

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi adalah keseluruhan objek penelitian atau yang diteliti. Populasi yang digunakan pada penelitian ini adalah daun turi yang diperoleh dari Desa Wonorejo, Kecamatan Kedunggalar, Kabupaten Ngawi, Jawa Timur pada bulan Januari 2019.

Sampel adalah bagian dari populasi yang dipilih dengan cara tertentu sehingga dianggap mewakili populasi. Sampel yang digunakan adalah daun turi yang berwarna hijau segar yang tidak terlalu tua dan tidak terlalu muda dan terbebas dari hama.

B. Variabel penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama dalam penelitian yang pertama ini adalah ekstrak etanol daun turi terhadap *C. albicans* ATCC 10231 yang dibuat formulasi dengan konsentrasi ekstrak yang berbeda dengan basis M/A, melalui pengujian stabilitas fisik krim dengan berbagai parameter pengujian.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel bebas yang dimaksud dalam penelitian ini adalah variabel yang sengaja direncanakan untuk diteliti pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dari penelitian ini adalah perbedaan konsentrasi dari ekstrak etanol daun turi dalam sediaan krim.

Variabel terkontrol yang dimaksudkan dalam penelitian ini adalah variabel yang dianggap berpengaruh selain variabel bebas. Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah kondisi hewan uji, lingkungan, waktu panen, metode ekstraksi, dan peneliti.

Variabel tergantung adalah titik pusat dari suatu persoalan yang merupakan kriteria penelitian ini. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah

mutu fisik, stabilitas dan daya aktivitas antijamur dari krim ekstrak etanol daun turi.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun turi yang diambil daun segarnya tidak terlalu muda dan tidak terlalu tua diperoleh dari daerah Desa Wonorejo, Kecamatan Kedunggalar, Kabupaten Ngawi, Jawa Timur pada bulan Januari 2019.

Kedua, serbuk daun turi yang diambil kemudian dicuci, dikeringkan dengan oven pada suhu 40°C lalu dihaluskan, kemudian serbuk diayak dengan ayakan nomer mesh 40.

Ketiga, ekstrak daun turi adalah hasil ekstraksi daun turi dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol.

Keempat, ekstrak etanol daun turi dibuat sediaan krim dan dicampur dengan basis yang telah ditentukan M/A.

Kelima, jamur uji dalam penelitian ini adalah *C. Albicans* yang diperoleh dari laboratorium mikrobiologi Universitas Setia Budi Surakarta.

Keenam, uji daya sembuh adalah kemampuan uji untuk menyembuhkan luka infeksi pada kulit punggung kelinci yang diinfeksi *C. albicans*.

C. Tempat Penelitian

Penelitian akan dilakukan di Laboratorium Teknologi Formulasi Sediaan Semi Padat dan Cair, Laboratorium Fitokimia dan Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi Surakarta.

D. Bahan dan Alat

1. Bahan sampel

Daun turi (*S. grandiflora* L.), etanol 70%, asam stearat, setil alkohol, propilen glikol, paraffin liquidum, metil paraben, propil paraben, asam askorbat, isopropil miristat, gliserin monostearat, TEA, minyak mawar, dan akuades.

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah kelinci putih jantan (*New Zealand White*) berumur \pm 3-5 bulan, dengan berat kelinci 1,5-2 kg.

2. Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian adalah timbangan analitik, oven, *rotary evaporator*, cawan petri, tabung reaksi, jarum Ose, autoklaf, incubator, *moisture balance*, pipet volume, gelas ukur, mortir, stamper, erlenmeyer, beaker glass, kertas saring, pH meter, viskometer, alat uji daya sebar, klem, inkubator, *scalpel disposable*, dan ayakan mesh 40.

E. Jalannya Penelitian

1. Determinasi dan identifikasi tanaman

Determinasi bertujuan untuk menetapkan kebenaran sampel. Hal ini dilihat dari ciri-ciri dan morfologi dari sampel terhadap pustaka dan fisiologi. Determinasi dan identifikasi daun turi dilakukan di laboratorium B₂P₂TOOT Jl. Raya Lawu No11, Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Provinsi Jawa Tengah.

2. Persiapan bahan

Daun turi merupakan daun dari tanaman turi yang diperoleh dari Desa Wonorejo, Kecamatan Kedunggalar, Kabupaten Ngawi, Jawa Timur. Pengambilan daun dilakukan pada daun yang masih segar. Daun dicuci dengan air yang mengalir untuk menghilangkan pengotor atau kontaminan yang tidak diinginkan di dalam tanaman, ditiriskan dan kemudian dikeringkan.

3. Pembuatan serbuk daun turi

Daun turi yang telah dikeringkan dengan oven pada suhu 40°C menjadi serbuk. Serbuk tersebut kemudian diayak menggunakan ayakan ukuran mesh 40. Hasil dari pembuatan serbuk kemudian dikeringkan disimpan dalam wadah kering dan tertutup rapat yang selanjutnya akan digunakan untuk penelitian.

4. Pemeriksaan kelembaban serbuk daun turi

Pemeriksaan kelembaban serbuk daun turi dilakukan dengan cara timbang 2 gram serbuk simplisia lalu dimasukkan dalam wadah yang sudah ada dalam alat *Moisture Balance* dengan suhu 105°C. Pengoperasian alat telah selesai apabila

alat tersebut berbunyi, kemudian dicatat hasilnya (dalam satuan %). Konsentrasi air yang memenuhi syarat apabila konsentrasi air suatu serbuk simplisia tidak lebih dari 10%.

5. Pembuatan ekstrak etanol daun turi

Masukkan 700 gram serbuk kering daun turi, tambahkan 10 bagian pelarut. Rendam selama 6 jam pertama sambil sekali-sekali diaduk, kemudian diamkan selama 18 jam. Pisahkan maserat dengan cara pengendapan, sentrifugasi, dekantasi atau filtrasi. Ulangi proses penyarian sekurang-kurangnya satu kali dengan jenis pelarut yang sama dan jumlah volume pelarut sebanyak setengah kali jumlah volume pelarut pada penyarian pertama. Kumpulkan semua maserat, kemudian uapkan dengan penguap vakum atau penguap tekanan rendah hingga diperoleh ekstrak kental. Hitung rendemen yang diperoleh yaitu persentase bobot (b/b) antara rendemen dengan bobot serbuk simplisia yang digunakan dengan penimbangan. Rendemen harus mencapai angka sekurang-kurangnya sebagaimana ditetapkan pada monografi ekstrak (Depkes RI 2013).

6. Penetapan kadar air ekstrak etanol daun turi

Penetapan kadar air dilakukan dengan cara destilasi toluen. Toluena yang digunakan dijenuhkan dengan air terlebih dahulu. Kemudian ditimbang seksama ekstrak sebanyak 10 g dan masukkan kedalam labu alas bulat dan tambahkan toluena yang telah dijenuhkan. Labu dipanaskan hati-hati selama 15 menit, setelah toluena mulai mendidih, penyulingan diatur 2 tetes/detik, lalu 4 tetes/detik. Setelah semua air tersuling dilanjutkan pemanasan selama 5 menit. Biarkan tabung penerima dingin hingga suhu kamar. Volume air dibaca sesudah toluena dan air memisah sempurna. Lakukan replikasi sebanyak tiga kali kemudian hitung persentasenya (Saifudin *et al.* 2011).

7. Uji bebas etanol pada ekstrak daun turi

Uji bebas etanol dilakukan untuk mengetahui apakah ekstrak daun turi sudah benar-benar bebas etanol. Pengujian dengan melakukan test esterifikasi etanol. Reaksi negatif ditunjukkan dengan tidak terbentuknya etil asetat yang khas.

8. Identifikasi kandungan senyawa ekstrak etanol daun turi

Kandungan senyawa yang dimaksudkan untuk menetapkan kebenaran kandungan kimia yang terkandung dalam daun turi. Identifikasi kandungan senyawa kimia dibuktikan di Laboratorium Fitokimia Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta.

8.1 Flavonoid. Identifikasi flavonoid dilakukan dengan 0,5 gram ekstrak etanol daun turi dilarutkan dalam 10 ml air dipanaskan 15 menit, kemudian didinginkan disaring. Filtratnya ditambahkan serbuk Mg dan 2 ml larutan etanol:asam klorida (1:1) dan pelarut amil alkohol. Campuran ini dikocok kuat, kemudian dibiarkan beberapa saat agar memisah, reaksi positif ditunjukkan dengan warna merah atau kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol (Harborne 2006).

8.2 Tanin. Identifikasi tanin dilakukan dengan 0,5 gram ekstrak etanol daun turi dimasukkan ke tabung reaksi ditambah dengan besi (III) klorida dan amoniak, akan terbentuk warna biru tua atau hitam kehijauan (Harborne 2006).

8.3 Saponin. Identifikasi saponin dilakukan dengan 0,5 gram ekstrak etanol daun turi dilarutkan dalam 10 ml air dipanaskan diambil sebanyak 5 ml filtrat, kemudian didinginkan lalu dikocok kuat-kuat selama 10 menit, apabila terbentuk buih setinggi 1-10 cm dan ditambah dengan 1 tetes HCl 2 N jika buih tidak hilang maka hasilnya positif (Depkes 1995).

9. Rancangan formula krim ekstrak etanol daun turi

Pembuatan krim ekstrak etanol daun turi didahului dengan pembuatan basis krim. Basis kri terdapat dua fase yaitu, fase air dan fase minyak. Rancangan formula dibuat tiga variasi konsentrasi ekstrak daun turi yaitu 0,025% ; 0,050% ; 0,075% kemudian ditambahkan ke dalam basis yang telah ditentukan.

Tabel 1. Rancangan formula krim sediaan ekstrak daun turi.

Nama bahan	Formula krim (%)			
	F1	F2	F3	K-
Ekstrak etanol daun turi	0,025	0,050	0,075	-
Asam stearat	3,5	3,5	3,5	3,5
Setil alkohol	2	2	2	2
Propilen glikol	5	5	5	5
Paraffin liquidum	20	20	20	20
Nipagin	0,15	0,15	0,15	0,15
Nipasol	0,05	0,05	0,05	0,05
Isopropil miristat	4	4	4	4
Gliserin monostearat	2	2	2	2
TEA	1	1	1	1
Minyak mawar	0,2	0,2	0,2	0,2
Akuades ad	100	100	100	100

Keterangan :

F1 : ekstrak etanol daun turi konsentrasi 0,025%

F2 : ekstrak etanol daun turi konsentrasi 0,050%

F3 : ekstrak etanol daun turi konsentrasi 0,075%

K- : basis krim (kontrol negatif)

10. Pembuatan sediaan krim

Pembuatan krim ekstrak etanol daun turi dengan tiga konsentrasi ekstrak yang berbeda. Fase minyak (asam stearat, setil alkohol, nipasol, isopropil miristat, gliserin monostearat, minyak mawar, paraffin liquidum) dan fase air (akuades, propilen glikol, nipagin, TEA) dilebur diatas penangas air dengan suhu 60-70°C. Fase minyak dan fase air dicampur dengan kondisi mortir dan stemper dalam keadaan panas dan diaduk sampai terbentuk masa krim. Dimasukkan ekstrak etanol daun turi yang telah di larutkan dalam akuades dan diaduk sampai homogen. Dimasukkan dalam wadah yang cocok dan tertutup rapat.

11. Pengujian fisik krim ekstrak daun turi

11.1 Uji organoleptis. Uji organoleptis dilakukan untuk mendeskripsikan warna, bau, dan konsistensi dari sediaan krim yang sudah bercampur dengan beberapa basis, sediaan yang dihasilkan sebaiknya memiliki warna yang bagus dan menarik, bau yang menyenangkan dan kekentalan yang cukup agar nyaman dalam penggunaannya. Pengujian pertama dilakukan di hari pertama krim dibuat dan di uji kembali pada hari ke-21 setelah pembuatan (Sharon *et al.* 2013).

11.2 Uji homogenitas. Cara krim di uji homogenitasnya dengan cara dioleskan pada plat kaca atau bahan transparan yang cocok, bila homogen maka

massa krim tidak tersisa bahan padatnya. Pengujian pertama dilakukan dihari pertama krim dibuat dan di uji kembali pada hari ke-21 setelah pembuatan (Rahmawati *et.al* 2010)

11.3 Uji viskositas. Uji viskositas krim dilakukan dengan menggunakan alat viskometer *Cup and Bob*. Viskometer VT-04 E RION, LTD dipasang pada klemnya dengan arah horizontal atau tegak lurus dengan arah klem. Rotor dipasang pada viskometer dengan menguncinya berlawanan dengan arah jarum jam. Mangkuk diisi dengan sampel krim yang akan diuji setelah itu tempatkan rotor tepat berada ditengah-tengah mangkuk yang berisi kim, kemudian alat dihidupkan. Rotor mulai berputar dan jarum penunjuk viskositas secara otomatis akan bergerak menuju ke kanan kemudian setelah stabil, viskositas dibaca pada skala dari rotor yang digunakan. Setelah selesai pengukuran viskometer dimatikan. Pengujian diulangi sebanyak 3 kali tiap formulanya pengujian pertama dilakukan dihari pertama krim dibuat dan di uji kembali pada hari ke-21 setelah pembuatan (Sharon *et al* .2013).

11.4 Uji daya sebar. Uji daya sebar dilakukan dengan menimbang 0,5 gram krim, diletakkan di tengah kaca bulat. Kaca satunya lalu ditimbang kemudian diletakkan diatas masa krim dan dibiarkan 1 menit. Diameter krim yang menyebar diukur kemudian ditambahkan 50 gram, 100 gram, 150 gram, sebagai beban tambahan, setiap penambahan beban didiamkan selama 1 menit setelah itu dicatat diameter krim yang menyebar seperti sebelumnya. Pengujian diulangi sebanyak 3 kali tiap formulanya. Pengujian pertama dilakukan dihari pertama krim dibuat dan di uji kembali pada hari ke-21 setelah pembuatan (Sharon *et al* .2013).

11.5 Uji daya lekat. Uji daya lekat dilakukan dengan cara melekatkan krim secukupnya diatas objek glass, objek glass lain lalu diletakkan diatas krim tersebut, kemudian ditekan dengan beban 1 kg selama 5 menit lalu pasang objek glass pada alat tes setelah itu lepaskan beban seberat 20 gram dan catat waktunya hingga kedua objek glass tersebut terlepas. Pengujian diulangi sebanyak 3 kali tiap formulanya. Pengujian pertama dilakukan dihari pertama krim dibuat dan di uji kembali pada hari ke-21 setelah pembuatan (Sharon *et al* .2013).

11.6 Uji pH. Pengukuran pH dilakukan dengan cara mencelupkan pH Meter bagian elektrode ke dalam sediaan krim yang akan diuji. pH meter elektrode sebelumnya telah dikalibrasi pada larutan buffer pH 4, pH 7, dan pH 9 kemudian sampel diencerkan dengan air perbandingan 1:10 elektrode dicelupkan ke dalam sampel tersebut, ditunggu sampai menunjukkan angka pH yang konstan. Pengujian diulangi sebanyak 3 kali tiap formulanya. Pengujian pertama dilakukan dihari pertama krim dibuat dan di uji kembali pada hari ke-21 setelah pembuatan (Sharon *et al.* 2013).

11.7 Uji tipe krim. Tipe krim diuji dengan metode pewarnaan menggunakan *methylen blue* yang larut dalam fase air dan Sudan III yang larut dalam fase minyak. Jika medium pendispers berwarna biru merata maka krim adalah tipe M/A dan sebaliknya jika medium pendispers berwarna merah merata, maka krim bertipe A/M. Pengujian pertama dilakukan dihari pertama krim dibuat dan di uji kembali pada hari ke-21 setelah pembuatan (Lachman *et al.* 1994).

12. Pembuatan stok *C. albicans*

C. albicans ATCC 10231 diambil dari suatu biakan murni sebanyak satu ose, kemudian digoreskan pada media *Sabouraud Glukosa Agar* miring pada suatu tabung yang kemudian diinkubasi 24-48 jam pada suhu 37°C akan membentuk koloni lunak berwarna krem, bau seperti ragi. Hasil diinkubasi digunakan sebagai stok jamur uji *C. albicans* ATCC 10231.

13. Pembuatan suspensi jamur

Jamur uji *C. albicans* ATCC 10231 diambil 1-2 ose dari biakan jamur dandimasukkan kedalam tabung reaksi yang berisi 10 ml larutan NaCl fisiologis. Campuran dikocok sampai homogen dan didapatkan kekeruhan Standar MC Farlan 0,5. Hasil pengenceran digunakan untuk menguji antijamur *C. albicans* (Bonang & Koeswardono 1982).

14. Identifikasi jamur *Candida albicans*

14.1 Identifikasi makroskopis. Identifikasi *C. albicans* ATCC 10231 dilakukan dalam media *Sabouraud Glukosa Agar* (SGA) yang diinkubasi pada suhu 37°C selama 48-72 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).

14.2 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).

14.3 Identifikasi dengan pengecatan. Identifikasi jamur salah satunya dengan menggunakan pewarnaan *Lactophenol Cotton Blue* (LCB) dan KOH 10%. Dalam pewarnaan LCB berfungsi untuk mengawetkan preparat dan mencegah presipitasi dari cat dan berfungsi untuk mewarnai jamur menjadi biru. Metode pewarnaan LCB jarum ose dipanaskan, diambil dua tetes pewarna LCB dan letakkan pada obyek glas. 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).

15. Penyiapan hewan uji

Hewan uji yang digunakan adalah kelinci berjumlah 5 ekor yang diadaptasikan terlebih dahulu kurang lebih 1 minggu di lingkungan. Kelinci dibagi menjadi 6 kelompok perlakuan.

Kelompok 1 : kelinci yang diberi krim ekstrak daun turi 0,025%

Kelompok 2 : kelinci yang diberi krim ekstrak daun turi 0,050%

Kelompok 3 : kelinci yang diberi krim ekstrak daun turi 0,750%

Kelompok 4 : kelinci yang diberi basis krim (kontrol negatif)

Kelompok 5 : kelinci yang diberi krim ketokonazol 2% (kontrol positif)

Kelompok 6 : kontrol normal (tanpa perlakuan)

16. Uji antijamur

Pengujian antijamur dilakukan dengan cara mencukur bulu disekitar punggung kelinci dan diolesi dengan alkohol 70%. Punggung kelinci dibuat luka dengan sayatan panjang luka \pm 2cm, kedalaman \pm 2 mm menggunakan *scalpel*

steril. Suspensi *C. albicans* ±0.2 ml diberikan dengan cara mengoleskan pada luka menggunakan kapas lidi steril lalu ditutup rapat dengan kasa dan plaster steril. Pengamatan munculnya luka pada kulit punggung kelinci setelah 24-72 jam dengan mengamati munculnya gejala-gejala klinis seperti kulit memerah, membengkak serta dipertegas dengan menggoreskan luka infeksi pada media *Sabouroud Glucose Agar* lalu diamati koloni jamur yang bertambah. Pengobatan dengan pemberian krim ekstrak etanol daun turi, dilakukan setelah 72 jam dengan mengoleskan 2 kali sehari pada kulit punggung kelinci yang telah terinfeksi.

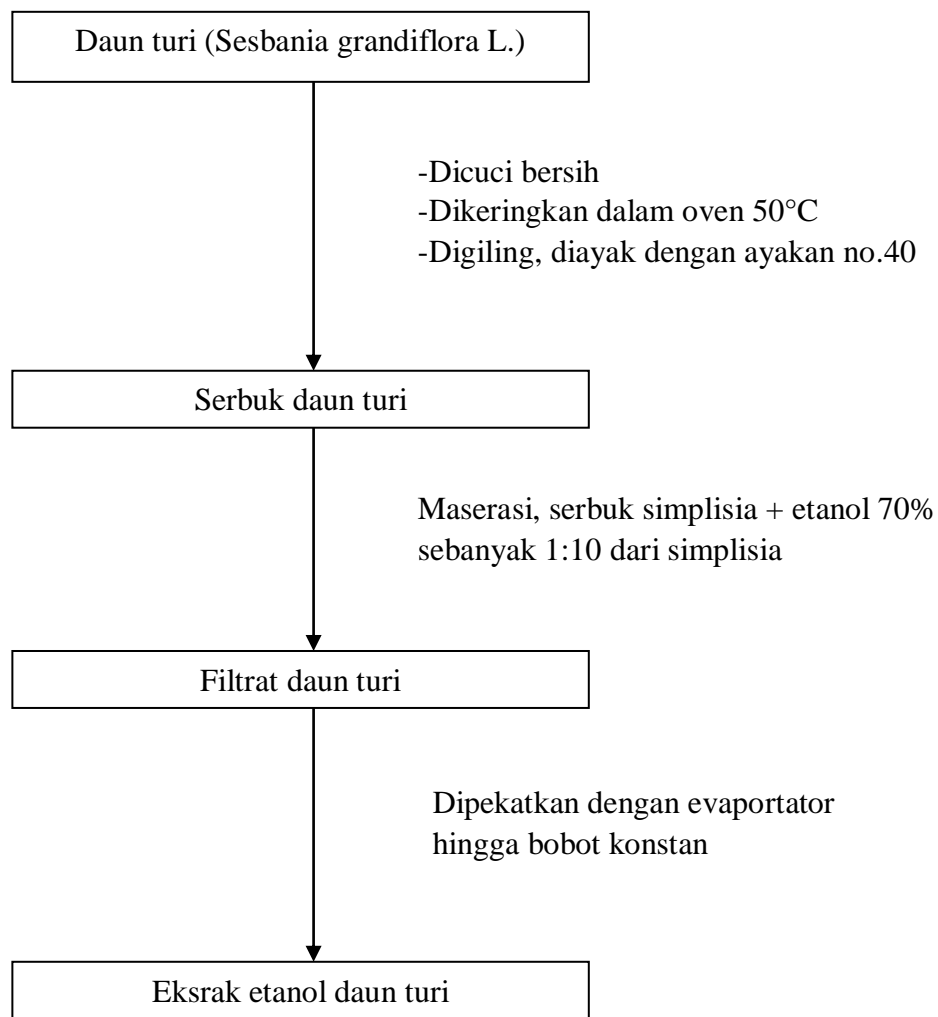
17. Pengamatan penyembuhan luka

Pengamatan penyembuhan luka dilakukan dengan cara mengamati kelinci setiap hari setelah terinfeksi. Panjang luka infeksi diukur setiap hari dan diamati berkurangnya koloni jamur dengan cara menggoreskan luka infeksi pada media *Sabouraud Glucose Agar*. Kelinci dinyatakan sembuh ditandai dengan berkurangnya diameter panjang luka, hilangnya koloni jamur, dan berkurangnya skor eritema pada kelinci. Skor eritema : 0 = tidak ada eritema; 1 = eritema ringan (diameter kurang dari 25.00 mm); 2 = eritema sedang (diameter antara 25.00-30.00 mm); 3 = eritema kuat (diameter antara 30.10–35.00 mm); 4= eritema parah (diameter lebih dari 35.10 mm).

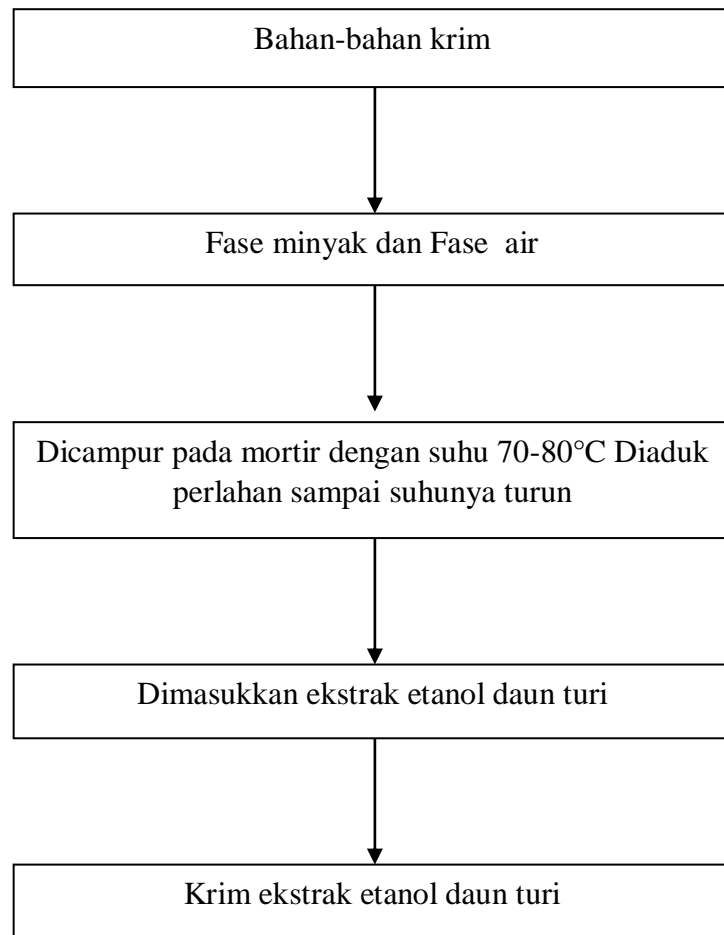
F. Analisis Data

Data hasil 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

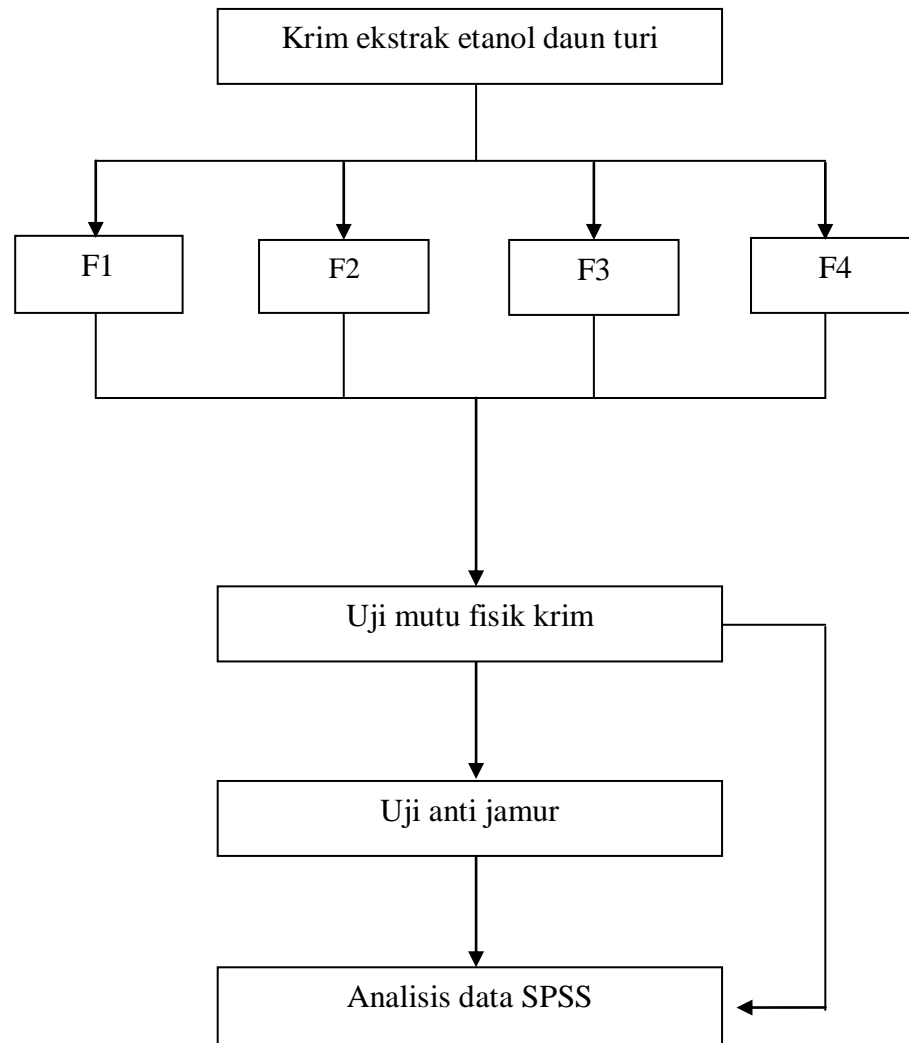
G. Skema Jalannya Penelitian



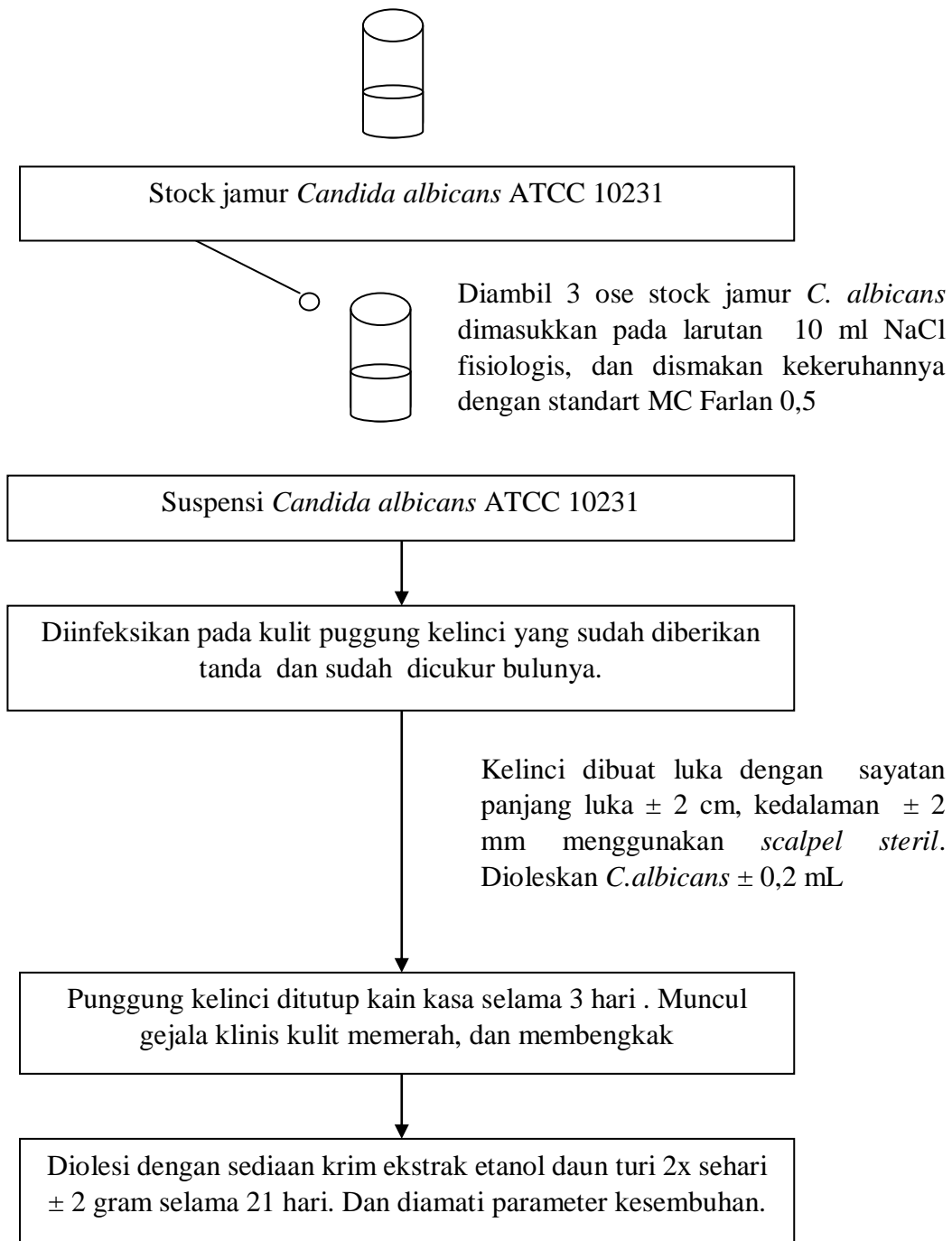
Gambar 10. Skema pembuatan ekstrak daun turi



Gambar 11. Skema pembuatan krim daun turi



Gambar 12. Skema Uji Sifat fisik krim ekstrak etanol daun turi



Gambar 13. Skema uji penyembuhan luka