

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah bunga alamanda yang berasal dari Merapi Farma Herbal, kecamatan Pakem, kabupaten Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta.

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bunga alamanda yang diambil secara acak dan dipilih yang bersih segar, bunga alamanda dipanen saat bunga telah mekar, pengambilan dilakukan saat pagi hari, dari Merapi Farma Herbal, kecamatan Pakem, kabupaten Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama penelitian ini yang pertama adalah ekstrak etanol, fraksi petroleum eter, kloroform, dan air dari bunga alamanda.

Variabel utama kedua adalah uji aktivitas antijamur fraksi petroleum eter, kloroform, dan air dari ekstrak etanol bunga alamanda terhadap jamur *Candida albicans* ATCC 10231.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang digunakan telah diidentifikasi lebih dulu dapat diklasifikasikan ke dalam berbagai macam variabel yaitu variabel bebas, variabel terkendali, dan variabel tergantung.

Pengertian variabel bebas adalah variabel yang direncanakan untuk diteliti pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah fraksi petroleum eter, kloroform, dan air dari ekstrak bunga alamanda yang diuji antijamur dalam berbagai konsentrasi.

Pengertian variabel terkendali adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang diperoleh tidak tersebar dan dapat diulang oleh penelitian lain secara tepat. Variabel terkendali dari

penelitian ini adalah jamur uji *Candida albicans* ATCC 10231, waktu inkubasi, media, sterilisasi, dan kondisi laboratorium.

Pengertian variabel tergantung adalah titik pusat persoalan yang merupakan kriteria dalam penelitian ini. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah aktivitas antijamur fraksi petroleum eter, kloroform, dan air dari ekstrak bunga alamanda yang dapat dilihat dari diameter zona hambat, Konsentrasi Hambat minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM).

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, bunga alamanda adalah bunga alamanda yang diambil dari Merapi Farma Herbal, kecamatan Pakem, kabupaten Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta. Bunga alamanda diambil secara acak dan dipilih yang segar, bunga alamanda dipanen saat bunga telah mekar, pengambilan dilakukan saat pagi hari.

Kedua, serbuk bunga alamanda adalah bunga alamanda yang dikeringkan dalam oven 50°C, setelah itu diserbuk dengan cara diblender dan ayak dengan ayakan no mess 40.

Ketiga, ekstrak bunga alamanda adalah hasil ekstraksi bunga alamanda dengan penyari etanol 70% menggunakan maserasi kemudian dipekatkan dengan evaporator 40°C.

Keempat, fraksi petroleum eter adalah ekstrak bunga alamanda yang ditambah air kemudian difraksinasi dengan pelarut petroleum eter.

Kelima, fraksi kloroform adalah residu dari fraksinasi ekstrak bunga alamanda dengan petroleum eter yang kemudian difraksinasi dengan pelarut kloroform.

Keenam, fraksi air adalah residu dari fraksinasi ekstrak bunga alamanda dengan kloroform.

Ketujuh, *Candida albicans* adalah jamur *Candida albicans* ATCC 10231 yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Farmasi Universitas Setia budi Surakarta.

Kedelapan, uji aktivitas antijamur adalah metode difusi dan dilusi.

Kesembilan, metode difusi adalah metode difusi cakram untuk mengukur diameter zona hambat pertumbuhan jamur yang terbentuk. Konsentrasi uji difusi

menggunakan seri konsentrasi ekstrak dan fraksi yaitu 4; 2; 1%. Kontrol positif fluconazol dan kontrol negatif DMSO 5%.

Kesepuluh, metode dilusi adalah metode untuk menentukan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM). Seri konsentrasi fraksi teraktif yang digunakan pada metode dilusi adalah 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125%.

C. Bahan dan Alat

1. Bahan

1.1 Bahan utama. Bahan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bunga alamanda (*Allamanda cathartica L.*) yang berasal dari Merapi Farma Herbal, kecamatan Pakem, kabupaten Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta.

1.2 Bahan kimia. Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah petroleum eter, kloroform, etanol 70%, aquadest, DMSO 5%, etil asetat, metanol, HCl 2N, Mg, anhidrida asetat, asam sulfat pekat, anisaldehid asam sulfat, pereaksi Lieberman Bouchardat, FeCl₃ 1%, sitroborat, Dragendorff, Mayer, Fenol red, Lactofenol cotton blue dan fluconazole.

1.3 Medium. Medium yang digunakan dalam penelitian ini adalah medium SGA (*Sabourand glucose agar*) dan medium SGC (*Sabourand glucose cair*), medium glukosa, laktosa, maltosa, dan sukrosa.

1.4 Jamur uji. Jamur uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Candida albicans* ATCC 10231 yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Farmasi Universitas Setia budi Surakarta. Spesifikasi *Candida albicans* ATCC 10231 pada pengamatan makroskopis dalam medium agar miring bentuk koloni warna krem.

2. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi, pisau, oven, mesin giling, alat maserasi berupa botol mulut lebar warna coklat, gelas ukur, erlenmeyer, batang pengaduk, tabung reaksi, penjepit tabung reaksi, rak tabung reaksi, *beaker glass*, corong pisah, kertas saring, dan evaporator.

Alat uji aktivitas antifungi yang digunakan adalah autoklaf, inkubator, kotak aseptis (inkas), jarum ose, tabung reaksi, penjepit tabung reaksi, rak tabung reaksi, cawan petri, lampu spiritus, korek api, *beaker glass*, kain lap, pipet ukur, dan sputif.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Tahap pertama penelitian ini adalah menetapkan kebenaran sampel bunga alamanda berdasarkan ciri-ciri morfologi yang ada dan dilakukan di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional.

2. Penyiapan bahan

Bunga alamanda (*Allamanda cathartica* L.) diambil dari Merapi Farma Herbal, kecamatan Pakem, kabupaten Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta. Bunga yang diambil adalah bunga yang masih segar. Bunga yang diambil dicuci dengan air untuk menghilangkan kotoran atau debu yang menempel.

3. Pembuatan serbuk bunga alamanda

Bunga alamanda dicuci dengan air mengalir, kemudian dipotong-potong sedemikian rupa, lalu dikeringkan dalam oven 50°C, setelah itu diserbuk dengan cara diblender dan ayak dengan ayakan mess 40.

4. Penetapan kadar air serbuk bunga alamanda

Penetapan kadar air serbuk bunga alamanda dilakukan menggunakan alat *Sterling-Bidwell*. Metode ini dilakukan dengan cara menimbang serbuk bunga alamanda sebanyak 20 gram dimasukkan dalam labu destilasi dan ditambahkan pelarut toluen jenuh air 200 ml sampai serbuk terendam kemudian memasang alat *Sterling-Bidwell*. Labu dipanaskan dengan api kecil secara hati-hati setelah mendidih api dibesarkan. Pemanasan dihentikan jika pada tetesan sudah tidak ada air yang menetes, kemudian diukur kadar airnya dengan membaca volume pada skala alat *Sterling-Bidwell*. Kadar air dihitung dalam % v/b. Konsentrasi kadar air pada serbuk simplia akan memenuhi syarat apabila tidak lebih dari 10% (Depkes 2008).

5. Pembuatan ekstrak etanol serbuk bunga alamanda

Ekstrak bunga alamanda (*Allamanda cathartica* L.) dibuat dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70% dengan perbandingan 1:10. Serbuk bunga alamanda sebanyak 700 gram direndam dalam 7000 ml etanol 70% ke dalam botol maserasi. Botol maserasi kemudian ditutup rapat dan rendam selama 6 jam pertama sambil sekali-sekali diaduk, kemudian diamkan selama 18 jam. Rendaman tersebut disaring dengan menggunakan kain flanel, ulangi proses penyarian sebanyak satu kali menggunakan pelarut etanol 70% dengan jumlah volume pelarut sebanyak 3500 ml. Maserat tersebut dikumpulkan menjadi satu, kemudian diuapkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40°C sehingga pelarut akan menguap dan diperoleh ekstrak pekat (Kemenkes 2013). Skema pembuatan ekstrak etanol bunga alamanda dapat dilihat pada gambar 3.

6. Penetapan persen rendemen

Penetapan persen rendemen diperoleh dengan menimbang berat ekstrak kental kemudian dibagi berat serbuk bunga alamanda dan dikalikan 100%.

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

7. Penetapan kadar air ekstrak etanol bunga alamanda

Penetapan kadar air ekstrak etanol bunga alamanda dilakukan menggunakan alat *Sterling-Bidwell*. Metode ini dilakukan dengan cara menimbang ekstrak etanol bunga alamanda sebanyak 20 gram dimasukkan dalam labu destilasi dan ditambahkan pelarut toluen jenuh air 200 ml sampai serbuk terendam kemudian memasang alat *Sterling-Bidwell*. Labu dipanaskan dengan api kecil secara hati-hati setelah mendidih api dibesarkan. Pemanasan dihentikan jika pada tetesan sudah tidak ada air yang menetes, kemudian diukur kadar airnya dengan membaca volume pada skala alat *Sterling-Bidwell*. Kadar air dihitung dalam % v/b. Konsentrasi kadar air pada serbuk simplia akan memenuhi syarat apabila tidak lebih dari 10% (Depkes 2008).

8. Penetapan persen kadar air ekstrak etanol bunga alamanda

Penetapan persen kadar air diperoleh dengan membaca volume air pada skala alat *Sterling-Bidwell* kemudian dibagi berat ekstrak etanol bunga alamanda dan dikalikan 100%.

$$\% \text{ kadar air} = \frac{\text{Volume air (ml)}}{\text{bobot awal (g)}} \times 100\%$$

9. Pembuatan fraksi

9.1. Fraksinasi petroleum eter ekstrak etanol bunga alamanda.

Fraksinasi petroleum eter ekstrak bunga alamanda dibuat dengan cara ekstrak etanol bunga alamanda dilarutkan dengan 75 ml air kemudian difraksinasi dengan pelarut non polar petroleum eter sebanyak 75 ml dalam corong pisah. Filtrat yang dibagian atas adalah fraksi petroleum eter dipisahkan dari filtrat yang dibagian bawah yaitu air, sehingga didapat fraksi petroleum eter. Fraksinasi direplikasi sebanyak 3x, apabila terdapat residu ekstrak etanol yang tidak larut dalam petroleum eter pada fraksinasi pertama, maka residu tersebut tetap dilarutkan dengan 75 ml petroleum eter pada fraksinasi kedua, begitu seterusnya hingga fraksinasi yang ketiga. Hasil fraksi petroleum eter dikumpulkan menjadi satu dan dipekatkan menggunakan evaporator pada suhu 40°C, kemudian hasilnya ditimbang.

9.2. Fraksinasi kloroform ekstrak etanol bunga alamanda. Fraksinasi

kloroform ekstrak bunga alamanda dibuat dengan cara fraksinasi dari residu petroleum eter difraksinasi kembali dengan menggunakan pelarut kloroform sebanyak 75 ml dalam corong pisah. Fraksi yang dibagian atas adalah fraksi kloroform. Fraksinasi direplikasi sebanyak 3x, apabila terdapat residu ekstrak etanol yang tidak larut dalam kloroform pada fraksinasi pertama, maka residu tersebut tetap dilarutkan dengan 75 ml kloroform pada fraksinasi kedua, begitu seterusnya hingga fraksinasi yang ketiga. Hasil fraksi kloroform dikumpulkan menjadi satu dan dipekatkan menggunakan evaporator pada suhu 40°C, kemudian hasilnya ditimbang.

9.3. Fraksinasi air ekstrak etanol bunga alamanda. Fraksinasi air esktrak

bunga alamanda dibuat dengan cara mengambil hasil fraksinasi dari residu

klorofororm, kemudian dipekatkan menggunakan *waterbath* dan hasil ditimbang sehingga didapatkan fraksi air.

10. Uji bebas etanol

Uji bebas etanol dilakukan untuk meyakinkan bahwa ekstrak bunga alamanda sudah tidak mengandung etanol. Uji bebas etanol dilakukan dengan cara esterifikasi etanol, ekstrak ditambah asam asetat dan asam sulfat kemudian dipanaskan bila tidak ada bau ester berarti ekstrak tidak mengandung etanol.

11. Identifikasi kandungan senyawa kimia serbuk dan ekstrak bunga alamanda

Identifikasi kandungan senyawa kimia dilakukan untuk mendapatkan kebenaran kandungan kimia yang terkandung dalam bunga alamanda (*Allamanda cathartica* L.). Identifikasi senyawa tanin, saponin, flavonoid, alkaloid dan triterpenoid/steroid dilakukan di Laboratorium Fitokimia Universitas Setia Budi, Surakarta.

11.1. Tanin. Identifikasi tanin dilakukan dengan cara serbuk dan ekstrak bunga alamanda masing-masing dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian dilarutkan dengan 10 ml air dipanaskan selama 15 menit di atas penangas air, kemudian disaring. Filtrat yang diperoleh ditambah besi (III) klorida, diamkan beberapa saat. Reaksi positif jika terbentuk warna biru kehitaman atau hijau kehitaman (Tiwari *et al.* 2011).

11.2. Saponin. Identifikasi saponin dilakukan dengan cara serbuk dan ekstrak bunga alamanda ditambahkan air panas sama banyak, didinginkan lalu dikocok kuat-kuat selama 25 detik. Uji positif mengandung saponin ditunjukkan dengan terbentuknya buih mantap selama tidak kurang dari 10 menit setinggi 1-10 cm, dengan penambahan 1 tetes HCl 2N buih tidak hilang (Tiwari *et al.* 2011).

11.3. Flavonoid. Identifikasi flavonoid dilakukan dengan cara serbuk dan ekstrak bunga alamanda dilarutkan dalam metanol panas, kemudian di dalam larutan ditambahkan serbuk magnesium, ditambahkan 5 tetes HCl pekat dan larut amil alkohol. Campuran larutan dikocok kuat-kuat, kemudian dibiarkan memisah. Uji positif ditandai dengan adanya warna merah atau kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol (Tiwari *et al.* 2011).

11.4. Alkaloid. Identifikasi alkaloid dilakukan dengan cara serbuk dan ekstrak bunga alamanda masing-masing dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 1 ml HCl 2N dan 9 ml aquadest, kemudian panaskan selama ± 2 menit, dinginkan dan disaring. Filtrat dibagi menjadi 3 bagian, tiap filtrat diberi pereaksi Mayer, Wagner dan Dragendorff (Tiwari *et al.* 2011).

11.5. Triterpenoid/Steroid. Identifikasi Triterpenoid/Steroid dilakukan dengan cara serbuk dan ekstrak bunga alamanda dilarutkan dalam 2 ml asam asetat anhidrida, lalu ditambah 0,5 ml kloroform, lalu dituang dalam tabung yang kering, melalui dinding tabung teteskan 1-2 ml asam sulfat dengan pipet (reaksi *Lieberman Burchard*). Hasil positif steroid atau triterpenoid ditunjukkan adanya batas kedua larutan cincin merah kecoklatan atau ungu, sedangkan larutan bagian atas menjadi hijau atau ungu. Hasil positif steroid ditunjukkan dengan terbentuknya warna biru sampai hijau, terbentuknya warna merah sampai ungu menunjukkan positif terpenoid (Tiwari *et al.* 2011).

12. Sterilisasi alat dan bahan

Media yang digunakan harus terlebih dahulu disterilkan dengan menggunakan alat autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Gelas ukur dan *beaker glass* disterilkan dengan oven pada suhu 170°C-180°C selama 2 jam sedangkan alat-alat seperti jarum ose disterilkan dengan pemanas api langsung. Sterilisasi inkas menggunakan formalin (Darmandi 2008).

13. Pembuatan suspensi jamur *Candida albicans* ATCC 10231

Candida albicans ATCC 10231 diambil dari suatu biakan dengan menggunakan jarum ose, kemudian digoreskan pada media *Saboraud Glucose Agar* miring pada suatu tabung yang kemudian diinkubasi selama 1-2 hari pada suhu 37°C. Hasil inkubasi digunakan sebagai stok jamur uji *Candida albicans* ATCC 10231. Biakan *Candida albicans* ATCC 10231 sebanyak beberapa ose diambil, kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 10 ml *Saboraud Glucose Cair*, campuran dikocok sampai homogen dan diinkubasi sampai kekeruhan sesuai dengan standart *Mc Farland* 0,5 yang setara dengan 1~5x10⁶ CFU/ml (CLSI 2002). Pengujian metode difusi suspensi *Candida albicans* ATCC 10231 tidak perlu diencerkan, Sedangkan pada pengujian metode dilusi suspensi *Candida albicans*

ATCC 10231 yang didapat diencerkan dengan perbandingan 1 : 100 pada sebuah tabung menggunakan *Saboraud Glucose Cair* (CLSI 2002).

14. Identifikasi jamur *Candida albicans* ATCC 10231

Identifikasi jamur *Candida albicans* ATCC 10231 dilakukan dengan tiga cara yaitu identifikasi makroskopis, mikroskopis dan fermentasi karbohidrat. Identifikasi makroskopis dilakukan dengan cara biakan murni *Candida albicans* ATCC 10231 diinokulasi pada media *Sabouraud Glucose Agar* (SGA) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Koloni yang terbentuk berwarna krem atau putih kekuningan, lunak, dan berbentuk oval.

Identifikasi *Candida albicans* ATCC 10231 secara mikroskopis dilakukan menggunakan metode *germ tube* dengan cara diambil 2 ose koloni jamur *Candida albicans* ATCC 10231 pada media *Sabouraud Glucose Agar* (SGA), kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 0,5 ml serum dan diinkubasi selama 1-2 jam pada suhu 37°C. Sediaan tersebut diambil 1 tetes dan diletakkan pada *object glass* dan ditetesi *Lactofenol Cotton Blue*, kemudian diamati pada mikroskop dengan perbesaran lensa objektif 10x dan 40x. *Candida albicans* tampak sebagai ragi lonjong, kecil, berdinding tipis, bertunas, berukuran 3-6 x 4-8 μm yang memanjang menyerupai hifa (pseudohifa). *Candida albicans* bersifat dimorfik, selain ragi-ragi dan pseudohifa, *Candida albicans* juga bisa menghasilkan hifa sejati (Simatupang 2009).

Identifikasi fermentasi karbohidrat dilakukan dengan cara diambil 1-2 ose koloni *Candida albicans* ATCC 10231 kemudian diinokulasikan ke dalam tabung yang masing-masing berisi *glucosa*, *maltosa*, *sucrosa*, *lactosa broth* yang sudah ditambahkan indikator *fenol red* 1% dan dimasukkan tabung durham dengan posisi terbalik, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Warna kuning pada medium menunjukkan terbentuknya asam pada reaksi fermentasi tersebut. Tabung durham digunakan untuk mengetahui pembentukan gas. Gas yang terbentuk akan tampak sebagai ruang kosong pada tabung durham. Hasil identifikasi *Candida albicans* ATCC 10231 diambil berdasarkan reaksi fermentasi karbohidrat dan terbentuknya gas pada medium glukosa, sukrosa, dan maltosa, tidak terjadi proses fermentasi pada medium laktosa (Jawetz *et al.* 2007).

15. Pengujian aktivitas antijamur

15.1. Uji difusi. Ekstrak etanol bunga alamanda, fraksi petroleum eter, kloroform, dan air dari ekstrak bunga alamanda (*Allamanda cathartica* L.) yang telah disiapkan diuji secara difusi dengan jamur *Candida albicans* ATCC 10231. Larutan stok ekstrak etanol bunga alamanda, fraksi petroleum eter, kloroform, dan air dari ekstrak bunga alamanda dibuat masing-masing tiga konsentrasi yaitu 1, 2, dan 4 menggunakan pelarut DMSO 5%. Jamur uji diinokulasi pada media *Saboroud Glukosa Agar* (SGA) 30 ml yang berada dalam cawan petri yang telah memadat dengan menggunakan kapas lidi steril yang telah dicelupkan dalam biakan jamur. Kapas lidi diusapkan pada seluruh media hingga rata secara aseptis, kemudian didiamkan selama 10 menit agar suspensi biakan terdifusi ke media. Kertas cakram ukuran 6 mm dengan volume 25 μ l diteteskan sedikit demi sedikit larutan stok ekstrak etanol bunga alamanda, fraksi petroleum eter, kloroform dan air dari ekstrak bunga alamanda dibuat masing-masing sebanyak 25 μ l. Kertas cakram dari semua konsentrasi kemudian diletakkan diatas media, kertas cakram fluconazole diletakkan juga diatas media sebagai kontrol positif dan kertas cakram yang diteteskan DMSO 5% sebagai kontrol negatif. Replikasi dilakukan sebanyak tiga kali. Masa inkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam, kemudian dilakukan pengamatan dan pengukuran zona hambat yang terbentuk. Skema pengujian dilisui dapat dilihat pada gambar 4.

15.2. Uji dilusi. Metode dilusi menggunakan 1 deretan tabung reaksi yang terdiri atas 8 tabung dengan pengembang interval pengenceran 2 kali. Seri konsentrasi adalah 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125%, kontrol positif dan kontrol negatif. *Sabouraud Glucose cair* (SGC) yang digunakan dimasukkan pada tiap tabung sebanyak 0,5 ml kecuali tabung 1 dan tabung 8. Tabung 1 hanya diisi larutan fraksi teraktif sebanyak 1 ml. Tabung 2 diisi 0,5 ml fraksi teraktif kemudian dihomogenkan, sebanyak 0,5 ml dari tabung 2 dipindahkan ketabung 3, perlakuan yang sama juga dikerjakan untuk masing-masing tabung berikutnya sampai dengan tabung 7, kemudian 0,5 ml dari tabung 7 dibuang. Suspensi *Candida albicans* ATCC 10231 0,5 ml yang telah disesuaikan dengan kekeruhan standar Mc Farland 0,5 dan telah diencerkan 1 : 100 ditambahkan pada semua tabung kecuali tabung 1,

tabung 1 sebagai kontrol negatif yang berisi larutan fraksi teraktif, sedangkan tabung 8 sebagai kontrol positif biakan (Jawetz *et al.* 2007).

Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) ditentukan dengan mengamati adanya kekeruhan pada seri pengenceran dari sejumlah tabung yang telah diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, tabung dengan larutan jernih setelah tabung keruh terakhir merupakan Konsentrasi Hambat minimum (KHM), selanjutnya KHM tersebut dikultur ulang pada media *Sabouraud Glucose Agar* (SGA) tanpa penambahan mikroba uji ataupun senyawa antimikroba, dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Media *Sabouraud Glucose Agar* (SGA) yang menunjukkan tidak adanya pertumbuhan jamur setelah diinkubasi ditetapkan sebagai Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM). Skema pengujian dilusuri dapat dilihat pada gambar 5.

16. Identifikasi golongan senyawa dari fraksi teraktif dengan KLT

Identifikasi kandungan kimia dari fraksi teraktif dilakukan untuk mendapatkan kebenaran kandungan kimia yang terdapat dalam bunga alamanda (*Allamanda cathartica* L.). Identifikasi dilakukan di Laboratorium Fitokimia Universitas Setia Budi, Surakarta.

16.1. Identifikasi tanin. Identifikasi adanya senyawa tanin dilakukan menggunakan KLT, baku pembanding yang digunakan adalah asam galat. Fase diam silika gel GF₂₅₄ dan fase geraknya menggunakan *n*-butanol : asam asetat : air (3 : 1 : 1). Dideteksi di bawah sinar UV 366 nm berwarna hitam. Pereaksi semprot yang digunakan adalah FeCl₃ 1% (Harborne 2006).

16.2. Identifikasi saponin. Identifikasi senyawa saponin dengan menggunakan kromatografi lapis tipis, baku pembanding yang digunakan adalah saponin. fase gerak yang digunakan adalah kloroform : metanol : air (64 : 35 : 2). Pereaksi penampak yang digunakan anisaldehid asam sulfat pekat. Pereaksi penampak akan membuat saponin membentuk bercak biru, violet atau kadang-kadang kekuningan bila diamati secara visual (Harborne 2006).

16.3. Identifikasi flavonoid. Identifikasi senyawa flavonoid dengan menggunakan kromatografi lapis tipis dengan menggunakan fase diam silika gel GF₂₅₄. Baku pembanding yang digunakan adalah kuersetin. Elusi plat KLT

menggunakan fase gerak kloroform : metanol (9 : 1) dengan pereaksi semprot sitoborat. Pengamatan dengan UV 254 nm akan memberikan peredaman, UV 366 nm berfluorosensi biru, kuning ungu gelap (Harborne 2006).

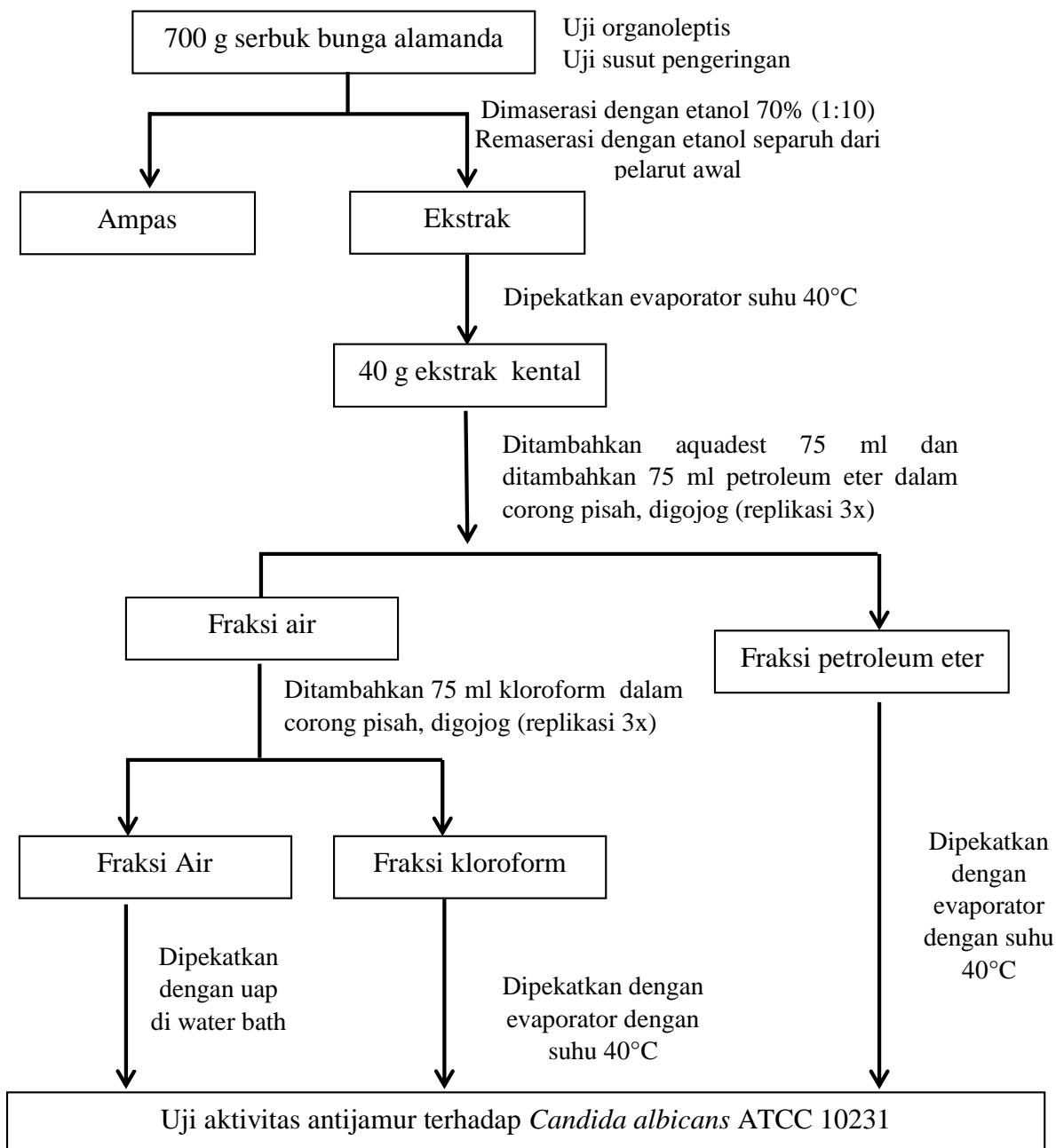
16.4. Identifikasi triterpenoid/steroid. Identifikasi senyawa triterpenoid dengan menggunakan kromatografi lapis tipis dengan menggunakan fase diam silika gel GF₂₅₄ diaktifkan pada suhu 105°C selama 3-5 menit. Baku pembanding untuk steroid yang digunakan adalah stigmasterol. Fase gerak yang digunakan adalah *n*-heksana : etil asetat (1:1). Simplisia dikatakan mengandung triterpenoid apabila ditambahkan dengan pereaksi *Lieberman Bourchardat* memberikan noda yang berwarna ungu atau biru dan beberapa senyawa berfluorosensi di bawah sinar UV 366 nm. Identifikasi senyawa steroid dengan menggunakan fase diam silika gel GF₂₅₄ dan fase gerak kloroform : metanol (9:1). Noda dapat terlihat dengan penyemprotan pada lempeng dengan pewarna *Lieberman Bourchardat* dan kemudian dipanaskan, steroid bebas ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah ungu atau ungu (Harborne 2006).

E. Analisis Hasil

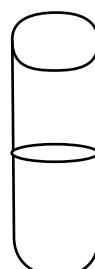
Data hasil diameter daya hambat dari pengujian aktivitas antijamur fraksi petroleum eter, fraksi kloroform dan fraksi air dari ekstrak etanol bunga alamanda menggunakan metode difusi terhadap pertumbuhan *Candida albicans* ATCC 10231 dianalisa menggunakan *Kolmogorov-Smirnov*, jika data terdistribusi normal ($p > 0,05$) maka dilanjutkan dengan analisa *Levene Test* untuk mengetahui homogenitas data, jika hasil data terdistribusi normal dan homogen maka dilanjutkan uji *Two Way ANOVA* untuk mengetahui adanya perbedaan yang bermakna pada setiap perlakuan dan dilanjutkan uji *Post Hoc* untuk mengetahui pada kelompok mana terdapat perbedaan yang bermakna.

500 g bunga alamanda

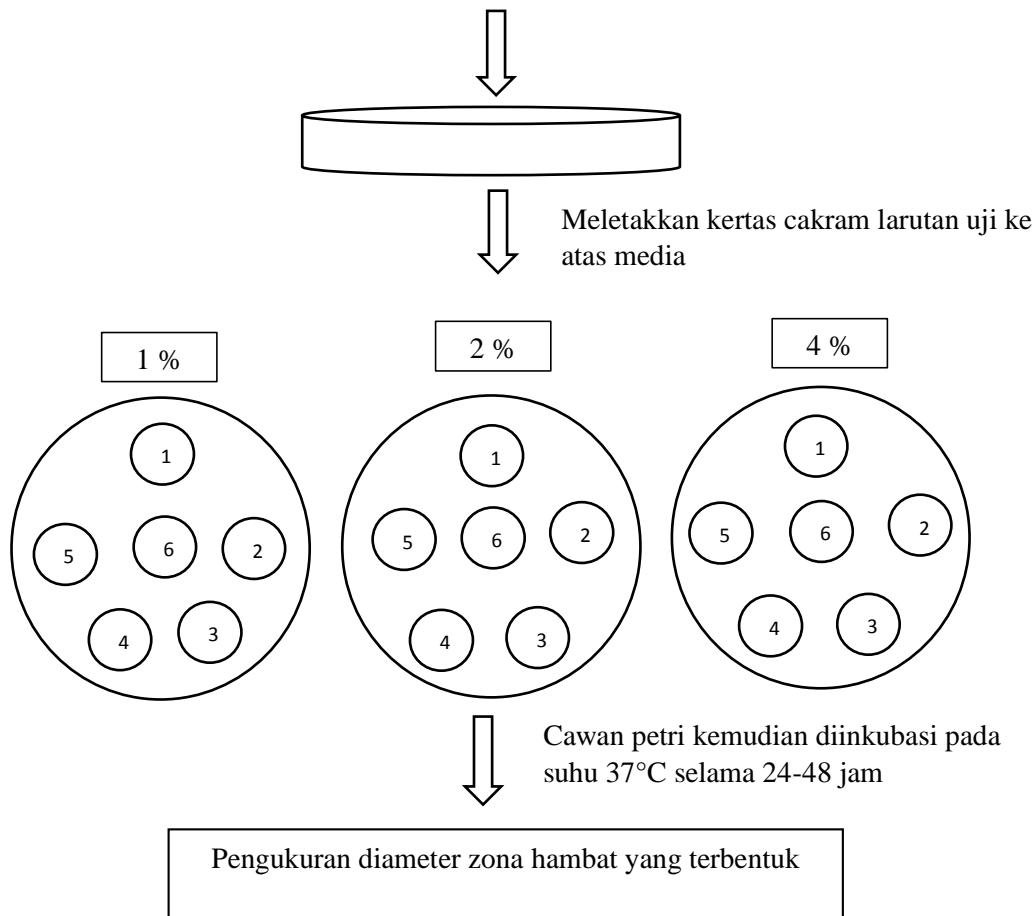
Dicuci bersih, dikeringkan dalam oven suhu 40°C, digiling dan diayak dengan ayakan no. 40



Gambar 3. Skema pembuatan ekstrak etanol, fraksi petroleum eter, kloroform, dan air dari bunga alamanda.



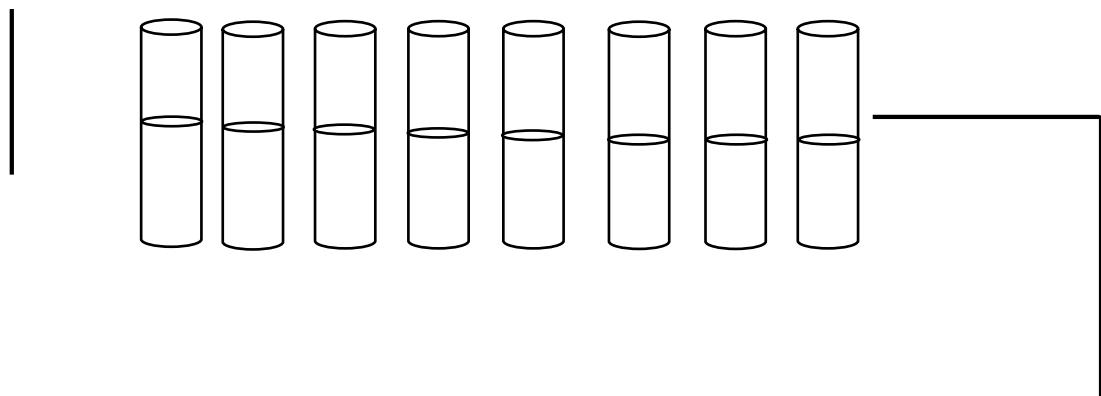
Biakan *Candida albicans* ATCC 10231 diinokulasi pada cawan petri yang berisi media SGA

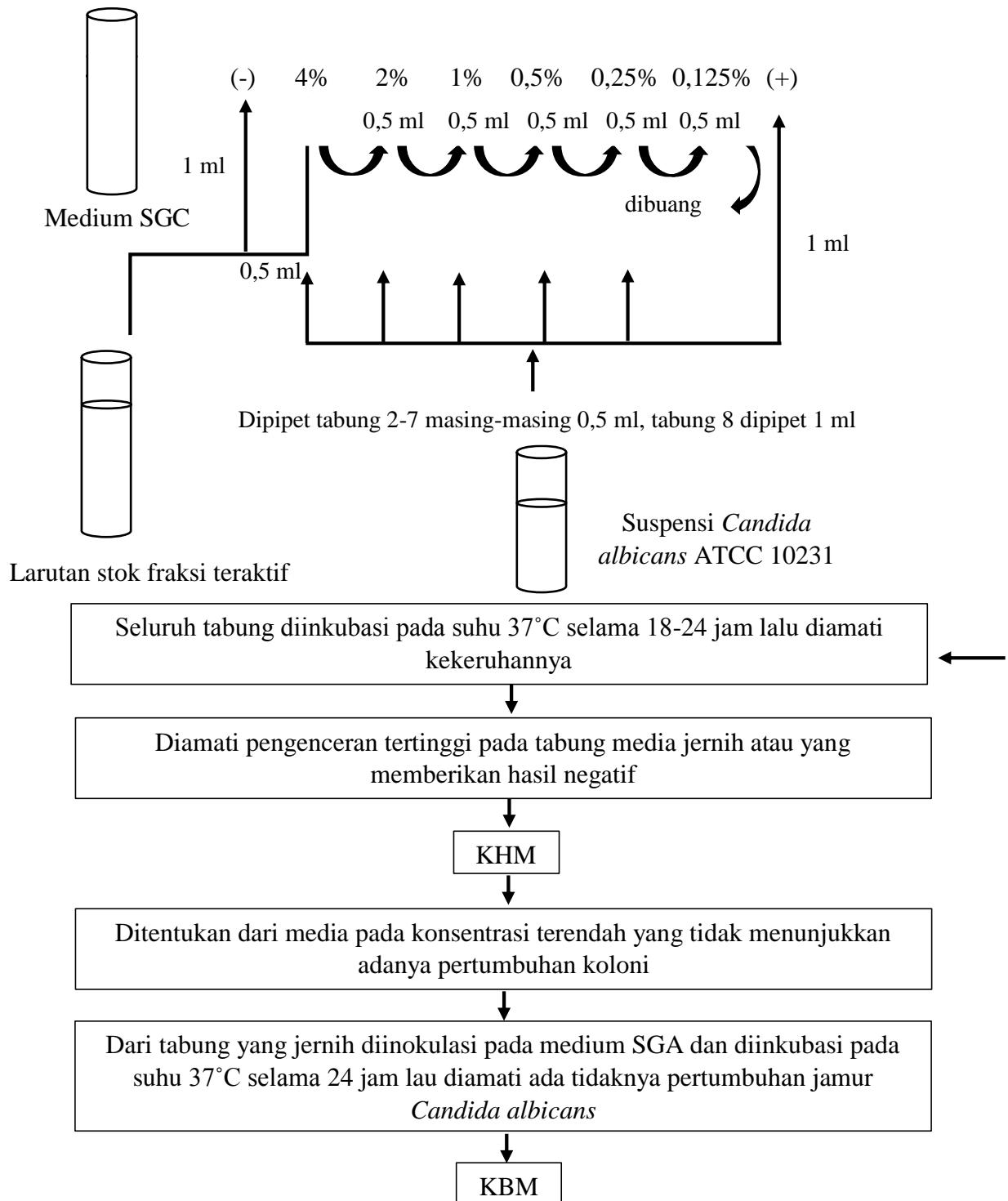


Keterangan :

1. Ekstrak (1%, 2%, 4%)
2. Fraksi petroleum eter (1%, 2%, 4%)
3. Fraksi kloroform (1%, 2%, 4%)
4. Fraksi air (1%, 2%, 4%)
5. Kontrol negatif (DMSO 5%)
6. Kontrol positif (flukonazole)

Gambar 4. Skema kerja uji aktivitas antijamur bunga alamanda terhadap *Candida albicans* ATCC 10231 secara difusi.





Gambar 5. Skema pengujian aktivitas antijamur fraksi teraktif dari ekstrak etanol bunga alamanda terhadap *Candida albicans* ATCC 10231 dengan metode dilusi.

