

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental, dengan tujuan utama menguji coba suatu objek penelitian, kemudian dilihat diameter zona hambat ekstrak etanol 70% dan ekstrak etanol 96% buah parijoto (*Medinilla speciosa*) terhadap fungi *Candida albicans*. Penelitian ini menggunakan metode difusi agar dengan media dasar SDA (*Sabouraud Dextrose Agar*) dan rancangan *Post test Only Control Group Design* dengan menggunakan uji ANOVA (*analysis of variance*).

B. Lokasi Penelitian

1. Lokasi penelitian
 - a. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biologi Universitas Ngudi Waluyo Ungaran.
 - b. Determinasi tanaman dilakukan di Fakultas MIPA Laboratorium Biologi Universitas Diponegoro Semarang.
 - c. Penelitian dilakukan pada bulan Oktober sampai November 2019.

C. Subjek Penelitian

Populasi dalam penelitian ini adalah buah parijoto yang merupakan tanaman khas yang berasal dari Desa Colo Kecamatan Dawe, Kabupaten Kudus Jawa Tengah. Sampel dalam penelitian ini adalah ekstrak buah parijoto.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak etanol 70% dan ekstrak etanol 96% buah parijoto (*Medinilla speciosa*) pada konsentrasi 2,5% b/v, 5 b/v, 10 b/v.

2. Variabel tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah Diameter Zona Hambat terhadap jamur *Candida albicans*.

3. Variabel terkendali

Variabel terkendali merupakan variabel yang dapat dikendalikan atau dibuat konstan sehingga hubungan variabel bebas terhadap variabel terikat tidak dipengaruhi oleh faktor luar yang tidak diteliti.

Variabel terkendali sering dipakai oleh peneliti dalam penelitian yang bersifat membandingkan melalui penelitian eksperimental. Variabel terkendali dalam penelitian ini meliputi : tanaman yang didapatkan pada daerah yang sama; media, sterilisasi alat dan bahan, suhu dan waktu inkubasi.

E. Pengumpulan Data

1. Alat penelitian

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah alat seperangkat maserasi (toples kaca), gelas ukur (Iwaki), beaker glass (Iwaki), *Erlenmeyer* (Iwaki), timbangan analitik (Ohaus), timbangan gram, blender (Maspion), mikropipet, jarum ose, oven (Memmert), autoclave (Memmert), waterbath

(Mommert), inkubator, lampu spirtus, dan *Rotary evaporator*, cawan petri, enkas, tabung reaksi (Pyrex), ose, busen, batang pengaduk, pipet tetes, kertas label, aluminium foil, kertas pembungkus, kertas cakram steril, kertas saring.

2. Bahan penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri atas dua yaitu bahan utama dan bahan pengujian. Bahan utama yang digunakan adalah ekstrak buah parijoto. Sedangkan bahan uji terdiri dari suspensi fungi *Candida albicans*, etanol 70%, etanol 96%, aquades, media SDA (*Sabouroud Dextrose Agar*), ketokonazole (Zoralin), asam sulfat, FeCl 1% (Emsure), hidrogen klorida (Emsure), natrium klorida (Emsure) dan natrium hidroksida (Emsure) , DMSO 1% (Emsure).

F. Pengolahan Data

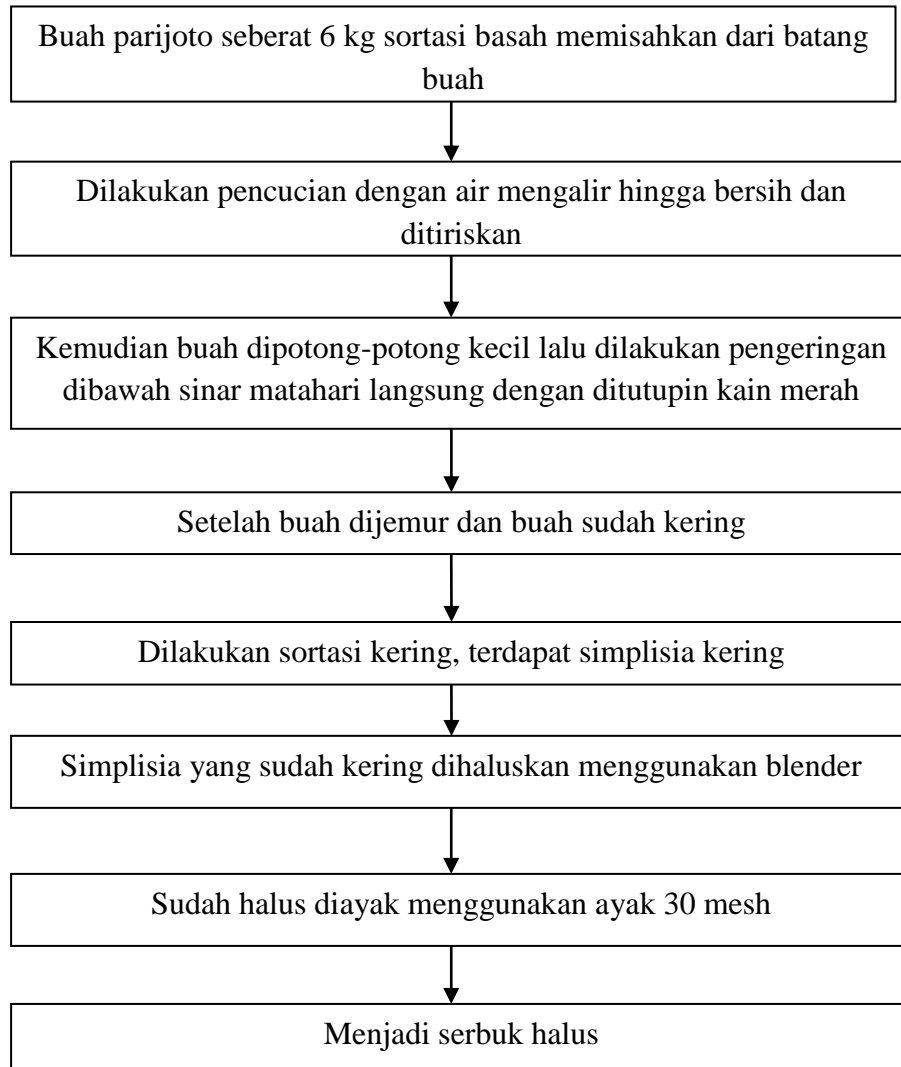
1. Determinasi tanaman

Determinasi dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistemik Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Diponegoro Semarang dengan tujuan untuk menghindari kesalahan pengumpulan bahan utama penelitian dan kemungkinan tercampur dengan tanaman lain. Buah parijoto (*Medinilla speciosa*) diambil di Desa Colo Kabupaten Kudus. Buah parijoto merupakan tanaman semak epifit dengan ketinggian 0,45-1,2 meter. Merupakan tumbuhan semak evergreen (selalu hijau) dengan batang dan cabang berkayu berwarna hijau. Daun berwarna hijau berbentuk lonjong dengan ujung lancip tulang daun melengkung. Buah tersusun dalam malai yang

besar dengan masing-masing buah berbentuk bulat kecil, Saat masih muda, buah berwarna pink muda namun semakin memerah kemudian keunguan setelah masak.

2. Penyiapan dan pengolahan buah parijoto

Buah parijoto didapatkan merupakan buah yang dipetik dalam kondisi segar berwarna keunguan dengan berat 6 kg yang diperoleh dari daerah lereng Gunung Muria, Kabupaten Kudus. Setelah dipetik buah parijoto dilakukan sortasi basah untuk memisahkan antara buah dan batang yang menempel pada buah, selanjutnya dilakukan pencucian dilakukan dengan air mengalir hingga bersih tujuan ini untuk menghilangkan kotoran lainnya yang melekat pada buah tersebut, kemudian buah dipotong-potong lalu proses pengeringan dengan cara dijemur dibawah sinar matahari langsung untuk mendapatkan simplisia yang tidak mudah rusak, sortasi kering dilakukan dengan memisahkan benda asing. Setelah itu simplisia yang telah kering dilakukan proses penghancuran pada masing-masing simplisia dengan cara ditumbuk atau di blender sampai menjadi serbuk lalu diayak dengan mesh nomor 30, selanjutnya ditimbang sebagai berat kering (DepKes RI, 2010).



Gambar 3.1 Skema Pembuatan Simplisia

a. Pembuatan ekstraksi buah parijoto

Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 70% dan 96% menggunakan perbandingan 1:10. Sebanyak 250 g serbuk buah parijoto direndam dengan 2500 ml masing-masing etanol 70% dan 96% selama 3 hari, dengan beberapa

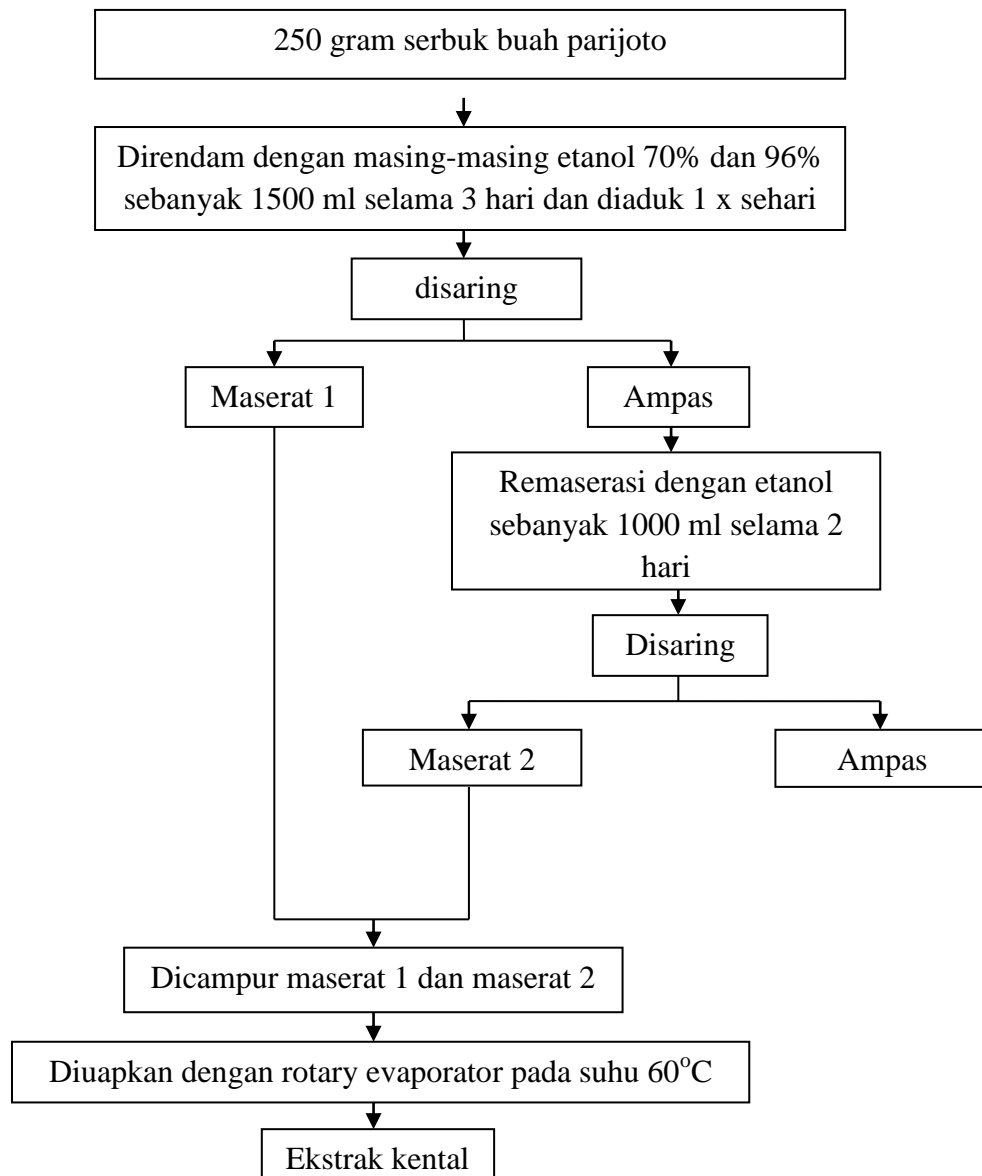
kali pengadukan agar tidak terjadi penggumpalan, kemudian disaring dan dipisahkan. Maserasi yang telah dilakukan diperoleh filtrat etanol.

Filtrat etanol buah parijoto dipekatkan menggunakan *Rotary evaporator* pada suhu 60°C. Pemilihan suhu disesuaikan dengan titik didih pelarut. Rotary Evaporator mampu menguapkan pelarut dibawah titik didih sehingga zat yang terkandung di dalam pelarut tidak rusak oleh suhu yang tinggi. Ekstrak pekat ditimbang untuk mendapatkan nilai rendemennya.

Perbandingan pembuatan ekstrak etanol 70% dan ekstrak etanol 96% dengan menggunakan metode maserasi, dilakukan dengan cara sebanyak 250 gram serbuk simplisia buah parijoto dimasukkan ke dalam wadah kemudian ditambah 1500 ml masing- masing pelarut etanol 70% dan etanol 96%, ditutup dan dibiarkan selama 3 hari terlindung dari cahaya matahari, dengan dilakukan pengadukan satu kali sehari dan sesering mungkin. Setelah 3 hari kemudian disaring menggunakan kain flanel dan didapatkan maserat ke I. Kemudian dilakukan proses remaserasi dengan cara ampas yang didapatkan ditambahkan 1000 ml masing-masing etanol 70% dan etanol 96% dibiarkan didalam wadah yang tertutup dan terlindung dari cahaya matahari selama 2 hari dan dilakukan pengadukan 1 kali sehari, kemudian disaring kembali dan didapat hasil maserat ke II (Rikhana, 2018).

Hasil maserat I dan II dicampur, kemudian diuapkan dengan rotary evaporator pada temperatur 60°C sampai pelarut menguap

sempurna sehingga diperoleh ekstrak kental, sehingga pelarut dibawah titik didih zat yang terkandung di dalam pelarut tidak rusak oleh suhu yang tinggi.



Gambar 3.2 Pembuatan Ekstrak Etanol 70% Dan 96% Buah Parijoto (*Medinilla speciosa*)

b. Perhitungan rendemen

Rendemen adalah perbandingan antara hasil yang diperoleh dengan simplisia awal

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat simplisia}} \times 100\%$$

c. Uji bebas etanol

Uji etanol secara kualitatif dilakukan dengan menambahkan 2 tetes H₂SO₄ pekat dan 1 ml larutan kalium dikromat, adanya kandungan etanol dalam ekstrak ditandai dengan terjadinya perubahan warna mula-mula dari jingga menjadi hijau kebiruan. Ekstrak dikatakan bebas etanol bila tidak ada bau ester yang khas dari etanol.

d. Skrining fitokimia

1) Uji flavonoid

0,1g ekstrak sampel ditambahkan 10 ml aquades dan dipanaskan selama 5 menit lalu disaring ke dalam tabung reaksi. Ditambahkan 0,5 mg serbuk Mg, 1 ml HCl dan 1 ml amil alkohol kemudian dikocok dengan kuat. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya warna merah, kuning atau jingga pada larutan sampel (Nurlaila *et al*, 2017)

2) Uji tanin

0,1 gram ekstrak sampel ditambahkan 10 ml aquades dipanaskan selama 5 menit kemudian saring ke dalam tabung reaksi. Tambahkan 4 tetes 3 tetes FeCl₃ 1% kemudian kocok kuat. Hasil uji

positif saponin ditandai dengan terbentuknya busa yang stabil selama 10 menit (Nurlaila *et al*, 2017).

3) Uji saponin

0,1 gram ekstrak sampel ditambahkan 10 ml aquades dipanaskan selama 5 menit kemudian disaring ke dalam tabung reaksi. Tambahkan 4 tetes HCl kemudian kocok kuat. Hasil uji positif saponin ditandai dengan terbentuknya busa yang stabil selama 10 menit (Nurlaila *et al*, 2017).

4) Uji glikosida

Sebanyak 0,1 gram ekstrak ditambahkan 10 ml aquades dipanaskan selama 5 menit kemudian disaring kedalam tabung reaksi. Kemudian tambahkan larutan NaOH. Terbentuknya warna kuning mengindikasikan adanya senyawa glikosida (Nurlaila *et al*., 2017).

3. Sterilisasi alat dan bahan

Sebelum penelitian perlu dilakukan sterilisasi alat dan bahan. Sterilisasi dilakukan dengan metode panas basah dan panas kering. Bahan-bahan yang digunakan seperti media SDA (*Sabouraud Dextrose Agar*) dan aquades disterilkan dengan pemanasan basah menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Alat-alat seperti tabung reaksi, cawan petri, batang pengaduk, gelas ukur dan *Erlenmeyer* dicuci bersih kemudian dikeringkan hingga tidak terdapat titik air agar tidak timbul noda yang sulit hilang setelah disterilkan. Setelah alat-alat tersebut kering kemudian

dibungkus dengan kertas dan disterilkan dengan pemanasan kering menggunakan oven pada suhu 200°C selama 30 menit (Pratiwi, 2008).

4. Pembuatan bahan antifungi

a. SDA (*Sabouraud Dextrose Agar*)

Salah satu media yang biasanya digunakan untuk pembiakan fungi adalah SDA (*Sabouraud Dextrose Agar*). Kandungan dekstrosa merupakan sumber energi, agar sebagai bahan pematat, dan dua kandungan terakhir berperan dalam menyediakan kebutuhan nitrogen serta vitamin untuk pertumbuhan organisme. Kandungan dekstrosanya yang tinggi dan pH nya yang asam juga menyebabkan SDA (*Sabouraud Dextrose Agar*) hanya dapat digunakan sebagai media pembiakan fungi tertentu salah satunya *Candida albicans*. Pada media SDA (*Sabouraud Dextrose Agar*), fungi akan nampak sebagai koloni-koloni putih (Fuad, 2014).

SDA (*Sabouraud Dextrose Agar*) sebanyak 15 gram ditimbang, kemudian dilarutkan dalam 500 ml, air destilasi sampai didapatkan media yang homogen dan dipanaskan selama 30 menit. Kemudian media disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 2 atm selama 15 menit (Warsinah dan Sunarto, 2015)

b. Media pembenihan

SDA (*Sabouraud Dextrose Agar*) dilarutkan dalam aquades kemudian dipanaskan diatas penangas air sampai mendidih dan diperoleh

larutan jernih lalu disterilkan ke dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

c. Pembuatan suspensi fungi

Pembiakan *Candida albicans* dengan menuangkan media SDA menggunakan *teknik bidang miring* di diamkan sampai setengah padat kemudian diambil sebanyak 1-2 ose fungi *Candida albicans* murni dan ditambahkan kedalam 5 ml NaCl 0,9% kemudian diinkubator dengan suhu 37° selama 18-24 jam (Lilies dan Nanik, 2012).

d. Pembuatan Larutan Kontrol Positif

Menurut Raniyanti *et al.*, (2015) kontrol positif menggunakan ketokonazole 2% dibuat dengan cara menimbang 0,2 gram. Diambil 1 tablet ketokonazole kemudian digerus, ditambahkan DMSO 1% sebanyak 0,1 gram add 10 ml.

Perhitungan ketokonazole 2%

Berat 1 tablet ketokonazole mengandung 200 mg kemudian ketokonazole dilarutkan dalam 10 ml DMSO 1%

$$\begin{aligned} 2/100 &= 2 \text{ gram}/100 \text{ ml} \\ &= 0,2 \text{ gram}/10 \text{ ml} \\ &= 200 \text{ mg}/10 \text{ ml} \end{aligned}$$

1 tablet dilarutkan dalam 10 ml DMSO 1%

e. Pembuatan konsentrasi ekstrak buah parijoto perbandingan pelarut etanol

70% dan etanol 96% dengan konsentrasi 2,5% b/v, 5% b/v, 10% b/v.

1) Kosentrasi 2,5% b/v

Ditimbang 0,25 gram ekstrak kental kemudian ditambahkan DMSO 1% add 10 ml pada labu takar.

Perhitungan kosentrasi 2,5% b/v

$$\begin{aligned} 2,5 \text{ gram}/100 \times 10 \text{ ml} &= 0,25 \text{ gram} \\ &= 0,25 \text{ gram ekstrak dilarutkan dengan} \\ &\quad \text{DMSO 1\% sampai 10 ml} \end{aligned}$$

2) Kosentrasi 5% b/v

Ditimbang 0,5 gram ekstrak kental kemudian ditambahkan DMSO 1% add 10 ml pada labu takar.

Perhitungan kosentrasi 5% b/v

$$\begin{aligned} 5 \text{ gram}/100 \times 10 \text{ ml} &= 0,5 \text{ gram} \\ &= 0,5 \text{ gram ekstrak dilarutkan dengan} \\ &\quad \text{DMSO 1\% sampai 10 ml} \end{aligned}$$

3) Kosentrasi 10% b/v

Ditimbang 1 gram ekstrak kental kemudian ditambahkan DMSO 1% add 10 ml pada labu takar.

Perhitungan kosentrasi 10% b/v

$$\begin{aligned} 10 \text{ gram}/100 \times 10 \text{ ml} &= 1 \text{ gram} \\ &= 1 \text{ gram ekstrak dilarutkan dengan DMSO} \\ &\quad \text{1\% sampai 10 ml} \end{aligned}$$

f. Perlakuan uji aktivitas antifungi

Kontrol yang digunakan dalam uji aktivitas antifungi ekstrak etanol buah parijoto terhadap *Candida albicans* adalah sebagai berikut :

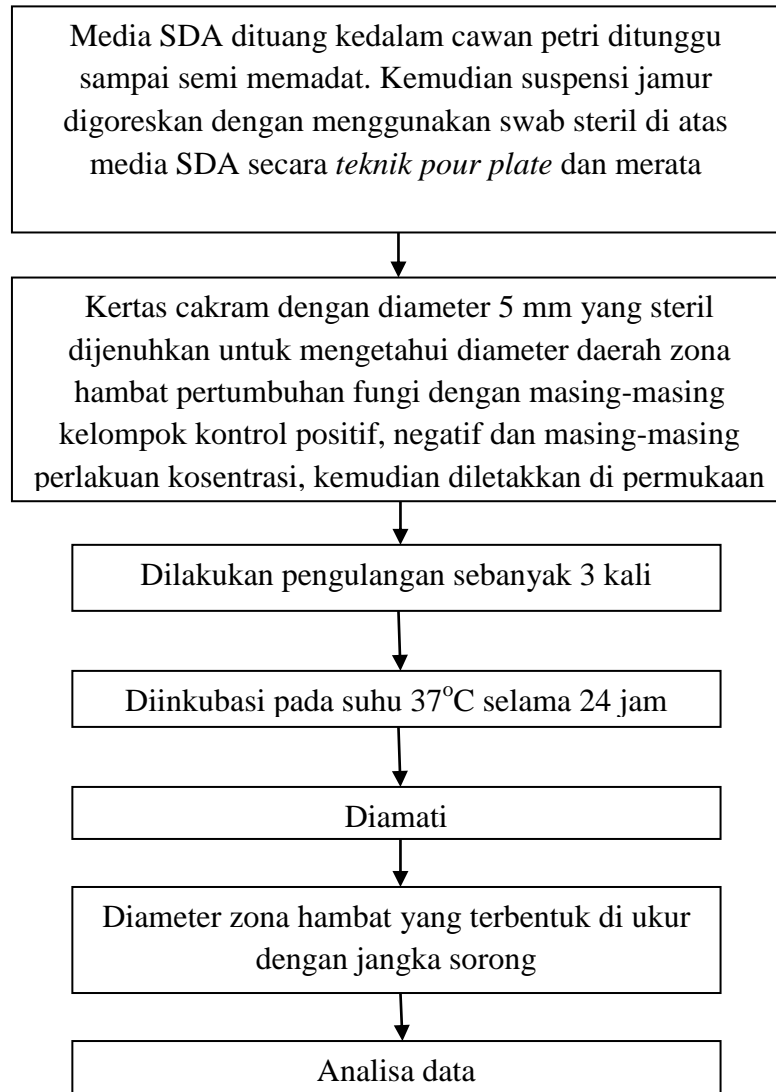
- 1) Kontrol Positif = ketokonazole + media SDA + suspensi fungi
- 2) Kontrol Negatif = media SDA + suspensi fungi + DMSO 1%
- 3) Kontrol Media = media SDA
- 4) Kontrol Pertumbuhan = suspensi fungi *Candida albicans*.
- 5) Perlakuan 1 = media SDA + suspensi fungi + ekstrak buah parijoto 2,5%
- 6) Perlakuan 2 = media SDA + suspensi fungi + ekstrak buah parijoto 5%
- 7) Perlakuan 3 = ml media SDA + suspensi fungi + ekstrak buah parijoto 10%

5. Identifikasi Fungi *Candida albicans*

Identifikasi fungi dilakukan dengan menggunakan pengecatan gram yaitu dengan cara obyek glass dibersihkan terlebih dahulu menggunakan etanol 70%, diambil 1 ose biakan fungi dan diratakan diatas obyek glass, dan dibubuhi dengan pewarnaan KOH 10% 1-2 tetes biarkan selama 1-2 menit, dicuci dengan air dan dikeringkan, diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 40 kali. Fungi *Candica albicans* ditandai dalam bentuk blastospora atau bulat lonjong, hifa atau *pseudohyfae*, atau campuran keduanya.

6. Uji Aktivitas Antifungi

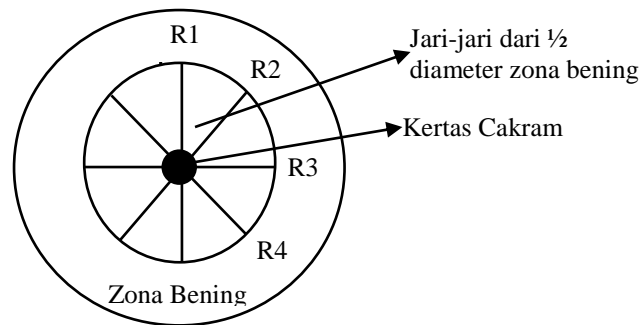
Uji aktivitas antifungi dilakukan menggunakan metode difusi cakram yaitu dengan menanamkan kertas cakram tujuannya untuk mengetahui diameter daerah zona hambat pertumbuhan yang sudah diberi larutan uji dengan perbandingan ekstrak etanol 70% dan ekstrak etanol 96% buah parijoto dengan konsentrasi 2,5% b/v, 5% b/v, dan 10% b/v dalam media agar yang telah diberi fungi *Candida albicans* dan diinkubator pada suhu 37°C selama 24 jam. Uji daya hambat fungi, dengan cara diambil suspensi fungi uji sebanyak 100 µl dituangkan secara merata pada medium SDA dituangkan secara merata pada medium SDA dengan menggunakan *teknik pour plate*. Ditunggu beberapa saat setelah semi memadat, lalu diletakkan kertas cakram yang telah dijenuhkan dengan perbandingan ekstrak etanol 70% dan ekstrak etanol 96% buah parijoto dengan konsentrasi 2,5% b/v, 5% b/v, dan 10% b/v, dibuat replikasi 3 kali. Sebagai kontrol positif menggunakan ketokonazole 2% selanjutnya kontrol negatif menggunakan DMSO 1% yang telah dijenuhkan pada kertas cakram berdiameter 5 mm dan kontrol media yaitu cawan petri berisi media SDA. Pada media yang telah berisi fungi uji, kontrol positif, kontrol negatif, kontrol media dan perlakuan dengan perbandingan ekstrak etanol 70% dan ekstrak etanol 96% buah parijoto konsentrasi 2,5% b/v, 5% b/v, dan 10% b/v diinkubator pada suhu 37°C selama 24 jam.



Gambar 3.3 Skema Uji Aktifitas Antifungi

7. Pengamatan dan pengukuran diameter zona hambat

Pengamatan zona hambat yang terbentuk setelah diinkubasi selama 24 jam diukur menggunakan jangka sorong. Adanya antifungi terhadap *Candida albicans* ditandai dengan terbentuknya zona hambat di sekitar kertas cakram yang mengandung larutan uji dan kontrol positif yang digunakan adalah Ketokonazole.



Gambar 3.4 Pengukuran Diameter Zona Hambat (Andre *et al.*, 2015)

$$\text{Pengukuran Zona hambat} = \frac{(D1-KC) + (D2-KC)}{2}$$

Keterangan :

D1 : diameter zona bening 1 (mm)

D2 : diameter zona bening 2 (mm)

KC : Diameter kertas cakram (5 mm)

Tabel 3.1 Klasifikasi Respon Hambatan Pertumbuhan Fungi (Christine *et al.*, 2019)

Diameter Zona Hambat	Respon Hambatan Pertumbuhan
> 2 cm	Sangat kuat
1,6 – 2 cm	Kuat
1 – 1,5 cm	Sedang
< 1 cm	Lemah

G. Analisis data

Analisa data pada penelitian ini dengan cara mengamati zona hambat ekstrak etanol 70% dan etanol 96% buah parijoto pada masing-masing konsentrasi dan kelompok kontrol terhadap pertumbuhan fungi *Candida albicans*. Adanya zona hambat ditandai dengan adanya zona bening pada media disekitar kertas cakram. Diameter zona hambat yang terbentuk dianalisa dengan SPSS 25.0 *for windows*. Uji Normalitas data dilakukan dengan analisis statistik *Saphiro-Wilk* kemudian dilanjutkan menggunakan *Uji Levene test* untuk melihat homogenitas data. Hasil

analisa data memiliki nilai signifikansi $P > 0,05$ pada uji *Saphiro-Wilk* dan Uji *Levene test* artinya data terdistribusi normal dan memiliki nilai signifikansi $P < 0,05$ artinya terdapat perbedaan. Data yang terdistribusi normal dan variansnya homogen dianalisis menggunakan uji statistik One Way Anova (Analysis Of Varians) dengan taraf kepercayaan 95%. Hasil diperoleh bahwa data terdistribusi normal akan tetapi tidak homogen sehingga tidak memenuhi syarat parametrik. Oleh karena itu, dilakukan uji non parametrik yaitu *Kruskal Wallis*. Apabila terdapat perbedaan maka dilanjutkan dengan uji *Tukey HSD* lalu dilanjutkan uji *T-Test* untuk mengidentifikasi perbedaan antar kedua pelarut yg digunakan.