

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Populasi dan Sampel**

##### **1. Populasi**

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun senduduk bulu (*Clidemia hirta* [L.] D. Don) yang diperoleh dari desa Ndilangit, Kelurahan Pancol, Kabupaten Magetan, Jawa Timur pada bulan Februari 2019.

##### **2. Sampel**

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah daun senduduk bulu yang diambil secara acak dengan memilih daun yang berwarna hijau, tidak terlalu tua juga tidak terlalu muda, masih segar.

#### **B. Variabel penelitian**

##### **1. Identifikasi variabel utama**

Variabel utama pertama dalam penelitian ini adalah fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari ekstrak etanol 96% daun senduduk bulu.

Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah aktivitas antijamur ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air terhadap *Candida albicans* ATCC 10231.

##### **2. Klasifikasi variabel utama**

Variabel utama yang telah diidentifikasi dapat diklasifikasikan ke dalam berbagai macam variabel yaitu variabel bebas, variabel kendali dan variabel tergantung.

Variabel bebas yang dimaksud dalam penelitian ini adalah variabel yang sengaja di ubah-ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung.

Variabel kendali merupakan variabel yang mempengaruhi variabel tergantung sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang diperoleh tidak tersebar dan dapat diulang oleh penelitian lain secara tepat.

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air dari ekstrak etanol daun senduduk bulu dalam berbagai konsentrasi.

Variabel kendali dalam penelitian ini adalah kemurnian jamur uji *Candida albicans* ATCC 10231, kondisi laboratorium (meliputi inkas, alat dan bahan yang digunakan harus steril), media yang digunakan dalam penelitian ini.

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah aktivitas antibakteri yang dapat dilihat dari pertumbuhan *Candida albicans* ATCC 10231 pada media uji.

### **3. Definisi operasional variabel utama**

Pertama, daun senduduk bulu adalah bagian dari tanaman senduduk bulu yang berwarna hijau, tidak terlalu tua juga tidak terlalu muda, masih segar yang diambil dari desa Ndilangit, Kelurahan Pancol, Kabupaten Magetan, Jawa Timur.

Kedua, serbuk daun senduduk bulu adalah daun senduduk bulu yang diambil kemudian dicuci pada air mengalir guna membersihkan kotoran yang masih menempel setelah itu dikeringkan dengan di oven selama 3 hari, setelah kering dibuat serbuk dan diayak dengan ayakan nomor 40.

Ketiga, ekstrak etanol daun senduduk bulu adalah serbuk daun senduduk bulu yang diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 96% kemudian diuapkan pelarutnya.

Keempat, fraksi *n*-heksana adalah ekstrak etanol 96% daun senduduk bulu yang ditraksinasi dengan pelarut *n*-heksana sebagai pelarut non polar.

Kelima, fraksi etil asetat adalah residu fraksi *n*-heksan daun senduduk bulu yang difraksi dengan menggunakan etil asetat sebagai pelarut semi polar.

Keenam, fraksi air dari daun senduduk bulu adalah residu dari fraksi etil asetat yang difraksi dengan menggunakan air sebagai pelarut polar.

Ketujuh, jamur uji dalam penelitian ini adalah *Candida albicans* ATCC 10231 yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi Surakarta.

Kedelapan, uji aktivitas antijamur adalah uji dengan menggunakan metode dilusi dan difusi. Metode dilusi berupa satu seri pengenceran 40 mg/ml, 20 mg/ml, 10 mg/ml, 5 mg/ml, 2,5 mg/ml, 1,25 mg/ml, 0,625 mg/ml, 0,312 mg/ml, 0,156 mg/ml, dan 0,078 mg/ml serta kontrol positif (+) dan kontrol negatif (-).

Kesembilan, KHM (konsentrasi hambat minimum) adalah konsentrasi terendah sediaan yang dapat menghambat pertumbuhan mikroba.

Kesepuluh, KBM (Konsentrasi Bunuh Minimum) adalah konsentrasi terendah sediaan yang dapat membunuh mikroba dengan melihat mikroba pada medium pada goresan cawan petri.

### **C. Alat dan Bahan**

#### **1. Alat**

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah blender, timbangan analitik, oven, ayakan nomor 40, inkas, ose platina, cawan petri, cawan porselin, erlenmeyer, tabung reaksi, gelas ukur, pipet tetes, pipet volume, corong pisah, corong kaca, kain flanel, kertas saring, wather bath, lampu spiritus, autoclave, *rotary evaporator*, inkubator, kaca objek, mikroskop, chamber dan lempeng KLT.

#### **2. Bahan**

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun senduduk bulu (*Clidemia hirta* [L.] D. Don), biakan jamur *Candida albicans* ATCC 10231 pelarut etanol 96%, pelarut *n*-heksan, pelarut etil aseat, pelaut air, media SGA, media SGC, dimetilsulfoksida (DMSO) 5%, ketokonazole 2%, asam nitrat, serbuk magnesium besi (III) klorida, asam sulfat pekat, alkohol, Mc Farland 0,5, spritus, larutan  $\text{FeCl}_3$  1%, kloroform, reagen Dragendroff dan Meyer.

### **D. Jalannya Penelitian**

#### **1. Determinasi tanaman senduduk bulu**

Tahap pertama penelitian adalah melakukan determinasi tanaman senduduk bulu yang bertujuan untuk menetapkan kebenaran tanaman yang berkaitan dengan ciri-ciri morfologi daun senduduk bulu pada pustaka yang dibuktikan di Universitas Setia Budi Surakarta.

#### **2. Pembuatan serbuk daun senduduk bulu**

Daun senduduk bulu yang akan diserbuk dikumpulkan, dicuci dengan air mengalir sampai bersih dari kotoran kemudian dilakukan pengeringan dengan oven pada suhu 40°C. Pengeringan ini bertujuan untuk mengurangi konsentrasi air sehingga dapat mencegah pertumbuhan jamur, bakteri, dan perubahan kimia yang dapat menurunkan mutu. Daun senduduk bulu yang sudah kering di buat serbuk

dengan blender kemudian di ayak dengan ayakan nomor 40 sehingga didapatkan serbuk daun senduduk bulu yang mempunyai derajat kehalusan yang homogen.

### 3. Pembuatan ekstrak daun senduduk bulu

Serbuk daun senduduk bulu diesktraksi dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Serbuk daun senduduk bulu ditimbang sebanyak 1000 gram. Perbandingan jumlah serbuk daun senduduk bulu dan pelarut etanol adalah 10:100 bagian. Maserasi dilakukan dengan cara 10 bagian serbuk di masukan ke dalam bejana, kemudian dituangi dengan 75 bagian cairan penyari, ditutup dan dibiarkan selama 5 hari terlindung dari cahaya sambil dilakukan pengadukan. Setelah 5 hari kemudian disaring dengan kain flanel lalu disaring kembali dengan kertas saring. Ampas ditambah cairan penyari hingga diperoleh seluruh sari sebanyak 100 bagian. Bejana ditutup, dibiarkan ditempat sejuk. terlindung dari cahaya selama 2 hari. Setelah 2 hari endapan dipisahkan dari filtrat. Ekstrak yang diperoleh diuapkan pelarutnya dengan vacum rotary evaporator pada suhu 50°C hingga di dapatkan ekstrak kental. Rendemen yang diperoleh adalah presentase bobot (b/b) antara rendemen dcngan bobot simplisia yang digunakan dalam penimbangan (Depkes RI 1986).

Persen rendemen diperoleh dari menimbang hasil dari ekstrak kemudian dibagi berat serbuk daun senduduk bulu dikalikan 100%.

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{bobot ekstrak (g)}}{\text{bobot sampel (g)}} \times 100\%$$

### 4. Penetapan kadar air

Penetapan kadar air dilakukan dengan menggunakan alat *Sterling bidwell*. Pereaksi digunakan toluen jenuh air, pembuatan toluen jenuh air dilakukan dengan cara toluen dikocok dengan sedikit air di dalam corong pisah, biarkan memisah lalu lapisan air dibuang (KEMENKES 2010). Metode ini dilakukan dengan cara tabung penerima dan pendingin dibersihkan dengan asam pencuci, lalu dibilas dengan air dan dikeringkan dalam lemari pengering. Serbuk ditimbang seksama yang diperkirakan mengandung 2 ml sampai 4 ml air, kemudian dimasukan ke dalam labu kering yang sebelumnya sudah dimasukan batu didih untuk mencegah letupan akibat panas. Toluene jenuh air sebanyak 200 ml

ditambahkan ke dalam labu, kemudian rangkaian alat dipasang. Labu dipanaskan hingga semua air terdestilasi atau air pada penampung tidak bertambah lagi. Volume air pada penampung dibaca setelah air dan toluen jenuh air terpisah sempurna. Kadar air dihitung dalam % v/b (Depkes RI 2000).

$$\text{Kadar air (\%)} = \frac{\text{Volume air (ml)}}{\text{Bobot awal serbuk (g)}} \times 100\%$$

Prinsip dari pengujian ini adalah mengeluarkan air menggunakan pelarut yang memiliki titik didih lebih tinggi daripada air, tidak campur dengan air, dan memiliki bobot jenis yang lebih rendah dari air (Rohman & Sumantri 2014).

## **5. Penetapan susut pengeringan**

Penetapan susut pengeringan serbuk dan ekstrak daun senduduk bulu dilakukan dengan menggunakan alat *Moisture balance*. Timbang sebanyak 2 gram serbuk dan ekstrak daun senduduk bulu, masukan ke dalam alat *Moisture balance*. Atur suhu alat 105°C selama 15 menit, dilakukan sebanyak 3 kali ditandai dengan hasil diperoleh bobot konstan. Kadar air dalam simplisia tidak lebih dari 10% (KEMENKES RI 2010).

## **6. Uji bebas etanolik**

Tes bebas etanolik dilakukan dengan cara mengeksterifikasi alkohol. Esterifikasi dengan menggunakan reagen H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat dan CH<sub>3</sub>COOH, kemudian dipanaskan. Bila tidak tercium bau eter (etil asetat) menandakan ekstrak tidak terdapat etanol.

## **7. Pengujian kandungan senyawa ekstrak dan serbuk daun senduduk bulu**

**7.1 Uji flavonoid.** Ekstrak dan serbuk dimasukan kedalam tabung reaksi kemudian dilarutkan dengan aquades kemudian dipanaskan hingga mendidih lalu di saring, filtrat digunakan sebagai larutan uji. Ditambahkan serbuk Mg, 1 ml HCL pekat dan 1 ml amil alkohol. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya larutan berwarna merah, kuning atau jingga pada lapisan amilalkohol (Nugrahani 2006).

**7.2 Uji saponin.** Ekstrak dan serbuk di masukkan kedalam tabung reaksi dan menambahkan 10 ml air panas, kemudian didinginkan dan dikocok kuat-kuat selama 10 menit. Hasil positif jika terdapat buih selama 10 menit setinggi 1-10 cm

pada penambahan 1 tetes HCL 2N buih tidak hilang menunjukan adanya saponin (Depkes RI 1980).

**7.3 Uji tanin.** Ekstrak dan serbuk dimasukan kedalam tabung reaksi dilarutkan dalam 5 ml aquadest lalu didihkan selama 5 menit. Dinginkan, kemudian tambahkan 5 tetes larutan  $\text{FeCl}_3$  1%. Adanya senyawa tanin ditandai dengan timbulnya warna biru tua dan hijau kehitaman (Yuningsih 2007).

**7.4 Uji steroid dan triterpenoid.** Ekstrak dan serbuk di masukan kedalam tabung reaksi, dilarutkan dalam 0,5 ml kloroform kemudian ditambahkan 0,5 ml asam asetat anhidrat. Ditambah 1-2  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat melalui dinding tabung. Apabila terbentuk warna hijau atau biru, maka ekstrak positif mengandung steroid. Sedangkan apabila terbentuk warna ungu-merah, maka ekstrak positif mengandung triterpenoid (Indrayani *et al.* 2006).

**7.5 Uji alkaloid.** Ekstrak dan sebuk dilarutkan kedalam 10 tetes asam sulfat 2N kemudian direaksikan menggunakan pereaksi alkaloid seperti Dragendroff dan Meyer. Sampel dinyatakan positif apabila terhentuk endapan merah sampai jingga pada pereaksi Drangendroff dan terbentuk endapan putih kekuningan pada pereaksi Meyer (Alamsyah & Kurniawan 2014).

## 8. Fraksinasi

Ekstrak etanol ditimbang sebanyak 10g kemudian di larutkan dengan sedikit etanol lalu ditambah dengan aquadest 75 ml. Selanjutnya dimasukkan di corong pisah dengan menambahkan pelarut *n*-heksan 75 ml untuk dilakukan fraksinasi, fraksi yang ada di atas (fraksi *n*-heksan) dipisahkan dengan fraksi yang bagian bawah (fraksi air). Fraksi *n*-heksan yang didapat kemudian dipekatkan dengan evaporator pada suhu  $50^\circ\text{C}$  lalu ditimbang.

Hasil sisa fraksinasi dengan *n*-heksan difraksinasi dengan pelarut etil asetat 75 ml dalam corong pisah. Filtrat yang dibawah (fraksi air) dipisahkan dengan filtrat yang bagian atas (fraksi etil asetat). Fraksi etil asetat yang didapat kemudian dipekatkan dengan evaporator pada suhu  $50^\circ\text{C}$  lalu ditimbang.

Filtrat sisa fraksinasi dengan etil asetat adalah fraksi air. Filtrat yang telah diperoleh kemudian dipekatkan dengan water bath sampai kental lalu ditimbang.

## 9. Sterilisasi

Sterilisasi inkas dilakukan dengan menyemprotkan alkohol, media yang digunakan disterilkan terlebih dahulu dengan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1,5 atm selama 15 menit. Alat-alat dari gelas yang ada ukurannya disterilkan dengan oven pada suhu 170-180°C selama 2 jam, sedangkan alat-alat seperti jarum Ose disterilkan dengan pemanasan api langsung.

## 10. Peremajaan biakan jamur *Candida albicans* ATCC 10231

*Candida albicans* ATCC 10231 diambil dari suatu biakan mumi sebanyak beberapa Ose, kemudian digoreskan pada media Sabouraud Glukosa Agar (SGA) miring pada tabung yang kemudian diinkubasi 24 jam pada suhu 37°C. Hasil inkubasi digunakan sebagai stock jamur uji *Candida albicans* ATCC 10231.

## 11. Pembuatan suspensi jamur *Candida albicans* ATCC 10231

Biakan *Candida albicans* ATCC 10231 yang telah diremajakan, diambil beberapa ose, kemudian disuspensikan ke dalam tabung reaksi yang berisi 10 ml media SGC, kemudian dihomogenkan dengan vortex. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Suspensi tersebut dibandingkan dengan kekeruhan standar Mc Farland 0,5 yang dianggap setara dengan  $1-5 \times 10^6$  cfu/ml.

## 12. Identifikasi jamur uji

**12.1 Identifikasi koloni pada media selektif.** *Candida albicans* dikembangkan pada media SGA pada suhu 37°C selama 24 jam atau suhu ruang akan tampak koloni berbentuk bulat, warna krem, diameter 1-2 mm, konsisten smooth, mengkilap, bau seperti ragi.

**12.2 Identifikasi mikroskopis.** Pengamatan secara mikroskopis dengan metode pewarnaan smear perbesaran sedang (100x) menggunakan cat laktofenol Cotton blue akan tampak sel ragi dengan bentuk lonjong.

**12.3 Identifikasi biokimia.** Media yang digunakan adalah *glucose broth*, *lactose broth*, *maltose broth*, dan *sucrose broth*. Media diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, diamati terbentuknya gas dan kemampuan memfermentasi. Pada media *glucose broth* dan *maltose broth* akan terbentuk gas pada tabung durham, terjadi fermentasi pada media *glucose broth*, *maltose broth* dan *sucrose broth*. Pada media *lactose broth* tidak terjadi fermentasi.

### 13. Pengujian antijamur daun senduduk bulu secara difusi

Pengujian aktivitas antijamur secara difusi dengan menggunakan suspensi jamur uji *Candida albicans* ATCC 10231 yang sudah disetarakan dengan Mc Farland 0,5. Suspensi kemudian dioleskan merata pada media SGA dengan menggunakan kapas lidi steril, selanjutnya diberi disk cakram yang telah ditetesi larutan uji yaitu ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air daun senduduk bulu dengan masing-masing volume penetesan 50  $\mu$ l menggunakan mikro pipet. Larutan uji ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air dibuat masing-masing 3 konsentrasi yaitu 40%, 20%, dan 10%. Kontrol positif yang digunakan adalah ketokonazole 2% dan menggunakan pelarut DMSO 5% sebagai kontrol negatif. Selanjutnya diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Zona bening pada daerah disk cakram diukur diameternya sebagai zona hambatnya.

### 14. Pengujian antijamur daun senduduk bulu secara dilusi

Metode dilusi menggunakan suspensi jamur yang telah di didapatkan kekeruhan yang sama dengan standar Mc farland 0,5 kemudian diencerkan dengan perbandingan 1:100 (CLSI 2002). Jumlah tabung yang akan digunakan adalah 12 tabung steril yang diletakan 1 deret. Masing-masing tabung tersebut mempunyai beberapa konsentrasi pengenceran yaitu 40 mg/ml, 20 mg/ml, 10 mg/ml, 5 mg/ml, 2,5 mg/ml, 1,25 mg/ml, 0,625 mg/ml, 0,312 mg/ml, 0,156 mg/ml, dan 0,078 mg/ml. Masukkan 0,5 ml media Sabouroud Glukosa Cair (SGC) kedalam tabung 3 sampai tabung 11. Tabung 1,2, dan 12 tidak diberi media SGC. Tabung 1 berlaku sebagai kontrol negatif diisi 1 ml larutan stok fraksi teraktif. Tabung 12 sebagai kontrol positif diisi suspensi jamur uji *Candida albicans* ATCC 10231 sebanyak 1 ml. Pada tabung 2 sampai 10 diisi suspensi jamur uji *Candida albicans* ATCC 10231 sebanyak 0,5 ml. Dilakukan pengenceran dengan cara tabung ketiga ditambah fraksi teraktif 0.5 ml, kemudian dari tabung ketiga dipipet 0,5 ml dan dimasukkan kedalam tabung keempat begitu seterusnya sampai tabung kesebelas yang terakhir kemudian dibuang 0,5 ml.



Seluruh tabung diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam lalu di amati kekeruhannya untuk menentukan KHM. KHM ditentukan dengan mengamati adanya kekeruhan pada seri pengenceran sejumlah tabung yang telah diinkubasi, dimana tabung dengan larutan jernih setelah tabung keruh terakhir merupakan KHM. Menentukan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dengan cara tabung media yang jernih diinokulasikan secara goresan pada media selektif untuk masing-masing jamur uji. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil kemudian diamati ada tidaknya koloni yang tumbuh pada permukaan media. KBM ditunjukan oleh konsentrasi terendah pada media SGA yang tidak menunjukkan koloni bakteri yang tumbuh.

### **15. Identifikasi golongan senyawa pada fraksi teraktif secara Kromatografi Lapis Tipis**

Fraksi teraktif dari ekstrak daun senduduk bulu dilarutkan dalam pelarut yang sesuai, kemudian ditotolkan menggunakan pipa kapiler pada jarak 1 cm dari sisi bawah lempeng KLT. Kertas saring diletakan di dalam chamber lalu dijenuhkan dengan fase gerak yang sesuai, ditandai dengan kertas saring terbasahi semuanya. Setelah totolan kering, lempeng KLT dimasukan ke dalam chamber kromatografi yang sudah dijenuhkan lalu dilakukan elusi sampai jarak tertentu. Lempeng KLT diangkat dan diangin-anginkan hingga kering, kemudian noda dideteksi dibawah sinar UV 254 nm atau 366 nm dengan pereaksi tertentu. Bercak yang terdeteksi kemudian dapat ditentukan harga Rf dan dapat dilihat penampakan warna yang terjadi.

**15.1 Flavonoid.** Identifikasi flavonoid dilakukan dengan menggunakan fase diam Silika gel GF 254. Fase gerak butanol : asam asetat : air (4 : 1 : 5) menggunakan pendeteksi Sitroborat. Hasil positif apabila terjadi fluoresensi kuning, kehujauan pada UV 366 nm dan pada UV 254 nm berwarna gelap (Harbone 1987). Pada hasil pengamatan setelah disemprot sitroborat menunjukan adanya fluoresensi kuning kehijauan menandakan adanya senyawa flavonoid.

**15.2 Steroid.** Identifikasi steroid dilakukan menggunakan KLT fase diam Silika gel GF 254, fase gerak kloroform : metanol (9: 1) dengan pereaksi semprot

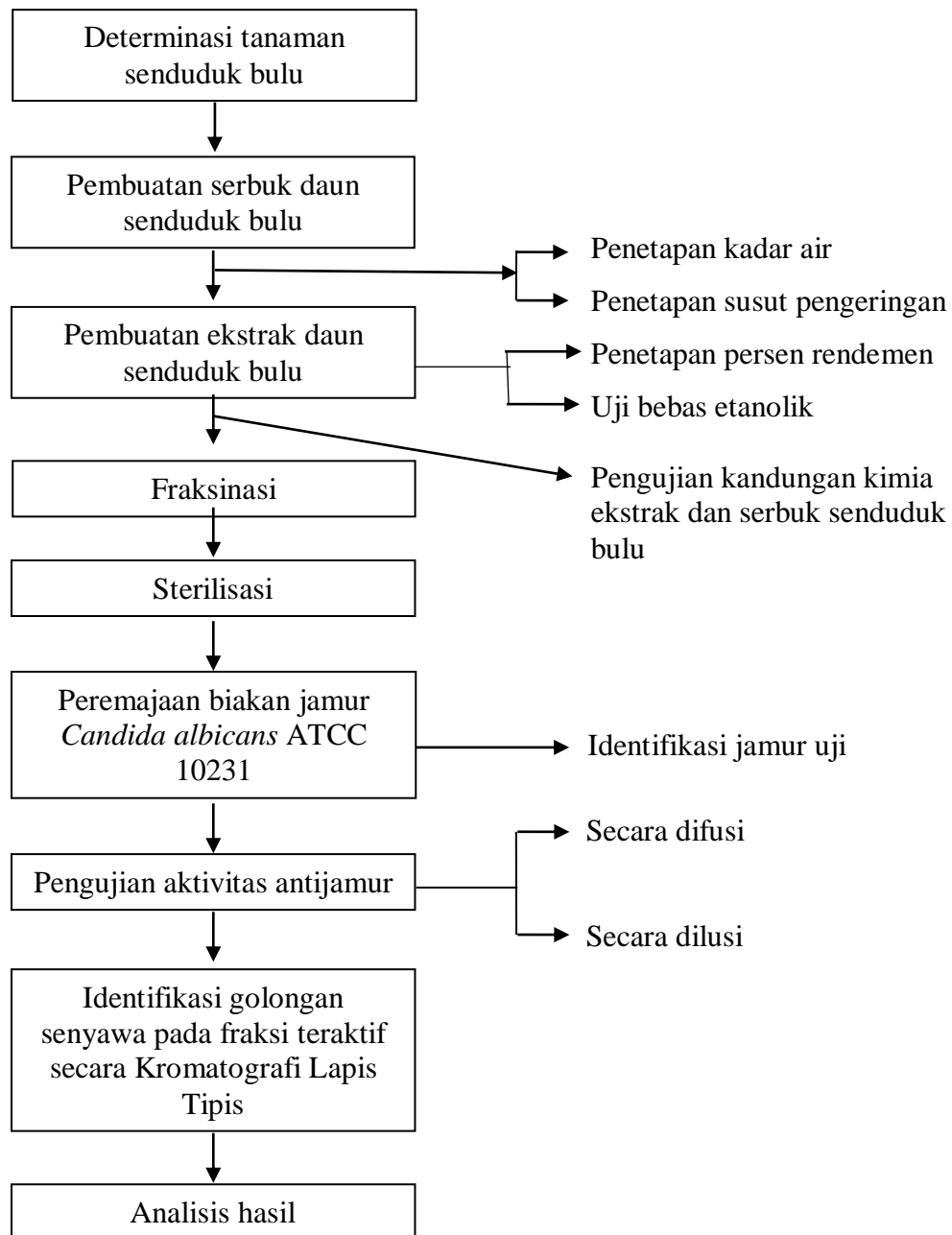
Lieberman Bourchardat (LB). Reaksi positif menunjukkan adanya noda berwarna hijau biru (Yuda *et al.* 2017).

**15.3 Tanin.** Identifikasi adanya senyawa tanin dilakukan menggunakan fase diam silika gel GF 254, fase gerak *n*-heksan : etil asetat (3:7). Pereaksi semprot yang digunakan FeCl 1% kemudian dideteksi di bawah sinar UV 366 nm akan terlihat berwarna hitam (Saputri 2014).

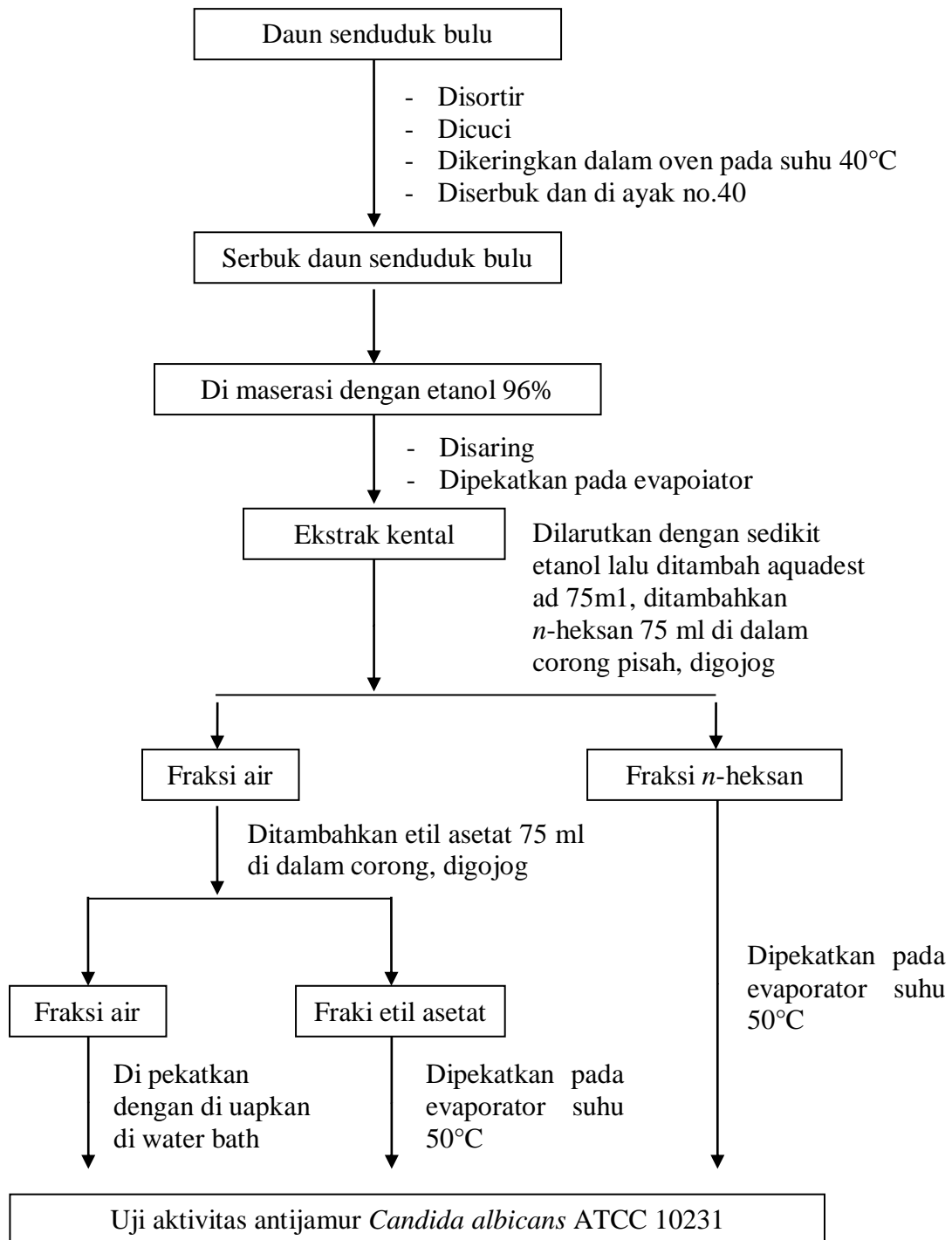
### **E. Analisis Hasil**

Data hasil penelitian aktivitas ekstrak dan fraksi dari daun senduduk bulu (*Clidemia hirta* [L.] D. Don) terhadap *Candida albicans* ATCC 10231 menggunakan metode difusi yang dinyatakan dengan nilai zona hamhat yang terbentuk. Hasil dianalisis dengan menggunakan program SPSS Analisis statistik yang dilakukan terlebih dahulu adalah melihat apakah ada perbedaan efektivitas bermakna dari masing-masing konsentrasi yang di analisis menggunakan metode Kolmogorov Smirnov. Hasil yang diperoleh apabila terdistribusi tidak normal ( $p < 0,05$ ) dilanjutkan dengan metode uji non parametik, sedangkan jika data terdistribusi normal ( $p > 0,05$ ) dilanjutkan dengan metode ANOVA *two way* dengan taraf kepercayaan 95%.

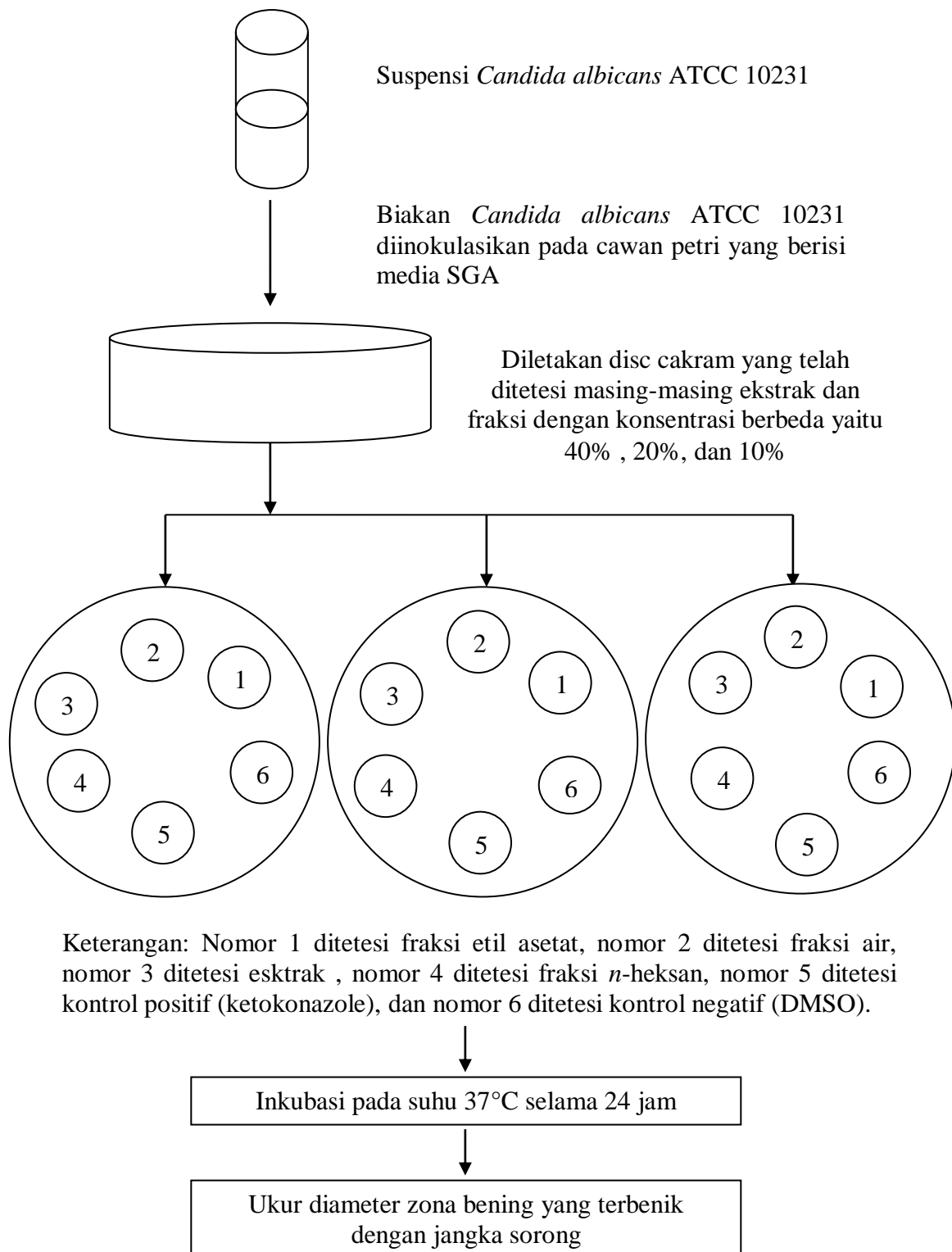
## F. Skema Penelitian



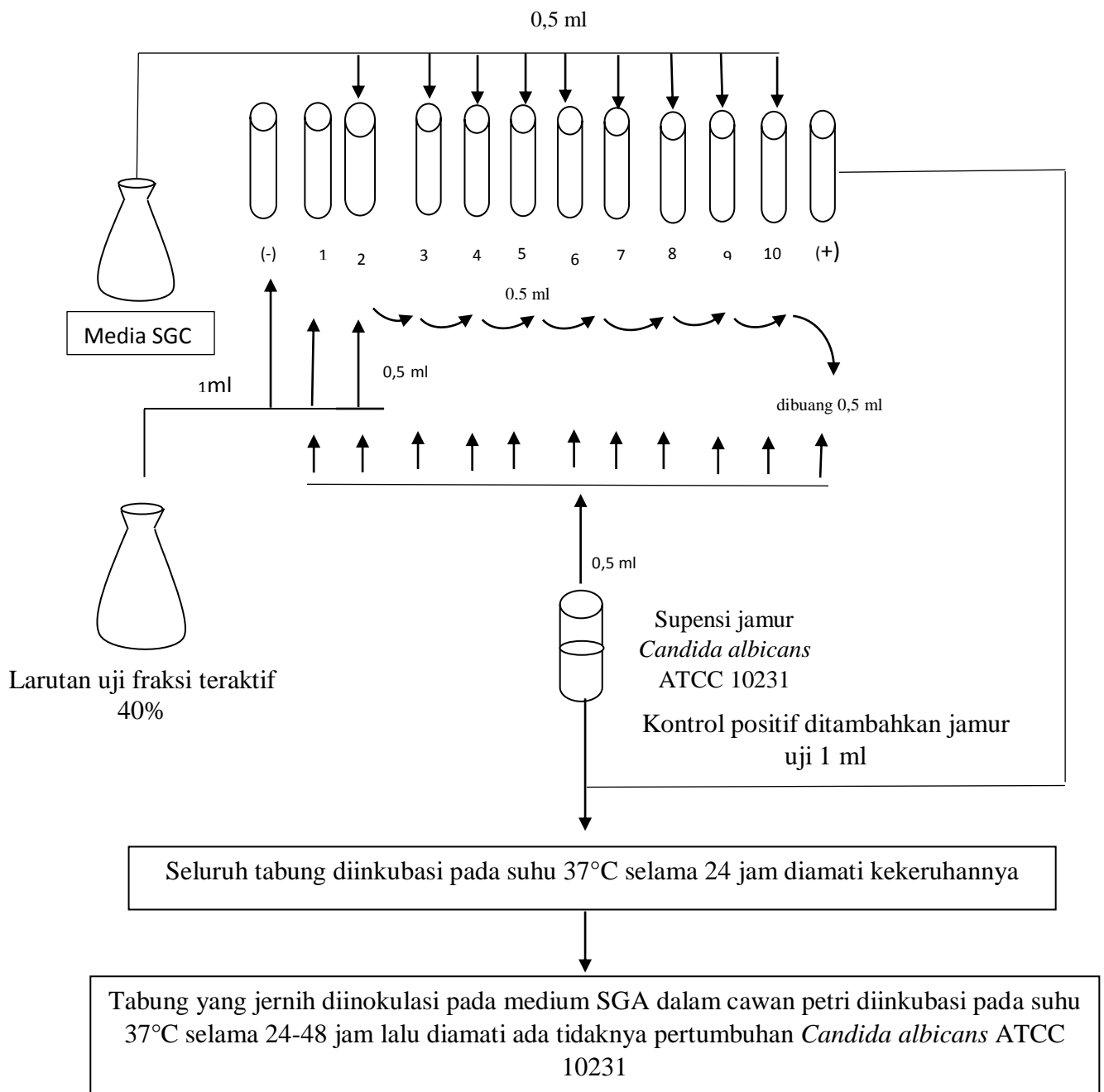
**Gambar 3.** Skema jalannya penelitian uji aktivitas antijamur ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan, etil asetat dan air dari daun senduduk bulu (*Clidemia hirta* [L.] D. Don) terhadap *Candida Albicans* ATCC 10231



**Gambar 4.** Skema pembuatan ekstrak etanol dan fraksi daun senduduk bulu (*Clidemia hirta* [L.] D. Don)



**Gambar 5.** Skema uji aktivitas antijamur ekstrak etanol dan fraksi daun daun senduduk bulu (*Clidemia hirta* [L.] D. Don) terhadap jamur *Candida albicans* ATCC 10231 secara difusi



**Gambar 6. Skema uji aktivitas antijamur fraksi daun daun senduduk bulu (*Clidemia hirta* [L.] D. Don) yang paling efektif terhadap jamur *Candida albicans* ATCC 10231 secara dilusi**