homogenitasnya. Jika tidak terdapat butiran kasar pada keempat gelas obyek tersebut maka sediaan homogen. Pengujian homogenitas dilakukan pada minggu pertama dan minggu ketiga setelah penyimpanan (Kurniawati *et al.* 2010).

7.3 Uji daya lekat. Pengujian daya lekat dilakukan dengan meletakkan gel sebanyak 0,5 g diatas obyek glass kemudian letakkan obyek glass lain diatas gel tersebut, tekan dengan beban 1 kg selama 5 menit. Pasangkan pada alat uji, lepaskan beban 80 g dan catat waktunya hingga kedua obyek terlepas. Pengujian diulangi sebanyak tiga kali tiap sediaan (Kurniawati *et al.* 2010).

7.4 Uji daya sebar. Pengujian daya sebar dilakukan dengan meletakkan gel sebanyak 0,5 g pada alat kaca bulat. Timbang bobot kaca yang lain letakkan diatas massa gel, biarkan selama 1 menit. Ukur diameter gel yang menyebar, tambahkan beban 50 g diamkan selama 1 menit dan ukur diameter seperti sebelumnya. Tambahkan beban hingga 150 g. Pengujian diulangi sebanyak tiga kali tiap sediaan. Pengujian daya sebar dilakukan pada minggu pertama dan minggu ketiga. setelah penyimpanan (Kurniawati *et al.* 2010).

7.5 Uji viskositas. Pengujian viskositas dilakukan dengan viskometer VT-04. Saat rotor berputar jarum penunjuk viskositas secara otomatis bergerak ke kanan, tunggu hingga jarum penunjuk stabil, dibaca viskositasnya pada skala rotor yang digunakan menurut JTS 28809 standar viskositas yang dikalibrasi untuk VT-04 adalah desipaskal second (d-Pas). Pengujian diulangi sebanyak tiga kali tiap sediaan. Pengujian viskositas dilakukan pada minggu pertama dan minggu ketiga setelah penyimpanan (Kurniawati *et al.* 2010).

7.6 Uji pH. Pengujian pH sediaan dilakukan dengan menggunakan pH meter yang telah dikalibrasi dengan larutan pH 4, pH 7, dan pH 9. Indikator pH meter dicelupkan ke dalam masing-masing sediaan gel yang telah diencerkan. Setelah tercelup sempurna kemudian tunggu hingga stabil dan catat nilai pH yang

muncul. Dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali tiap sediaan. Pengujian pH dilakukan pada minggu pertama dan minggu ketiga setelah penyimpanan.

7.7 Uji stabilitas. Pengujian stabilitas sediaan gel dilakukan dengan metode *freeze thaw* yaitu dengan menyimpan sediaan pada suhu 4⁰C selama 48 jam kemudian dipindahkan pada suhu 40⁰C selama 48 jam (1 siklus), lanjutkan hingga lima siklus. Tiap siklus diamati ada tidaknya perubahan pada masing-masing sediaan.

8. Pembuatan kontrol

Pertama, kontrol negatif. Kontrol negatif yang digunakan adalah sediaan gel yang tidak mengandung kombinasi minyak atsiri rimpang lengkuas merah dan bangle.

Kedua, kontrol positif. Kontrol positif yang digunakan adalah ketoconazol gel 2%.

Ketiga, kontrol normal. Kontrol normal adalah kulit punggung kelinci yang telah dicukur bulunya yang tidak diberikan perlakuan.

9. Pembuatan stok jamur *Candida albicans* ATCC 10231

Candida albicans ATCC 10231 diambil dari suatu biakan murni sebanyak beberapa ose, kemudian digoreskan pada media Sabouraud Glukosa Agar (SGA) miring pada tabung, kemudian diinkubasi 24-48 jam pada suhu 37⁰C. Hasil inkubasi digunakan sebagai stok jamur uji *Candida albicans* ATCC 10231.

10. Pembuatan suspensi jamur *Candida albicans* ATCC 10231

Beberapa ose biakan jamur *Candida albicans* ATCC 10231 diambil, dimasukkan kedalam tabung reaksi yang berisi 10 ml larutan SGC. Campuran dihomogenkan dan disetarakan kekeruhan dengan standar Mc Ferland 0,5.

11. Identifikasi jamur *Candida albicans* ATCC 10231

11.1 Identifikasi makroskopis. Identifikasi *Candida albicans* ATCC 10231 dilakukan dalam media Sabouraud Glukosa Agar (SGA) yang diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 24-48 jam. Kemudian akan tampak bentuk koloni-koloni lunak permukaan berwarna putih yang mempunyai bau seperti ragi dengan bentuk bulat dengan pinggiran halus dan permukaan cembung (Mutiawati 2016).

11.2 Identifikasi biokimia. Identifikasi biokimia dilakukan dengan menggunakan media gula-gula (glukosa, sukrosa, laktosa dan maltosa). Jamur diinokulasi dalam media, diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu 37⁰C. Hasil positif ditunjukkan jika terdapat gas pada tabung durham, serta bentuk asam pada reaksi fermentasi, dengan perubahan warna merah dari indikator fenol red menjadi kuning (Mutiawati 2016).

11.3 Identifikasi dengan pengecatan. Identifikasi jamur salah satunya dengan menggunakan pewarnaan Lactophenol Cotton Blue (LCB) dan KOH 10%. Dalam pewarnaan LCB, phenol berfungsi untuk mematikan jamur. Glycerol mengawetkan preparat dan mencegah presipitasi dari cat dan cotton blue berfungsi untuk mewarnai jamur menjadi biru. Metode pewarnaan LCB menggunakan bahan-bahan phenol 20 g, lactic acid 20 ml, glycerol 40 g dan cotton 0,05 g. Mekanisme kerjanya, jamur ose dipanaskan, diambil dua tetes pewarna LCB dan letakkan pada gelas obyek. Kemudian panaskan ose, lalu didinginkan. Setelah bahan siap, koloni jamur diambil kemudian dicampur dengan larutan LCB pada obyek glass, tutup dengan penutup gelas dan amati hasilnya dibawah mikroskop (Nurchayati 2018).

12. Pengujian aktivitas antijamur secara *in-vivo*

Pengujian dilakukan dengan menggunakan lima ekor kelinci *New Zealand* umur \pm 3 bulan dengan berat \pm 1,5-2 kg, dalam keadaan sehat dan bebas dari penyakit. Kelinci diaklimatisasi pada lingkungan tempat penelitian selama 7 hari sebelum diperlakukan, hal tersebut dimaksudkan agar hewan uji terbiasa dengan lingkungan dan perlakuan baru. Kelinci yang hendak diuji, dicukur bulunya terlebih dahulu pada bagian punggung. Setelah bersih dari bulu, bagian yang telah dicukur dibagi menjadi enam lokasi. Sebelum dibuat luka, terlebih dahulu kulit punggung dibersihkan dengan alkohol 70%. Kemudian dibuat luka sayatan pada lima lokasi yang telah ditentukan dengan menggunakan pisau bedah steril. Satu lokasi merupakan kontrol normal (tanpa perlakuan). Panjang luka sekitar 2 cm dengan kedalaman \pm 2 mm, lalu suspensi jamur *Candida albicans* sebanyak 0,3 ml diratakan pada permukaan kulit yang telah terluka. Luka tersebut ditutup dengan kasa steril dan diamati hingga terjadi infeksi.

Pemberian sediaan gel dilakukan setelah terjadinya infeksi, ditandai dengan terbentuknya lesi dan eritema, pada daerah yang diinfeksi. Sediaan gel kombinasi minyak atsiri rimpang lengkuas merah dan bangle dengan konsentrasi 2%, 4%, dan 8% dioleskan pada lokasi yang telah ditentukan, kemudian ditutup kembali dengan aluminium foil untuk mencegah terjadinya kontaminasi bakteri. Penutupan luka infeksi tidak dilakukan dengan kasa steril melainkan aluminium foil, karena penggunaan kasa dapat membuat sediaan terserap dalam kasa sehingga kurang memberikan efek terapi. Pemberian sediaan gel dilakukan 2 kali sehari sebanyak 0,5 g. Pengamatan terhadap berkurangnya infeksi yang ditandai dengan hilangnya lesi, eritema (dilihat dari skor eritema), keringnya luka dalam hitungan hari, serta tidak adanya koloni jamur pada media kultur SGA.

Skor eritema: 0 = tidak ada eritema; 1 = eritema ringan (diameter kurang dari 25,00 mm); 2 = eritema sedang (diameter kurang dari 25,10-30,00 mm); 3 = eritema kuat (diameter antara 30,10-35,00 mm); 4 = eritema parah (diameter lebih dari 35,10 mm) (Sukandar *et al.* 2006).

13. Pengamatan koloni jamur *Candida albicans* ATCC 10231

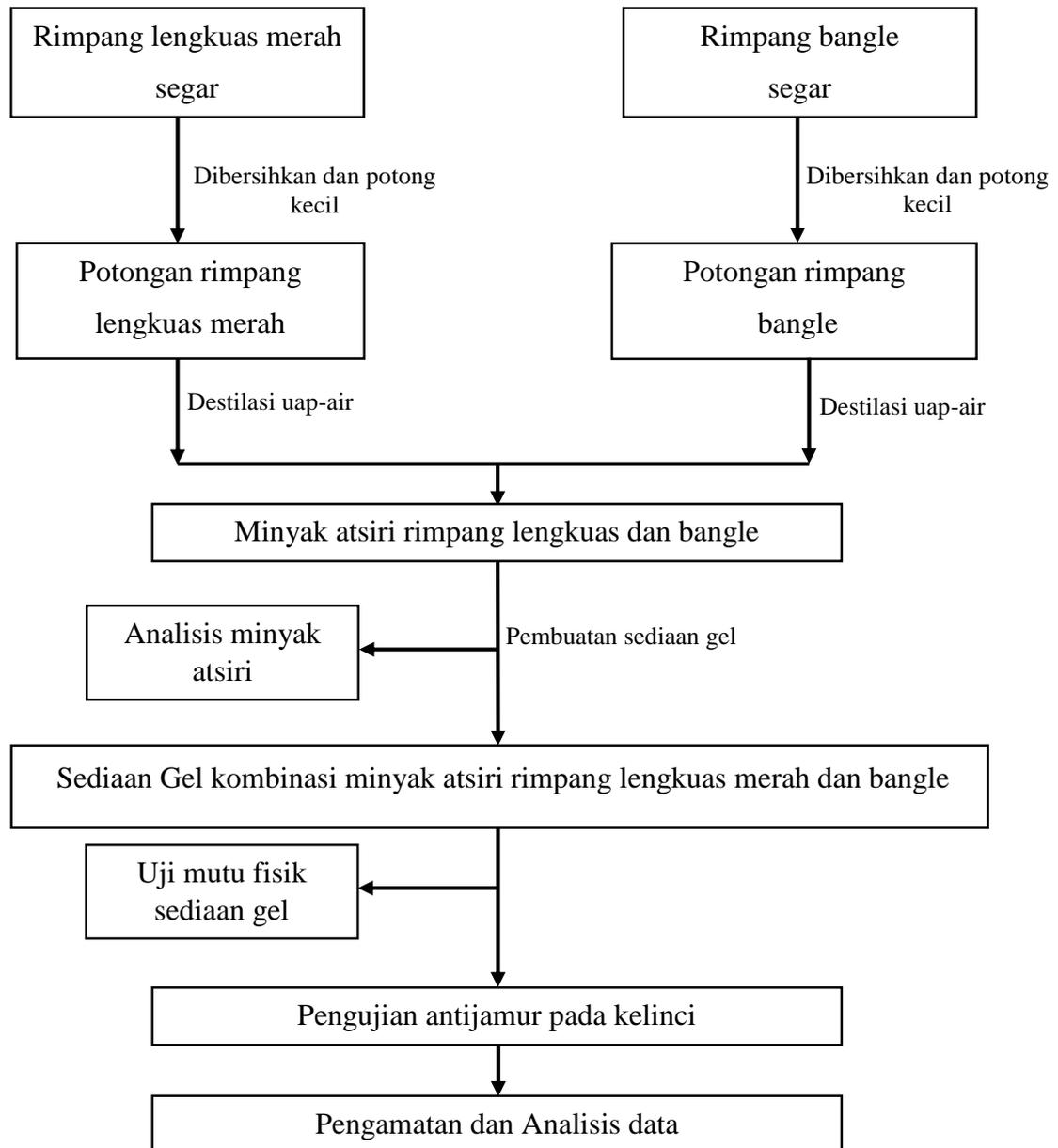
Pengamatan pada koloni jamur *Candida albicans* ATCC 10231 dilakukan secara makroskopis. Pengamatan koloni dilakukan dengan melihat ada tidaknya pertumbuhan koloni jamur pada media kultur SGA. Pengamatan dilakukan dengan cara aseptis, menggunakan peralatan steril untuk meminimalisir kontaminasi. Kapas lidi steril dan NaCl fisiologis 0,9% disiapkan. Sampel diambil dengan apusan kapas lidi pada kulit kelinci yang dilukai, secara berulang menggunakan kapas lidi steril yang telah dibasahi atau dimasukkan dalam larutan NaCl fisiologis 0,9%. Kemudian sampel diswap pada media SGA, cawan kultur diberi label. Media diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 24-48 jam.

E. Analisis Data

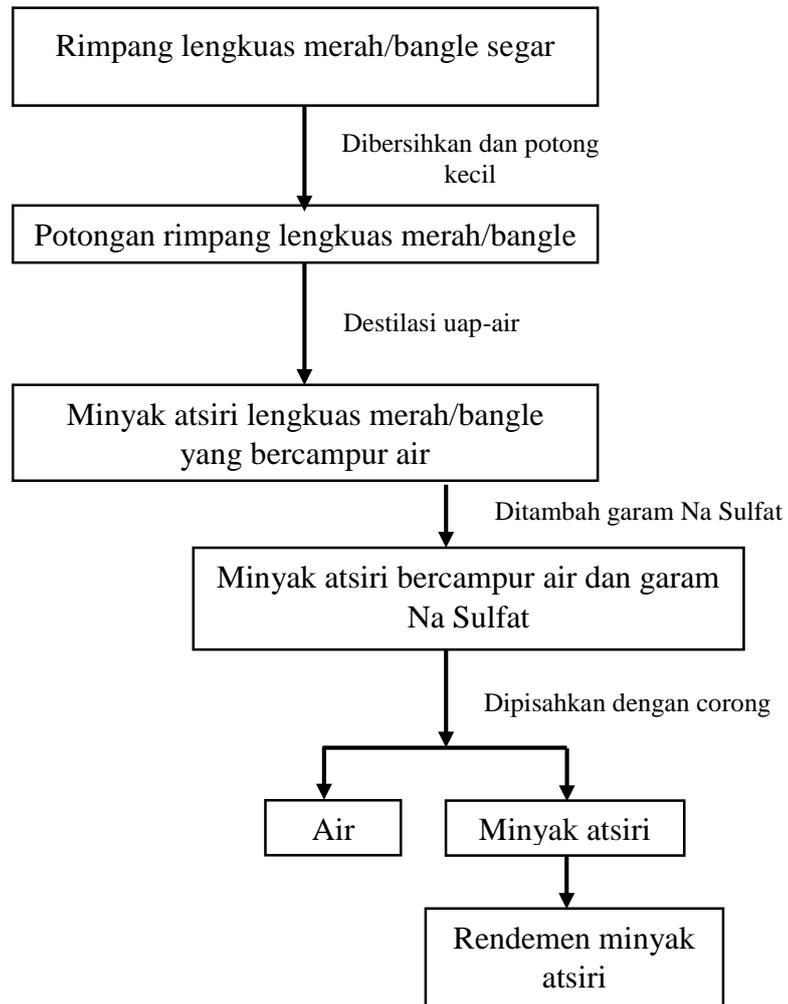
Data hasil pengujian aktivitas antijamur sediaan gel kombinasi rimpang lengkuas merah (*Alpinia purpurata* K. Schum.) dan bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.), pada perbandingan 3:1 dengan konsentrasi 2%, 4%, dan 8% dilihat pada lamanya waktu penyembuhan dianalisis secara statistik menggunakan metode Kolmogorov-Smirnov. Hasilnya jika terdistribusi normal ($p > 0,05$) dilanjutkan dengan uji ANOVA dengan taraf kepercayaan 95%.

Data uji daya sebar, daya lekat, dan uji viskositas dianalisis secara statistik menggunakan uji Kolmogorov-Smirnov, jika terdistribusi normal ($p > 0,05$) dilanjutkan dengan uji ANOVA dua jalan dengan taraf kepercayaan 95% kemudian dilanjutkan dengan uji post hoc untuk mengetahui perbedaan antara satu dengan yang lainnya.

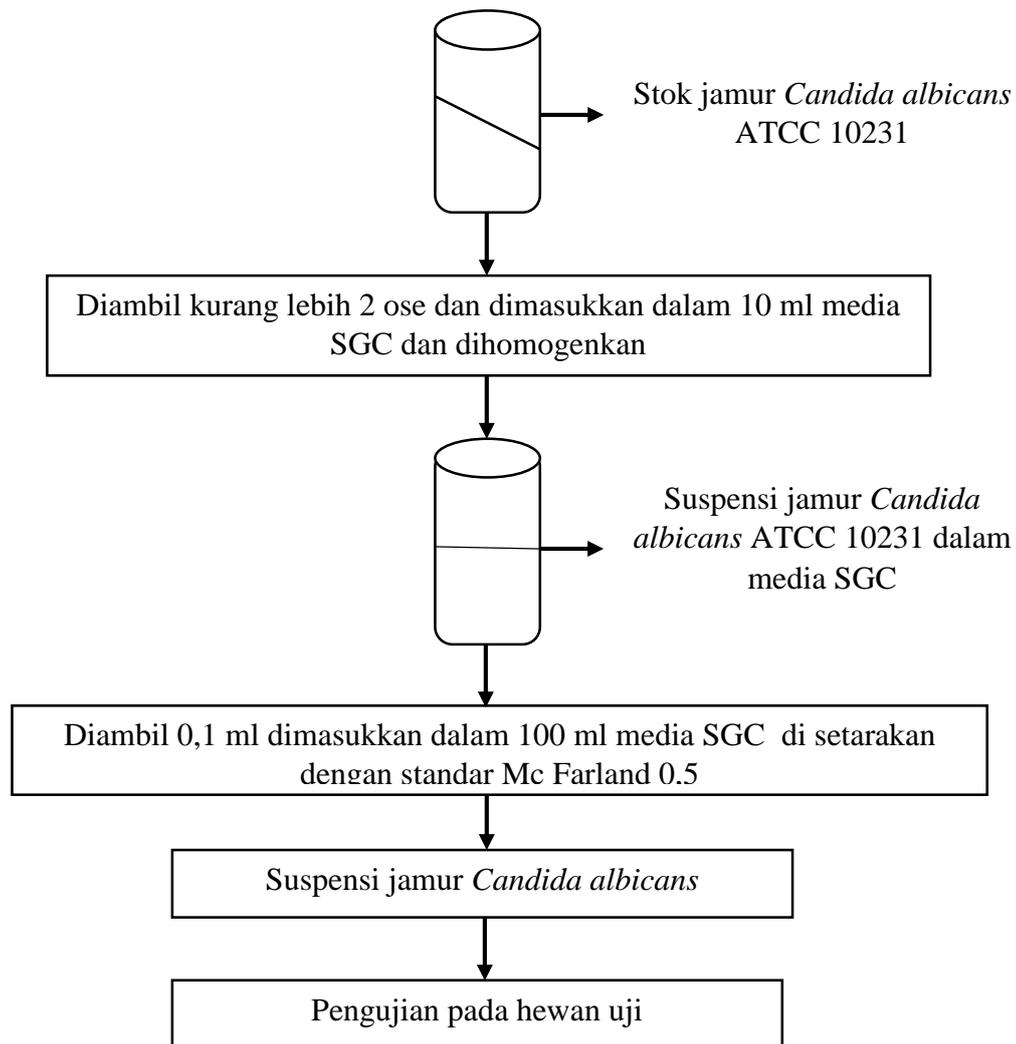
F. Skema Jalannya Penelitian



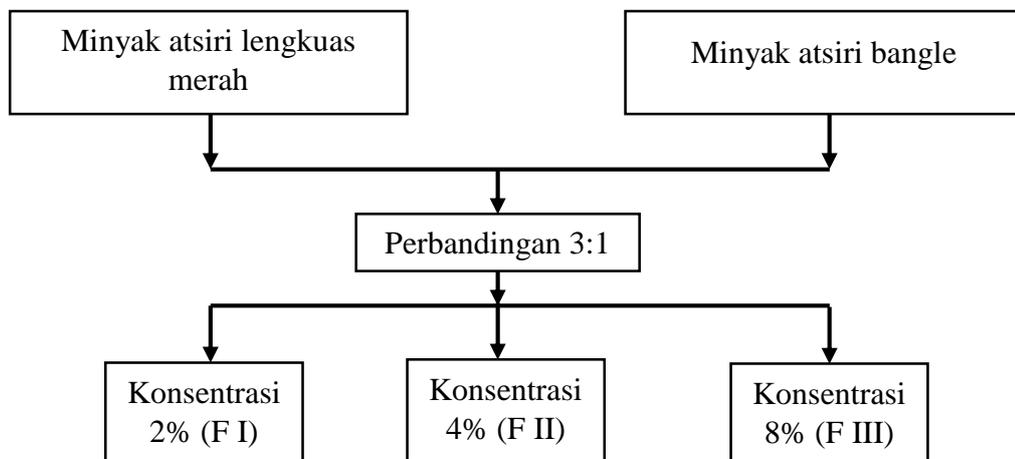
Gambar 12. Alur penelitian.



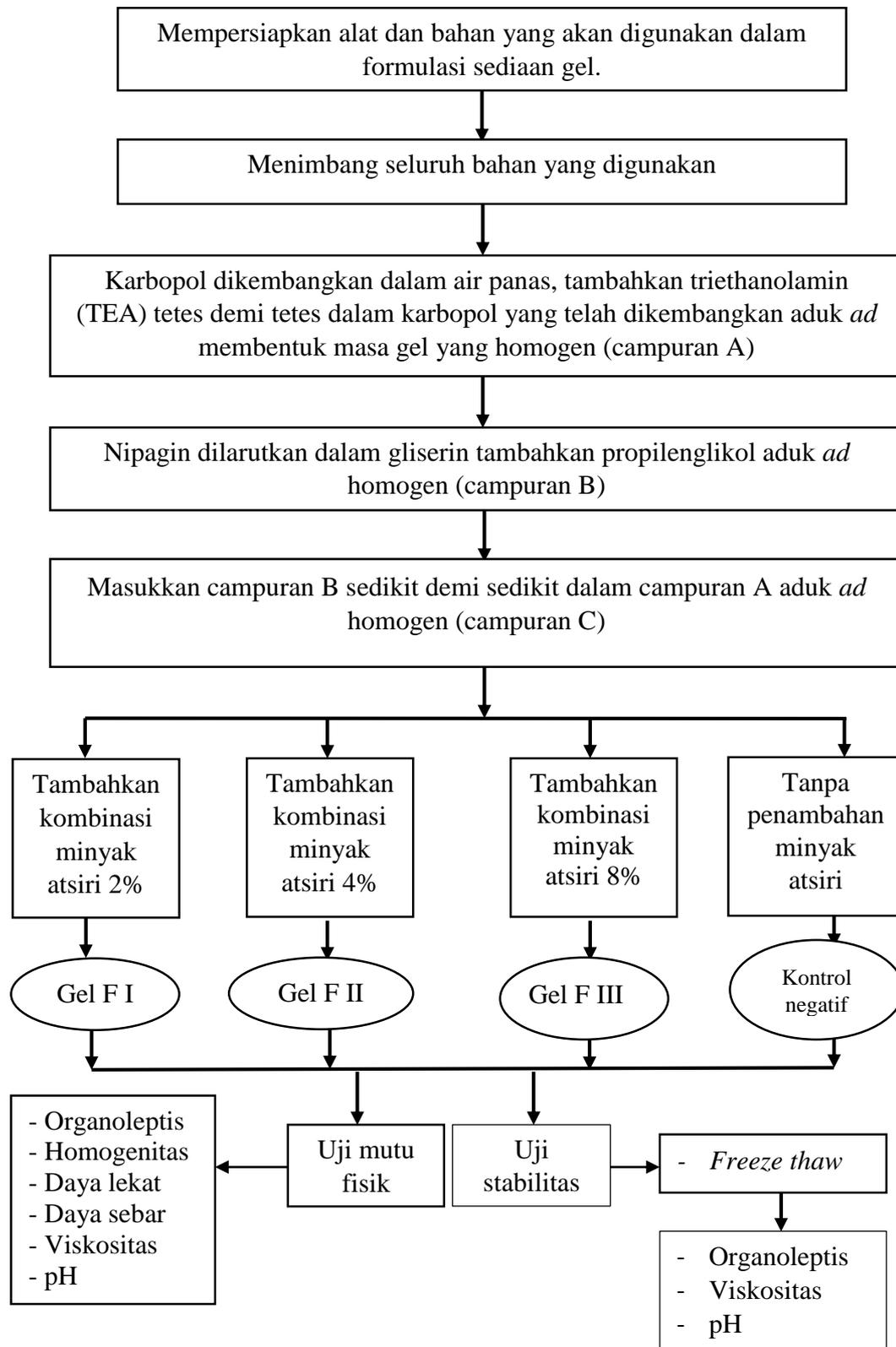
Gambar 13. Skema isolasi minyak atsiri rimpang lengkuas merah/bangle.



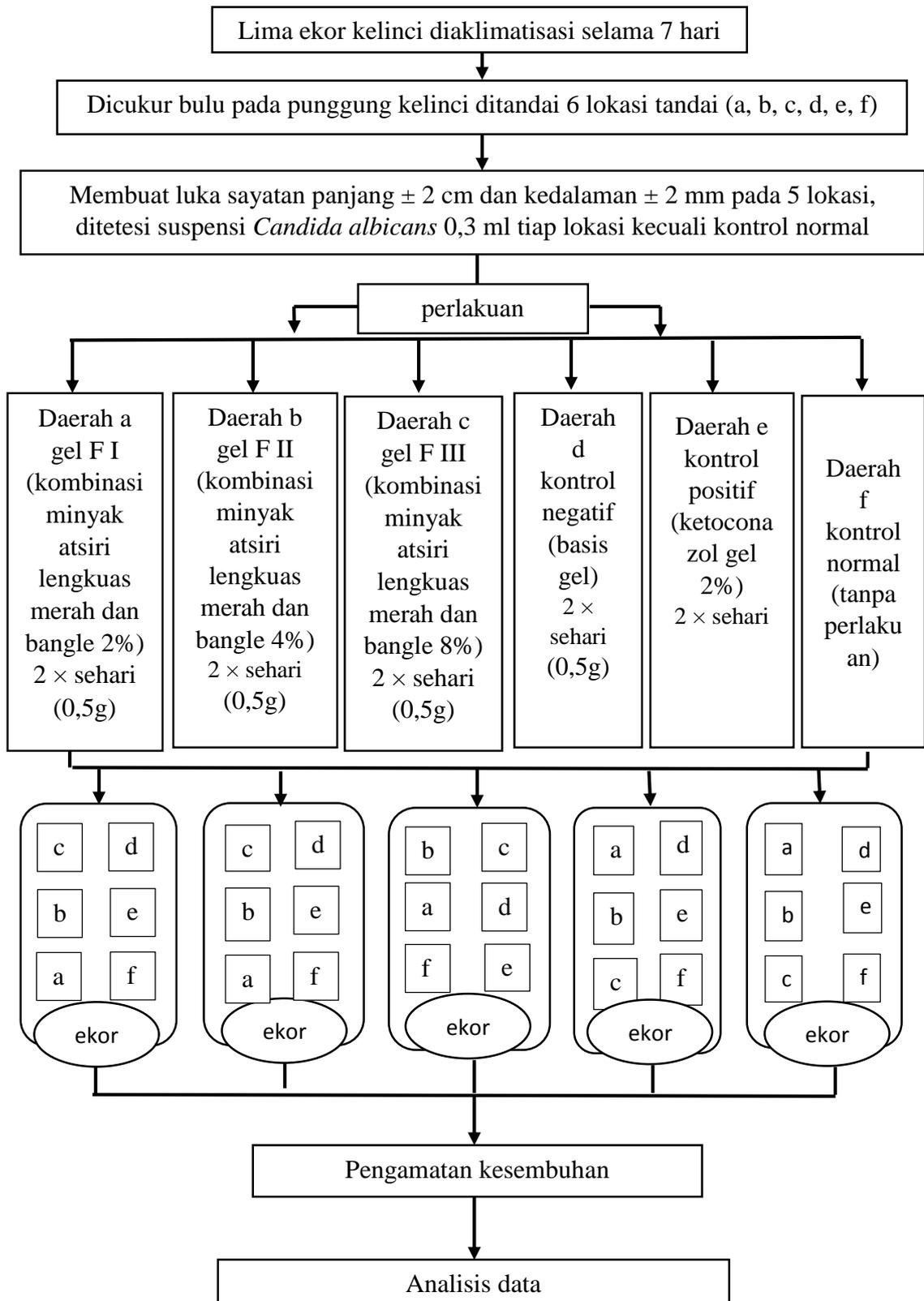
Gambar 14. Skema pembuatan suspensi jamur.



Gambar 15. Skema pembuatan kombinasi minyak atsiri rimpang lengkuas merah dan bangle dalam 100 gram sediaan gel.



Gambar 16. Skema pembuatan sediaan gel.



Gambar 17. Skema uji aktivitas antijamur pada kelinci.