

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Rancangan Penelitian**

Jenis penelitian ini adalah penelitian kuantitatif dalam bentuk eksperimental. Prosedur penelitian yang dilakukan untuk membuktikan hubungan sebab akibat dua variabel atau lebih, dengan mengendalikan pengaruh variabel lain. Dalam arti metode ini dilakukan dengan memberikan variabel bebas kepada objek penelitian untuk diketahui akibatnya dalam variabel terikat.

#### **B. Subjek dan Objek Penelitian**

1. Subjek penelitian

Subjek dalam penelitian ialah ekstrak kulit bajakah tampala (*Spatholobus littoralis* Hassk).

2. Objek penelitian

Objek dalam penelitian ialah nanoemulsi obat kumur ekstrak kulit bajakah tampala (*Spatholobus littoralis* Hassk) terhadap jamur *Candida albicans*.

#### **C. Waktu dan Tempat Penelitian**

1. Waktu penelitian

Penelitian di laksanakan dari bulan Desember sampai dengan Mei 2022

2. Tempat penelitian

Penelitian di laksanakan di Laboratorium Universitas Muhammadiyah Kalimantan Timur, Laboratorium Universitas Mulawarman dan Laboratorium Fisika Universitas Negeri Yogyakarta.

#### **D. Definisi Operasional**

1. Variabel bebas

Konsentrasi dari ekstrak bajakah tampala (*Spatholobus littoralis* Hassk).

## 2. Variabel terikat

Potensi sediaan nanoemulsi obat kumur ekstrak bajakah tampala (*Spatholobus littoralis* Hassk) sebagai antijamur sekaligus antibiofilm dalam menghambat pertumbuhan jamur dan biofilm *Candida albicans* serta evaluasi terhadap sediaan.

## 3. Variabel terkontrol

Konsentrasi ekstrak bajakah tampala (*Spatholobus littoralis* Hassk), komposisi formulasi nanoemulsi, waktu inkubasi jamur dan pertumbuhan jamur *Candida albicans*.

### E. Instrumen Penelitian

#### 1. Alat

Alat yang digunakan antara lain: Alat-alat kaca, piknometer (Iwaki), Erlenmeyer (Iwaki), tabung reaksi (Iwaki), sendok tanduk, spatula, sarung tangan (SafeGloves Latex), masker (We Maze KF94), *Laminar Air Flow* (LAF), *waterbath* (Faithful), *rotary vacuum evaporator* (BUCHI), timbangan digital (OHAUS), *viscometer* ostwald (Iwaki), vortex (Dlab), *magnetic stirrer* (Dlab), *hot plate* (Maspion), mikropipet (Dlab), *Particle Size Analyzer* (Microtac), pH meter (IONIX), autoklaf (All American), inkubator, *microtiter plate flat-bottom polystyrene 96 wells* (Iwaki), bunsen, tip, *microplate reader* (HiPo), oven (LabTech) dan lain-lain.

#### 2. Bahan

Bahan yang digunakan antara lain: ekstrak bajakah tampala, tween 80, PEG 400, *Virgin Coconut Oil* (Al Afiat), *peppermint oil*, sorbitol, natrium benzoat, etanol 96%, alkohol 70% (OneMed), media PDA (OXOID), media PDB (HIMEDIA), biakan murni *Candida albicans*, Akuadest steril, kristal violet, *Listerine*, mayer, wagner, dragendorff, NaOH, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat, Mg-HCL pekat, FeCl<sub>3</sub> 1%, FeCl<sub>3</sub> 5% dan lain-lain.

### F. Metode Pengumpulan Data

Pengumpulan data dilakukan dengan memperoleh data primer dan data sekunder. Data primer merupakan hasil yang didapat dari

pengujian dilaboratorium pembuatan formulasi nanoemulsi obat kumur ekstrak kulit bajakah tampala sebagai antifungi sekaligus terhadap jamur *C. albicans*, kemudian data sekunder adalah hasil yang didapatkan dari studi literatur berupa media cetak elektronik yang valid, berhubungan dan dapat dipertanggung jawabkan.

#### **G. Teknik Analisis Data**

Analisa data pada penelitian ini menggunakan *software* Microsoft Excel dan *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS). Pada hasil uji *microplate reader* antijamur dan antibiofilm didapatkan nilai *Optical Density* (OD), yang nantinya nilai ini yang akan dihitung pada Excel dan SPSS. Hasil nilai absorbansi (OD) dianalisa menggunakan metode *Saphiro wilk* dan *Levene test* pada SPSS untuk mengetahui persebaran data yang normal serta homogen. Hasil dikatakan normal dan homogen apabila nilai signifikasi  $> 0,05$ . Selanjutnya dilakukan uji *One Way ANOVA* untuk menguji adanya perbedaan pertumbuhan jamur setelah diberikan larutan uji ditunjukkan dengan *p-value*  $< 0,05$ . Kemudian dilakukan uji lanjutan menggunakan *Post Hoc Tukey* untuk mengetahui perbedaan bermakna hambatan pada masing-masing larutan uji.

Perhitungan persentase hambatan pada uji antijamur dan antibiofilm dihitung menggunakan Excel. Nilai MIC<sub>50</sub> (*Minimum Inhibitory Concentration 50%*) dan MBIC<sub>50</sub> (*Minimum Biofilm Inhibitory Concentration 50%*) ditentukan dengan melihat persentase hambatan  $\geq 50\%$  dengan konsentrasi yang terkecil, itulah nilai MIC<sub>50</sub> dan MBIC<sub>50</sub>.

#### **H. Alur Jalannya Penelitian**

##### **1. Penyiapan Sampel**

Sampel diperoleh di dalam hutan pedalaman yang berlokasi di provinsi Kalimantan Tengah.

## 2. Determinasi Tanaman

Bajakah Tampala yang digunakan dalam penelitian ini dideterminasi berdasarkan karakteristik morfologi yang terdapat pada tumbuhan dalam data kepustakaan.

## 3. Pembuatan Serbuk Simplisia

Pembuatan simplisia kulit bajakah tampala dimulai dengan pemisahan kulit dari batangnya, setelah itu dilakukan penimbangan berat basah. Proses selanjutnya dilakukan sortasi basah dengan dilakukan pencucian kulit menggunakan air bersih. Kulit selanjutnya dijemur dibawah sinar matahari selama 5 hari dengan ditutupi kertas plastik agar tidak terkena sinar UV langsung, setelah itu dilakukan sortasi kering guna memisahkan kulit bajakah tampala dari sisa benda asing yang masih melekat. Kulit dirajang menggunakan mesin *planner* (penyerut). Rajangan dimasukkan dalam oven pada suhu 60°C selama 2 jam agar mikroorganisme yang melekat setelah proses perajangan mati. Hasil rajangan kemudian ditimbang menggunakan neraca analitik. Kemudian dilakukan maserasi untuk menarik senyawa metabolit sekunder dari simplisia.

## 4. Pembuatan Ekstrak Kulit Bajakah Tampala

Ekstrak etanol kulit bajakah tampala dibuat menggunakan metode maserasi. Berat serbuk simplisia yang didapat dimasukkan dalam toples kaca. Selanjutnya ditambahkan etanol 96% sampai simplisia tenggelam. Jauhkan dari paparan sinar matahari selama 3 x 24 jam sambil sesekali diaduk. Hasil maserasi dipisahkan dengan proses penyaringan. Hasil saringan kemudian diuapkan dengan rotary evaporator pada suhu 50°C. Hasil saringan yang sudah mulai pekat diuapkan kembali menggunakan waterbath dengan suhu 50°C sampai terbentuk ekstrak kental (Saputera M.M.A., *et al.*, 2019).

## 5. Skrining Fitokimia

### a. Uji Alkaloid

Timbang ekstrak sebanyak 0,5 g kemudian tambahkan HCL 2N 1 ml kemudian ditambahkan aquadest 9 ml, dipanaskan di *waterbath* selama 2 menit. Diamkan hingga dingin kemudian disaring hasil *waterbath* untuk diuji filtratnya. Filtrat yang didapat dibagi ke dalam empat tabung reaksi, satu tabung reaksi dijadikan sebagai larutan kontrol, kemudian pada tiga tabung reaksi masing-masing ditambahkan 3-5 tetes sampai dengan terdapat endapan dan perubahan warna pada filtrat. Pereaksi Meyer terdapat endapan berwarna putih, pereaksi Wagner terdapat endapan berwarna coklat hingga coklat kehitaman dan pada pereaksi Dragendorff terbentuk endapan berwarna jingga atau merah (Marjoni, 2016).

### b. Uji Saponin

Ekstrak sebanyak 1 g ditimbang kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi 1 ml, lalu tambahkan 10 ml air hangat kemudian dikocok kuat selama 10 detik. Setelah terbentuk busa, diukur tinggi busa kemudian tunggu hingga 10 menit, lalu diukur kembali ketinggian busa dan terakhir tambahkan HCL 2N. Apabila busa masih ada setelah ditambahkan HCL 2N, maka ekstrak mengandung saponin (Wirasti, 2019).

### c. Uji Tanin

Diuapkan ekstrak kental kulit bajakah tampala sebanyak 0,5 g dalam 10 ml aquadest pada tabung reaksi. Disaring lalu tambahkan  $\text{FeCl}_3$  1% sebanyak 3-5 tetes atau hingga terjadi perubahan warna. Hasil positif ditunjukkan terbentuknya warna hijau kecoklatan atau biru kehitaman (Kumalasari *et al.*, 2020).

d. Uji Flavonoid

Ekstrak bajakah tampala sebanyak 0,5 g dilarutkan dalam etanol 96% sebanyak 10 ml, selanjutnya dibagi pada empat tabung reaksi. Tabung pertama sebagai tabung kontrol, tabung kedua diberikan NaOH, tabung ketiga diberikan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat dan tabung keempat diberikan Mg – HCL pekat. Hasil positif dilihat dari perubahan warna pada setiap tabung, lalu dibandingkan dengan larutan kontrol (Harborne, 2008 dalam Taher, 2011).

e. Uji Fenol

Ditimbang ekstrak sebanyak 0,5 g kemudian disaring, filtrat 1 ml dimasukkan ke tabung reaksi, lalu tambahkan FeCl<sub>3</sub> 5% sebanyak 2 – 5 tetes kedalam tabung reaksi. Jika terdapat perubahan warna biru kehijauan atau hijau itu berarti sampel positif mempunyai kandungan senyawa fenol (Khotimah K., 2016).

6. Formulasi Nanoemulsi Obat Kumur

Tabel 3.1. Formulasi Acuan Nanoemulsi

Bahan	Konsentrasi
VCO	3
Tween 80	16
PEG 400	8
Aquadest	73

(Sumber: Suciati *et al.*, 2014)

Tabel 3.2. Formulasi Nanoemulsi Obat Kumur Kulit Nanas

Bahan	Konsentrasi (%)
Ekstrak Kulit Nanas	25
VCO	2
Tween 80	20
PEG 400	10
Sorbitol	10
Natrium Benzoat	0,02
<i>Peppermint Oil</i>	3 tetes

Aquadest	Ad 100
----------	--------

(Sumber: Rahmadhani *et al.*, 2019).

Tabel 3.3. Formulasi Nanoemulsi Obat Kumur Kulit Bajakah Tampala

Bahan				
	I	II	III	IV
Ekstrak Kulit Bajakah Tampala	0%	0,5%	1%	2%
VCO	2	2	2	2
Tween 80	20	20	20	20
PEG 400	10	10	10	10
Sorbitol	10	10	10	10
Natrium Benzoat	0,02	0,02	0,02	0,02
<i>Peppermint Oil</i>	5 tetes	5 tetes	5 tetes	5 tetes
Aquadest	Ad 100	Ad 100	Ad 100	Ad 100

(Sumber: Data Primer)

#### 7. Uji Organoleptis

Uji organoleptis dilakukan dengan mengalisa formulasi mulai dari penampakan, warna, aroma dan rasa (Putri *et al.*, 2018).

#### 8. Uji Tipe Emulsi

Uji tipe emulsi dilakukan untuk melihat jenis emulsi yang terbentuk. Caranya dengan meletakkan formulasi nanoemulsi secukupnya pada plat kaca, kemudian ditetaskan *methylen blue* sebanyak 2 – 3 tetes, kemudian aduk menggunakan batang pengaduk. Jika *methylen blue* tersebar merata berarti formulasi merupakan jenis emulsi M/A (minyak dalam air), jika tidak tersebar merata atau terjadi pembentukan bitnik-bintik kecil berarti tipe emulsi yang terbentuk adalah A/M (air dalam minyak) (Syamsuni, 2006).

#### 9. Uji pH

Uji pH merupakan bagian dari kriteria pemeriksaan fisika dan kimia pada sediaan obat kumur (Pratama & Arief, 2018). pH obat kumur harus berdasarkan syarat kualitas obat kumur herbal yaitu 5 – 7 (Suryani *et al.*, 2019). Pengujian dilakukan dengan pH meter.

## 10. Uji Bobot Jenis

Pengukuran bobot jenis (BJ) menggunakan piknometer dan dilakukan pada suhu 25°C. Hal ini didasarkan pada perbandingan bobot cairan di ruang terbuka terhadap bobot air dengan volume yang sama. Sampel uji lalu dimasukkan ke dalam piknometer. Kemudian bersihkan tutup piknometer dan bagian badan piknometer yang lalu ditimbang (Mumpuni *et al.*, 2019).

$$\text{Bobot Jenis} = \frac{A_2 - A}{A_1 - A} \times \text{massa jenis air}$$

Keterangan :

- A1 : Bobot piknometer ditambah aquadest
- A2 : Bobot piknometer ditambah sampel uji
- A : Bobot piknometer kosong
- p Air : Massa jenis air = 1g/mL

## 11. Pengukuran Viskositas

Viskositas sampel uji diukur menggunakan viskometer ostwald. Viskometer diletakkan tegak berdiri dengan bantuan statif, kemudian sampel uji dituang ke dalam viskometer, selanjutnya dihisap menggunakan bulp pada bagian sisi yang kecil sampai tanda batas, lewatkan sedikit dari tanda batas agar mudah untuk persiapan memencet *stopwatch*. Biarkan sampel mengalir dari tanda atas ke tanda dibawah, setelah melewati tanda batas pertama tekan *stopwatch* dan dihitung waktu alirnya. Besar nilai viskositas bisa dihitung menggunakan rumus:

$$n_1 = \frac{p_1 \times t_1}{p_2 \times t_2} \cdot n_2$$

Keterangan :

- $\eta_1$  : Viskositas sampel (cps)



- $\eta_2$  : Viskositas air (cps)  
 $\rho_1$  : Massa jenis sampel (g/mL)  
 $\rho_2$  : Massa jenis air (g/mL)  
 $t_1$  : Waktu yang untuk melewati pipa kapiler (s)  
 $t_2$  : Waktu air untuk melewati pipa kapiler (s)

(Putri, Afrianti, & Desinta, 2018)

## 12. Pengujian Hambatan Jamur *Candida albicans*

Pengujian antijamur dilakukan dengan metode mikrodilusi. Uji dikerjakan pada *microtiter plate flat-bottom polystyrene 96 wells* dengan kadar konsentrasi sebesar 0%, 0,5%, 1%, 2%. Kontrol obat (+) yang digunakan yaitu *Listerine* dan untuk kontrol pertumbuhan (-) adalah suspensi jamur. Selanjutnya dilakukan inkubasi dengan suhu 37°C selama 72 jam. Kemudian uji nilai absorbansi dilakukan dengan *microplate reader* pada panjang gelombang 595 nm. Data yang didapatkan berupa nilai OD, data kemudian dihitung persentase hambatannya pada persamaan berikut:

$$\% \text{ hambatan} = \frac{(OD \text{ rerata kontrol negatif} - OD \text{ rerata sampel uji})}{OD \text{ rerata kontrol negatif}} \times 100\%$$

Konsentrasi sampel yang bisa menghambat paling tidak 50% terbentuknya biofilm dinyatakan sebagai MIC<sub>50</sub> (*Minimal Inhibition Concentration*) (Hamzah *et al.*, 2020).

## 13. Pengujian antibiofilm

Pada pengujian antibiofilm sebanyak 100  $\mu$ L suspensi jamur dimasukkan pada tiap lubang *plate 96 wells* yang diperlukan. Kemudian jamur diinkubasi terlebih dahulu pada suhu 36 – 37°C selama 1 jam 30 menit untuk fase perlekatan. Kemudian dicuci *plate* dengan 150  $\mu$ L aquadest steril sebanyak tiga kali untuk menghilangkan sel-sel yang tidak melekat. Sebanyak 100  $\mu$ L sampel dengan konsentrasi 0%, 0,5%, 1% dan 2% ditambahkan ke lubang

wells plate yang diperlukan dan telah dicuci. Suspensi jamur digunakan sebagai kontrol pertumbuhan. Sebagai kontrol obat diberikan suspensi mikroba yang ditambahkan obat kumur *Listerine*. Selanjutnya dilakukan inkubasi dengan suhu 36 – 37°C selama 24 jam untuk fase pertengahan dan selama 48 jam untuk fase pematangan. Kemudian dicuci *plate* dengan air suling sebanyak tiga kali bilas, lalu keringkan pada suhu kamar selama 5 menit. Sebanyak 125 µL kristal violet 1% dimasukkan ke dalam setiap lubang wells yang digunakan untuk memberikan warna pada biofilm yang terbentuk. Selanjutnya *plate* diinkubasi pada suhu kamar selama 15 menit. Setelah itu dicuci dengan air mengalir sebanyak tiga kali untuk menghilangkan kristal violet pada *plate*, setelah itu tambahkan 200 µL etanol 96% pada setiap sumuran yang digunakan untuk melarutkan biofilm. Pembacaan nilai absorbansi (OD) menggunakan *microplate reader* dengan panjang gelombang 595 nm. Pengujian dilakukan dengan tiga duplikasi pada *wells plate*. Data yang didapatkan berupa nilai OD, data kemudian dihitung persentase hambatan pada persamaan berikut:

$$\% \text{ hambatan} = \frac{(OD \text{ rerata kontrol negatif} - OD \text{ rerata sampel uji})}{OD \text{ rerata kontrol negatif}} \times 100\%$$

Konsentrasi sampel yang bisa menghambat paling tidak 50% terbentuknya biofilm dinyatakan sebagai MBIC<sub>50</sub> (*Minimal Biofilm Inhibition Concentration*) (Hamzah *et al.*, 2020).

#### 14. Pengukuran Distribusi Ukuran Partikel

Pengukuran menggunakan alat *Particle Size Analyzer* (PSA) merk Microtac. Formula nanoemulsi mempunyai *droplet size* rata-rata <100 nm (Auburn *et al.*, 2004).

#### 15. Pengukuran Potensi Zeta

Potensi zeta diukur menggunakan alat PSA merk Microtac (Auburn *et al.*, 2004).

## I. Jadwal Penelitian

Tabel 3.4. Jadwal Penelitian

		Bulan						
No	Jenis Kegiatan	NOV	DES	JAN	FEB	MAR	APR	MEI
1.	Pengajuan proposal penelitian							
2.	Seminar proposal							
3.	Pencarin dan Determinasi							
4.	Penelitian laboratorium							
5.	Pengolahan data							
6.	Penyusunan hasil dan pembahasan							
7.	Seminar/ujian hasil							