

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun sirih (*Piper betle* L.) dan rimpang lengkuas putih (*Alpinia galanga* L.) yang diambil dari Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah.

Sampel yang digunakan untuk penelitian ini adalah daun sirih hijau dengan ciri-ciri berwarna hijau segar, berbau khas, tidak busuk, dan belum berubah warna dan rimpang lengkuas putih yang masih segar, berbau aromatik, utuh, tidak ada bagian yang termakan serangga atau busuk, warna permukaan coklat kemerahan, parut daun jelas, bekas patahan berserat pendek, dan berbutir-butir kasar.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama dalam penelitian yang pertama adalah ekstrak rimpang lengkuas putih (*Alpinia galanga* L.) dan daun sirih hijau (*Piper betle* L.).

Variable kedua adalah kombinasi ekstrak rimpang lengkuas putih dan daun sirih hijau perbandingan (1:2), (1:1), (2:1), (0:1), dan (1:0).

Variabel ketiga adalah aktivitas antifungi obat kumur kombinasi ekstrak rimpang lengkuas putih dan daun sirih hijau terhadap *Candida albicans*.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel bebas adalah variabel yang dengan sengaja diubah-ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung.

Variabel bebas yang dimaksud adalah konsentrasi dari ekstrak kombinasi lengkuas putih dan daun sirih hijau. Konsentrasi yang digunakan antara ekstrak rimpang lengkuas putih dan daun sirih hijau yaitu perbandingan (1:2), (1:1), (2:1), (0:1), dan (1:0).

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang diperoleh tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti secara tepat.

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah ekstrak rimpang lengkuas putih dan daun sirih hijau, jamur uji *Candida albicans*, sterilisasi, suhu inkubasi, kondisi laboratorium, media yang digunakan, metode penelitian.

Variabel terikat adalah pusat persoalan yang merupakan kriteria dalam suatu penelitian. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah diameter daya hambat dari obat kumur kombinasi ekstrak rimpang lengkuas putih dan daun sirih hijau terhadap *Candida albicans* dan mutu fisik sediaan gargarisma kombinasi ekstrak rimpang lengkuas putih dan daun sirih hijau.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun sirih dengan ciri-ciri berwarna hijau segar, berbau khas, tidak busuk, dan belum berubah warna dan rimpang lengkuas putih yang masih segar, berbau aromatik, utuh, tidak ada bagian yang termakan serangga atau busuk, warna permukaan coklat kemerahan, parut daun jelas, bekas patahan berserat pendek, dan berbutir-butir kasar.

Kedua, serbuk rimpang lengkuas putih dan daun sirih hijau yang dikeringkan menggunakan oven 50⁰C, setelah kering kemudian dibuat serbuk dan diayak dengan ayakan nomor 60 untuk daun sirih dan ayakan nomor 40 untuk lengkuas.

Ketiga, ekstraksi yang digunakan untuk pembuatan ekstrak adalah maserasi yaitu metode ekstraksi dengan perendaman simplisia atau serbuk simplisia menggunakan etanol 70% dengan perbandingan serbuk dan pelarut 1:10.

Keempat, kombinasi yang digunakan untuk pembuatan sediaan dibuat dengan lima perbandingan antara lengkuas putih dibanding daun sirih hijau yaitu perbandingan 1:2; 1:1; 2:1, 0:1, dan 1:0.

Kelima, larutan obat kumur dibuat dengan melarutkan ekstrak daun sirih dan lengkuas dengan propilenglikol, kemudian ditambahkan aquadest, menthol, etanol, Na-sakarin, dan aquadest sampai 100 ml.

Keenam, jamur uji dalam penelitian ini adalah jamur *Candida albicans* yang diperoleh dari laboratorium mikrobiologi Universitas Setia Budi.

Ketujuh, diameter daya hambat yang merupakan area atau zona jernih yang terbentuk disekitar antimikroba yang diujikan.

Kedelapan, metode uji aktivitas antifungi yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode sumuran. Metode ini dilakukan dengan membuat sumur pada media agar yang telah ditanami dengan mikroorganisme dan pada sumur tersebut diberi agen antifungi yang akan diuji.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat-alat gelas (gelas ukur, *beaker glass*, tabung reaksi, batang pengaduk, *erlenmayer*, corong, dll), autoclave, oven, bejana untuk ekstraksi, blender, botol semprot, kertas saring, kain flanel, jarum ose, *laminar air flow* (LAF), inkubator, mikropipet, pembakar (bunsen spiritus), *rotary evaporator*, pipet tetes, timbangan analitik, cawan petri, dan *waterbath*.

2. Bahan

2.1 Bahan sampel. Bahan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun sirih dan rimpang lengkuas putih yang diambil dari Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah.

2.2 Bahan lain yang dibutuhkan. Bahan kimia yang digunakan adalah etanol 70% sebagai pelarut untuk ekstraksi, gliserin, propilenglikol, Na-sakarín, menthol, etil asetat 60%, aqua destilata, spiritus, larutan NaCl (0,9%) fisiologis,, SGA, HCl 2N, glukosa, serbuk magensium, dan amil alkohol.

2.3 Jamur yang digunakan. Jamur uji yang digunakan pada penelitian ini adalah jamur *Candida albicans*.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Determinasi tanaman dilakukan untuk membuktikan dan menetapkan kebenaran sampel daun sirih dan rimpang lengkuas dengan mencocokkan ciri-ciri makroskopis dan mikroskopis dengan acuan buku, serta dibuktikan di Laboratorium Morfologi dan Sistematika Universitas Sebelas Maret, Surakarta.

2. Pengambilan bahan

Daun sirih hijau segar, berbau khas, tidak busuk, dan belum berubah warna diambil dari Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah.

Rimpang lengkuas putih yang masih segar, berbau aromatik, utuh, tidak ada bagian yang termakan serangga atau busuk, warna permukaan coklat kemerahan, parut daun jelas, bekas patahan berserat pendek, dan berbutir-butir kasar. diambil dari Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah.

3. Preparasi sampel

Sampel daun sirih dipilih yang masih segar dan sesuai dengan ciri-ciri yang tertulis diatas. Daun kemudian dilakukan sortasi basah, dibersihkan, dirajang, lalu dikeringkan dibawah sinar matahari secara tidak langsung sampai kering. Sortasi kering pada daun yang sudah kering lalu dihaluskan dengan cara diblender, kemudian diayak dengan pengayak nomor 40 hingga diperoleh serbuk halus yang homogen.

Sampel rimpang lengkuas yang masih segar dan tidak busuk disortasi basah lalu dicuci, diiris setebal 7-8 mm. Irisan lengkuas dikeringkan dalam alat pengering pada suhu 50⁰C dan selanjutnya rimpang yang telah kering digiling dan diayak dengan ukuran 60 mesh. (DepKes RI 2010)

Simplisia dan ekstrak tanaman harus memenuhi beberapa persyaratan, anantara lain :

3.1. Penetapan kadar air. Menggunakan metode Sterling bidwel. Labu 500 ml dihubungkan dengan pendingin air balik melalui alat penampung yang dilengkapi dengan tabung penerima 5 ml yang berskala 0,1 ml. Panaskan menggunakan pemanas listrik yang suhunya dapat diatur atau penangas minyak. Bagian atas labu tabung penyambung sebaiknya dibungkus dengan asbes.

3.2. Pereaksi. Toluene jenuh air. Kocok sejumlah toluene dengan sedikit air, biarkan memisah dan buang lapisan air.

3.3. Prosedur. Timbang bahan yang diperkirakan mengandung kadar air, masukkan dalam labu untuk zat yang dapat menyebabkan gejolak mendadak saat mendidih tambahkan batu didih secukupnya. Masukkan lebih kurang 200 ml toluene jenuh air ke dalam labu, pasang rangkaian alat. Panaskan labu hati-hati

selama 15 menit. Setelah toluen mulai mendidih, atur penyulingan dengan kecepatan lebih kurang 2 tetes tiap detik, hingga sebagian besar air tersuling, kemudian naikan kecepatan penyulingan hingga 4 tetes tiap detik. Baca volume air setelah air dan toluen memisah sempurna (DepKes RI 2010).

4. Pembuatan ekstrak etanol daun sirih dan lengkuas

Buat ekstrak dari serbuk simplisia dengan cara maserasi menggunakan pelarut yang sesuai. Gunakan pelarut yang dapat menyari sebagian besar metabolit sekunder yang terkandung dalam serbuk simplisia. Jika tidak dinyatakan lain gunakan etanol 70%.

Pembuatan ekstrak etanol rimpang lengkuas dan daun sirih hijau dilakukan dengan metode maserasi menggunakan cairan penyari etanol 70%. Masukkan simplisia kedalam maserator kemudian tambahkan pelarut etanol 70% dengan perbandingan 1:10. Simplisia direndam selama 5 hari dan dilakukan penggojogan sesering mungkin. Perendaman 5 hari hasil ekstraksi di saring dengan kain flanel serta ditampung dalam wadah. Ekstrak cair kemudian dipekatkan dengan rotary evaporator sampai mendapat ekstrak kental (Sentat & Rizki, 2015).

4.1. Pengujian fitokimia.

4.1.1 Skrining fitokimia alkaloid. Ekstrak etanol dibasakan dengan larutan ammonia 10%, larutan basa diekstrasikan dengan kloroform, ekstrak kloroform diasamkan dengan HCl 1N, kemudian asam dipisahkan dengan filtrat diuji dengan pereaksi dragendroff, endapan putih atau kuning menyatakan adanya alkaloid (Depkes 1978).

4.1.2 Skrining fitokimia flavonoid. Ekstrak etanol dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi butiran logam Mg dan larutan HCl 2N, campuran ini dipanaskan selama 5-10 menit, setelah dingin dan disaring, dalam filtrat ditambahkan amil alkohol, dikocok kuat, warna merah atau jingga pada lapisan amil alkohol menunjukkan adanya flavonoid (Depkes 1978).

4.1.3 Skrining fitokimia tanin. Sejumlah ekstrak ditambah 20 ml air panas kemudian dididihkan selama 15 menit, setelah dingin disaring. Sebanyak 5 ml filtrat dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan pereaksi larutan

besi (III) klorida 1%. Jika tanin positif maka akan terbentuk warna hijau violet setelah direaksikan dengan larutan besi (III) klorida 1% (Depkes 1995).

4.1.4 Skrining fitokimia terpenoid dan steroid. Uji skrining senyawa golongan terpenoid dan steroid dilakukan dengan dilarutkan bahan uji dengan 0,5 ml kloroform, kemudian ditambahkan anhidrat asetat sebanyak sebanyak 5 tetes adan asam sulfat pekat 5 tetes melalui dinding. Steroid memberikan warna biru atau hijau, sedangkan triterpenoid memberikan warna merah jingga atau coklat kemerahan (Setyowati *et al.* 2014).

4.1.5 Skrining fitokimia saponin. Sejumlah tertentu ekstrak ditambah dengan air panas 10 ml, didinginkan lalu dikocok selama 10 detik. Kemudian didiamkan selama 10 menit. Saponin positif apabila muncul buih yang tinggi 1-10 cm. Pada penambahan satu tetes asam klorida 2N buih tidak hilang (Robinson 1996).

4.1.6 Skrining fitokimia minyak atsiri. Identifikasi secara kromatografi lapis tipis (KLT) dilakukan untuk mengetahui isi kandungan kimia dan menetapkan kebenaran yang terdapat pada minyak essensial rimpang lengkuas dan dan sirih hijau. Campuran yang akan dipisahkan berupa larutan ditotolkan pada pelat bercak. Setelah pelat ditotolkan, dimasukkan ke dalam bejana kromatografi tertutup. Plat KLT yang mengandung silika gel GF254 dengan ukuran 3 X 8 cm disiapkan, kemudian sampel ditotolkan 1 cm dari ujung plat dengan menggunakan pipet kapiler. Plat KLT dibiarkan sesaat, kemudian dimasukkan ke dalam bejana KLT yang sudah jenuh dengan uap pelarut. Pelarut yang digunakan adalah toluen : etil asetat (93: 7 v/v). Plat KLT kemudian disemprot dengan vanilin asam sulfat. Plat KLT selanjutnya diamati noda-noda yang timbul setelah dipanaskan dalam oven pada suhu 110 °C selama 3 menit (Wagner H 1984).

4.2 Uji bebas etanol. Sebelum uji daya antijamur terlebih dahulu dilakukan uji bebas etanol untuk meyakinkan bahwa ekstrak sudah tidak mengandung etanol. Uji bebas etanol dilakukan agar tidak terjadi kesalahan apakah jamur mati atau terhambat karena kandungan kimia dari ekstrak atau dari etanol yang masih ada sewaktu proses penyarian. Uji bebas etanol dilakukan

dengan cara esterifikasi etanol, ekstrak ditambah asam asetat dan asam sulfat kemudian dipanaskan bila tidak ada bau ester berarti sudah tidak ada etanol (Depkes RI 1987).

5. Pembuatan medium untuk pertumbuhan jamur uji

Media yang digunakan di dalam penelitian ini terdiri atas media Sabouraud Glukosa Agar (SGA). Menimbang SGA seberat 65 gram, dilarutkan ke dalam aquadest sebanyak 1000 ml dipanaskan sampai larut sempurna, ditambahkan kloramphenicol 200mg. Larutan SGA dipindahkan ke dalam tabung masing-masing 10 ml, ditutup dengan kapas kemudian disterilkan dengan autoclave pada suhu 121⁰ C selama 1 jam. (Syahruramadhan.2016).

6. Pembuatan suspensi jamur uji

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

Beberapa ose biakan *Candida albicans* dimasukkan kedalam tabung reaksi yang berisi 10 ml SGC, campuran dikocok sampai homogen dan di dapat kekeruhan sesuai dengan standart Mc Farland 0,5. Tujuan dilakukan standaisasi dengan Mc Farland yaitu untuk mengetahui jumlah jamur yang digunakan selama penelitian sama dan untuk mengurangi kepadatan jamur saat digunakan dalam pengujian.

7. Identifikasi *Candida albicans*

7.1. Identifikasi jamur dengan cawan gores. Identifikasi *Candida albicans* dari biakan murni ditanam di media SGA yang diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 48 jam . Hasil ditunjukkan dengan koloni lunak berwarna krem, yang berbau seperti ragi.

7.2. Identifikasi mikroskopis. Pada pemeriksaan mikroskopis menggunakan pewarnaan *lactopenol cotton blue* berfungsi untuk memberikan warna biru pada jamur, dengan cara pengambilan 1 ose pada stok *Candida albicans* diletakkan pada *object glass*, kemudian ditetesi 1 tetes *lactopenol cotton blue* dan ditutupi *cover glass*, kemudian diamati dibawah mikroskop. Jamur

9. Evaluasi mutu fisik dan stabilitas

Evaluasi mutu fisik dan stabilitas yang perlu dilakukan pada sediaan obat kumur :

9.1. Organoleptis. Evaluasi sediaan kumur dilakukan dengan mengamati dari segi rasa, bentuk, warna, aroma dan kejernihan. Pemeriksaan ini dilakukan pada suhu kamar (15 – 30 °C) selama 6 minggu dan diambil data pengujian pada minggu pertama, minggu ketiga, dan minggu keenam untuk melihat kestabilan sediaan (DepKes RI, 1995; Rahim *et al.*, 2011; Rahim *et al.*, 2016).

9.2. Viskositas. Pengukuran viskositas sediaan dilakukan dengan menggunakan viskometer ostwald. Isi tabung dengan sejumlah tertentu sampel (suhu diatur pada $20,0^{\circ} \pm 0,1^{\circ} \text{C}$) sebagaimana dinyatakan oleh pabrik. Meniskus cairan dalam tabung kapiler diatur hingga garis graduasi teratas dengan bantuan tekanan atau pengisapan. Buka kedua tabung pengisi dan tabung kapiler agar cairan dapat mengalir bebas ke dalam wadah melawan tekanan atmosfer. Waktu yang diperlukan cairan untuk mengalir dari batas atas hingga batas bawah dalam tabung kapiler dicatat (DepKes RI, 1995).

$$\eta_1 = t_1 \cdot \rho_1$$

$$\eta_2 = t_2 \cdot \rho_2$$

dimana

η_1 = Viskositas cairan sampel (sentipoise (cP));

η_2 = Viskositas cairan pembanding (sentipoise (cP));

ρ_1 = Massa Jenis dalam cairan sampel (gram/mL);

ρ_2 = Massa Jenis dalam cairan pembanding (gram/mL);

t_1 = Waktu aliran cairan sampel (detik); dan

t_2 = Waktu aliran cairan pembanding (detik).

9.3. Pemeriksaan pH. Pemeriksaan ini dilakukan menggunakan alat pH meter. Alat ini dikalibrasi terlebih dahulu menggunakan larutan dapar pH 4 dan pH 7. Elektroda dibilas dengan air suling dan dikeringkan. Pengukuran pH obat kumur dilakukan dengan cara elektroda dicelupkan dalam wadah tersebut, angka

yang ditunjukkan pada pH meter merupakan nilai pH ekstrak tersebut (DepKes RI, 1995; Rahim *et al.*, 2011).

10. Pengujian aktifitas antifungi berdasarkan luas zona hambat dengan metode sumuran

Prinsip kerja metode difusi adalah terdifusinya senyawa antimikroba (misalnya antibiotik) ke dalam media padat di mana mikroba uji (misalnya bakteri patogen) telah diinokulasikan. Metode difusi dapat dilakukan secara paper disk dan secara sumuran.

Metode difusi secara sumuran dilakukan dengan membuat sumuran dengan diameter tertentu pada media agar yang telah ditanami mikroba uji. Sumuran dibuat tegak lurus terhadap permukaan media. Antibiotik diinokulasikan ke dalam sumuran ini dan diinkubasikan, setelah itu hasilnya dibaca seperti pada difusi secara paper disk. Luasnya zona jernih merupakan petunjuk kepekaan mikroba terhadap antibiotik. Selain itu, luasnya zona jernih juga berkaitan dengan kecepatan berdifusi antibiotik dalam media (Lay, 1994; Jawetz dkk, 1986).

Sediaan ekstrak dari lengkuas putih dan daun sirih hijau diujikan aktivitasnya terhadap *Candida albicans* menggunakan metode difusi sumuran. Jamur uji diinokulasi pada media SGA 30 ml yang berada dalam cawan petri yang sudah memadat menggunakan kapas lidi steril. Kapas lidi steril diusapkan pada media secara aseptis kemudian siamkan selama 10 menit dan buat lubang sumuran menggunakan *boorprop*.

11. Penentuan sifat kombinasi dengan metode pita kertas

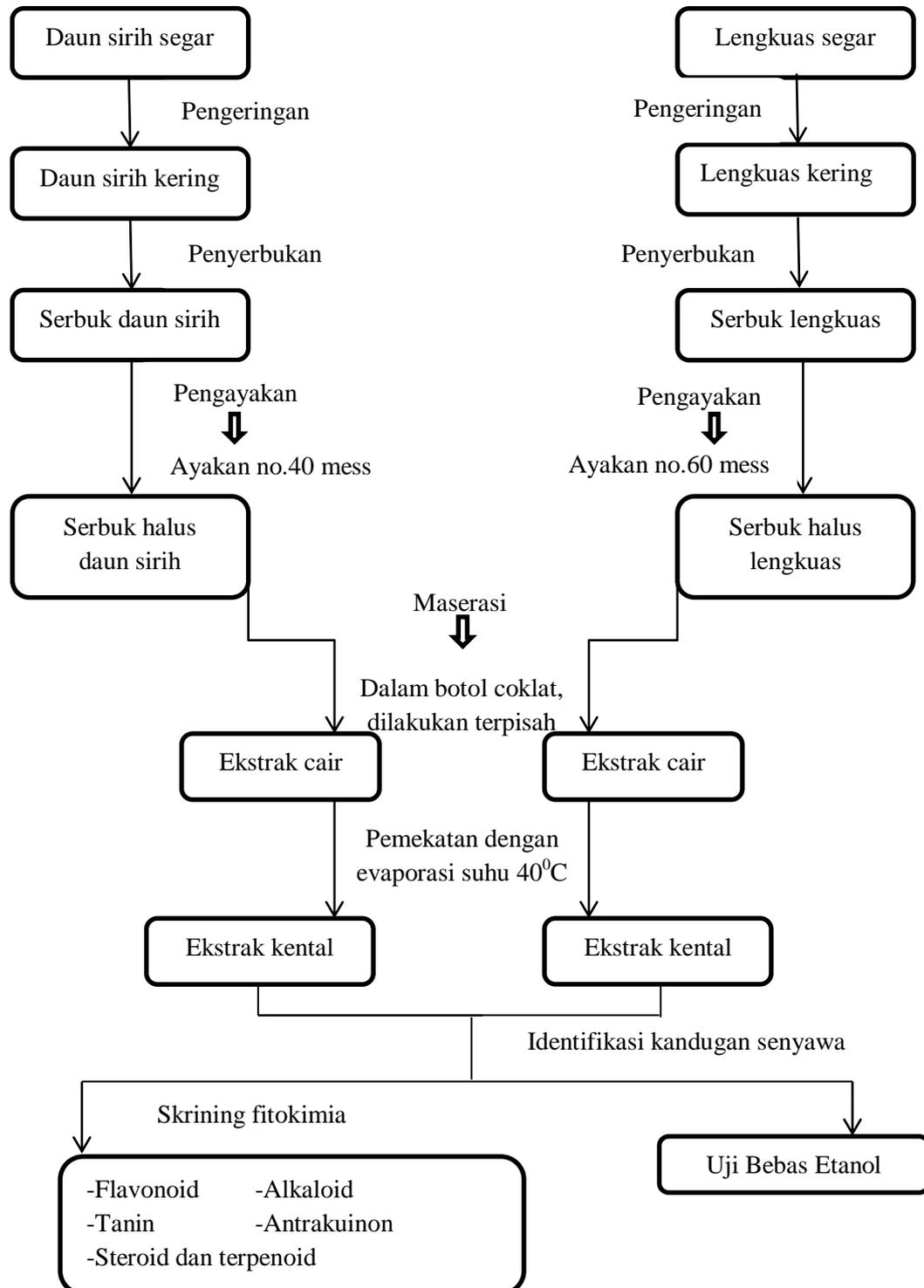
Sifat interaksi yang terjadi pada metode pita kertas ditentukan dengan melihat secara visual pola yang terjadi pada kombinasi ekstrak uji dengan antibiotik yang dicelupkan pada pita kertas kemudian diletakkan diatas media agar yang telah dicampurkan dengan suspensi bakteri pada cawan petri. Kemudian cawan petri ini diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Pola yang menunjukkan kombinasi aditif/indifferent dilihat dari 2 zona hambatan masing-masing obat yang berdiri sendiri. Kombinasi sinergis dilihat oleh adanya peningkatan atau penghubung antara atau dekat 2 zona hambatan. Sedangkan

kombinasi antagonis dapat dilihat dari potongan atau pengecilan kedua zona hambatan (Lorian 2005).

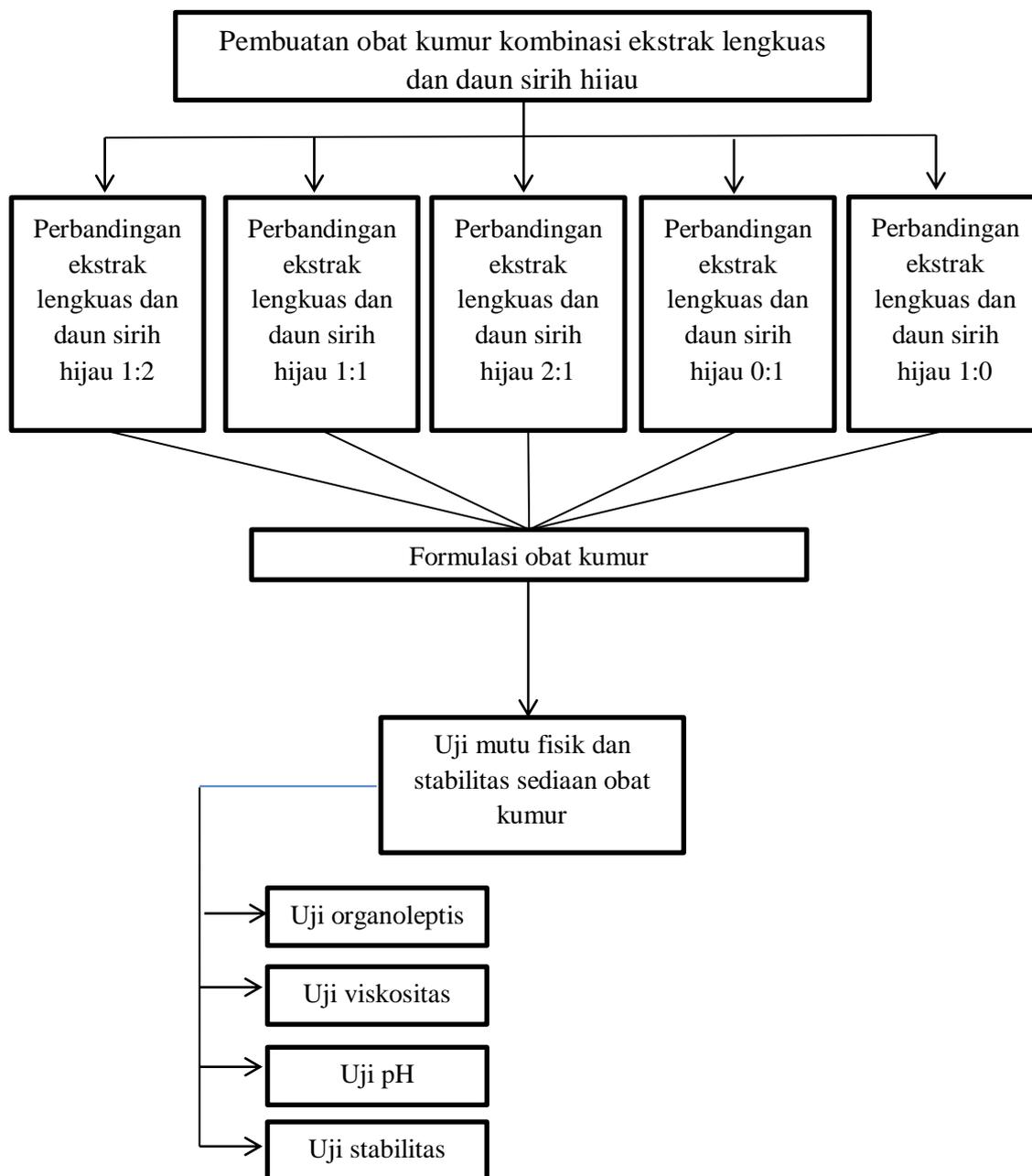
12. Analisa hasil pengujian aktifitas antifungi

Data uji antifungi adalah data yang didapatkan dari hasil pengukuran zona hambat yaitu bagian media jernih yang berada disekeliling sumuran obat kumur kombinasi ekstrak lengkuas dan daun sirih hijau. Data yang didapatkan tersebut kemudian akan dianalisis secara statistik dengan uji normalitas *One-Sample Kolmogorov Smirnov* dengan tujuan melihat normalitas distribusi data dan uji homogenitas yang bertujuan untuk homogenitas dari data aktifitas antifungi. Jika data aktifitas bervariasi maka dilanjutkan menggunakan uji *Independent T-test* untuk melihat data aktifitas antifungi antar konsentrasi terdapat perbedaan yang bermakna atau tidak. Jika data yang didapatkan menunjukkan ketidaknormalan maka dapat digunakan statistik menggunakan uji *Kruskal-Wallis*.

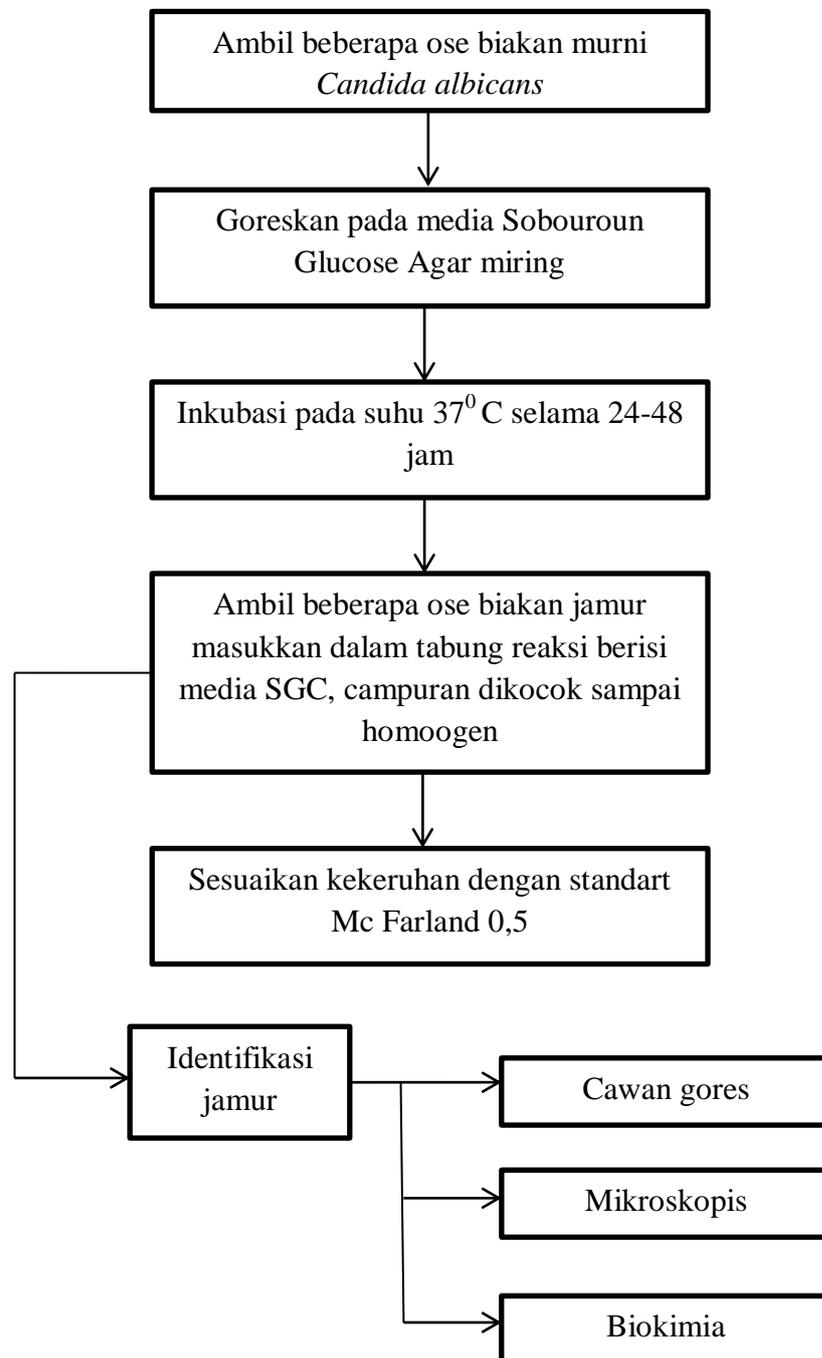
E. Alur Penelitian



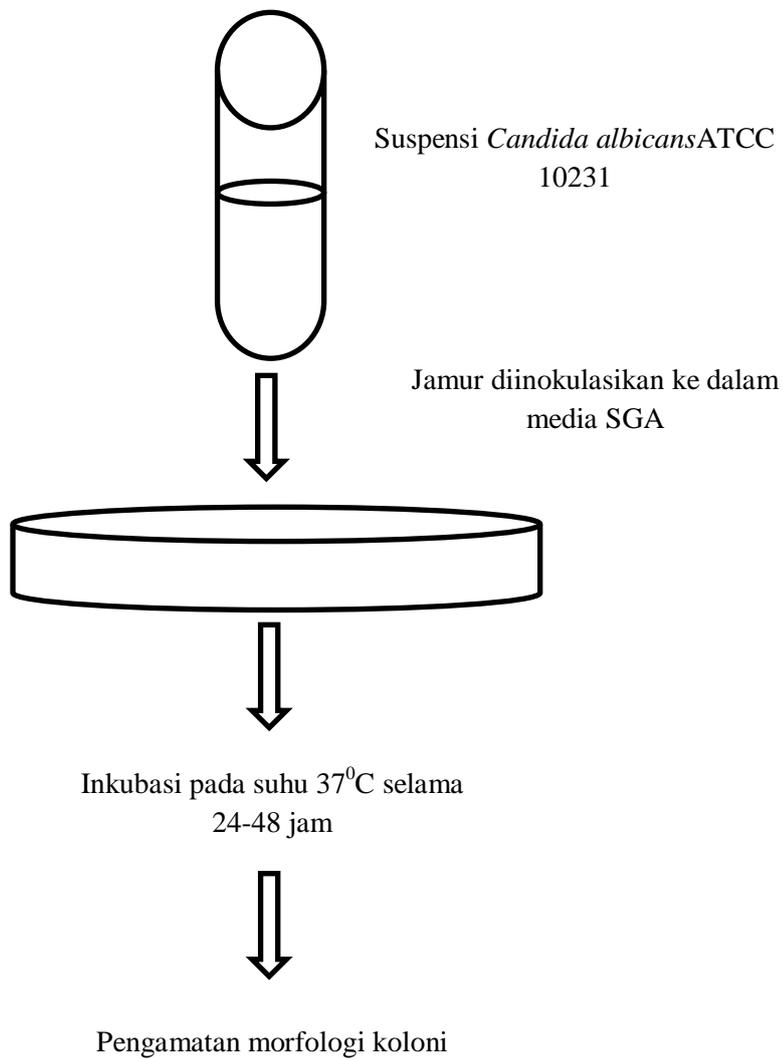
Gambar 2. Alur pembuatan simplisia sampai ekstrak kental



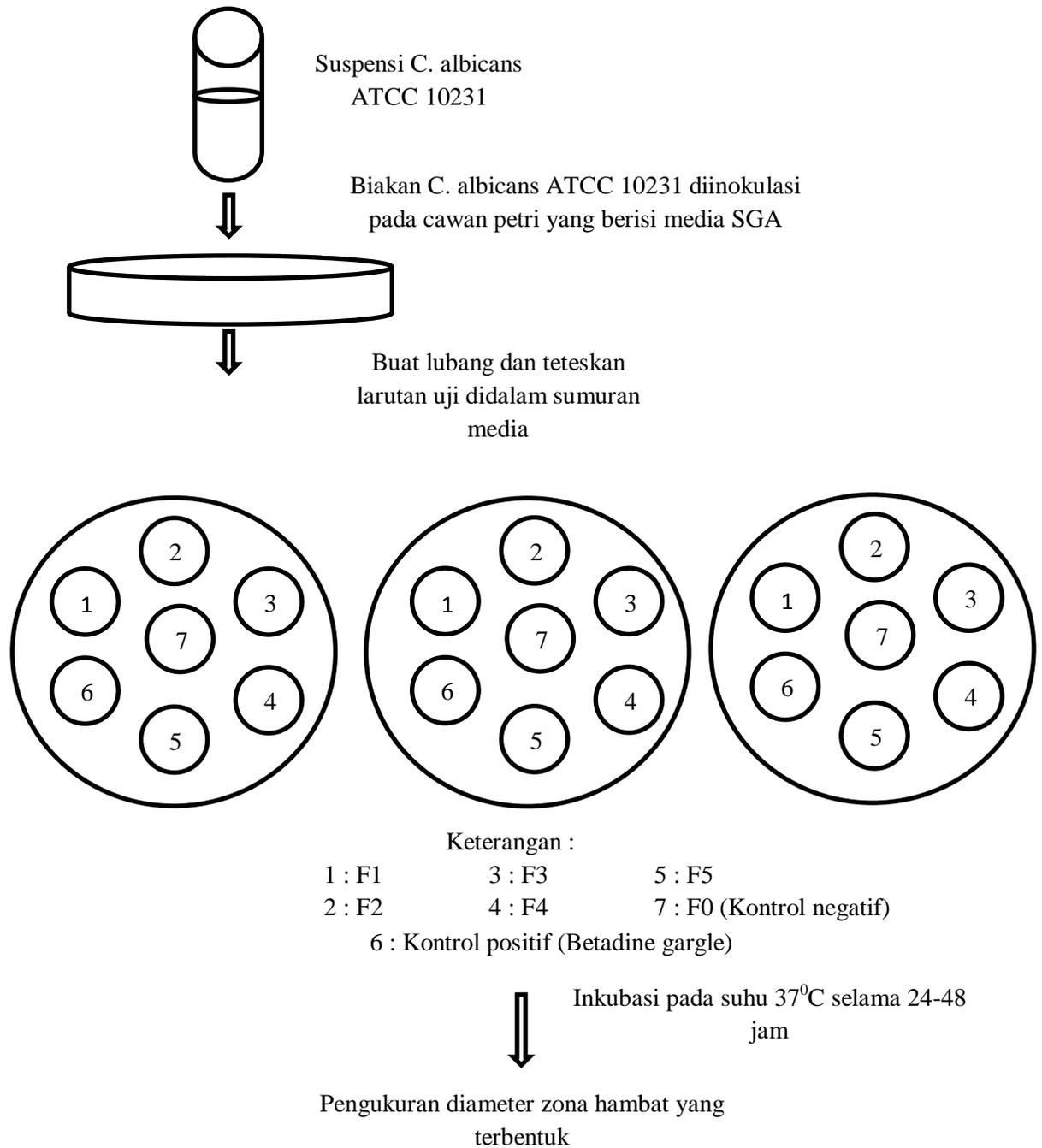
Gambar 3. Bagan alir formulasi sediaan obat kumur dan pengujian mutu fisik dan stabilitas



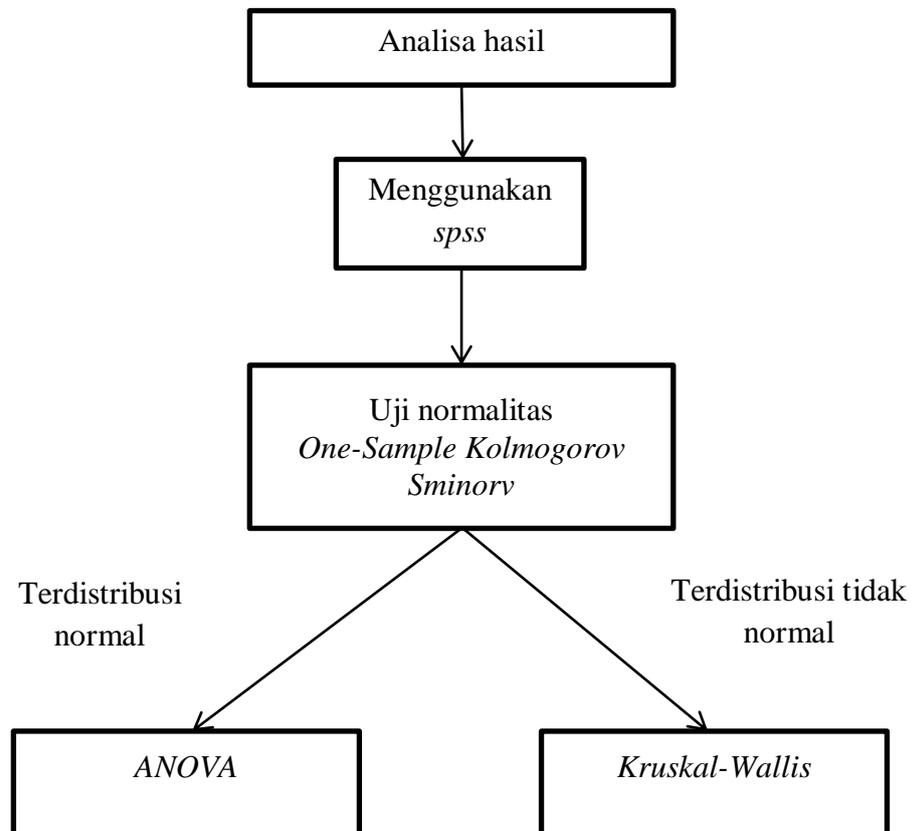
Gambar 4. Bagan alir pembuatan suspensi jamur uji dan identifikasi *Candida albicans*



Gambar 5. Skema identifikasi jamur secara makroskopis



Gambar 6. Skema pengujian antifungi dengan metode sumuran



Gambar 7. Analisis data hasil pengujian aktifitas antifungi obat kumur