

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode penelitian eksperimental yaitu penelitian yang dilakukan dengan mengadakan manipulasi terhadap objek penelitian serta adanya kontrol (Nazir, 2005).

B. Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain Rancangan Acak Lengkap (RAL), karena penelitian ini dilakukan di dalam laboratorium dengan kondisi yang relatif homogen. Penelitian dilakukan dengan melihat aktivitas antifungi dari ekstrak etanol daun *Syzygium polyanthum* terhadap pertumbuhan jamur *Candida albicans*.

Sebelum dilakukan uji aktivitas daya hambat antifungi, dilakukan pembuatan kurva tumbuh jamur *C. albicans* untuk mengetahui waktu jamur memiliki laju pertumbuhan tertinggi (fase logaritmik). Penelitian dilakukan dengan metode *Disc-diffusion* untuk uji aktivitas daya hambat ekstrak, *macro-dilution* untuk uji *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC), dan metode lempeng agar untuk uji *Minimum Fungicidal Concentration* (MFC). Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi dan pemisahan pelarut dengan menggunakan *Rotary evaporator*. Pelarut yang digunakan pada penelitian ini adalah etanol Absolut (*Analyst*).

Penelitian ini menggunakan konsentrasi ekstrak etanol daun salam (*S. polyanthum*), yaitu 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, dan 2,5% (b/v) untuk uji aktivitas daya hambat ekstrak dan konsentrasi 0,5%, 1%, 1,5%, dan 2% (b/v) untuk uji MIC dan MFC (modifikasi Noveriza & Miftakhurohmah, 2010). Kontrol negatif menggunakan DMSO 1% dan kontrol positif menggunakan ketoconazol dengan konsentrasi 30 mg/mL. Setiap perlakuan dalam penelitian ini mendapatkan pengulangan yang diperoleh dari rumus pengulangan RAL sebagai berikut: $t(r-1) \geq 20$, dimana t adalah perlakuan dan r adalah banyaknya pengulangan (Gomez, 1995).

$$t(r-1) \geq 20$$

$$7(r-1) \geq 20$$

$$7r - 7 \geq 20$$

$$7r \geq 27$$

$$r \geq 3,8 \sim 4$$

Berdasarkan perhitungan di atas, maka banyaknya pengulangan yang dilakukan dibulatkan menjadi empat kali pengulangan. Parameter yang diukur dalam penelitian ini adalah diameter zona hambat, nilai MIC dan MFC dari setiap konsentrasi ekstrak etanol daun *Syzygium polyanthum*. Data diameter zona hambat dari masing-masing konsentrasi ekstrak etanol daun *S. polyanthum* kemudian diolah dengan menggunakan SPSS 16.0 for windows.

C. Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi dalam penelitian ini adalah tanaman *Syzygium polyanthum* sedangkan untuk sampel adalah tanaman *S. polyanthum* yang ditanam di pekarangan rumah di daerah Sukabumi. Daun yang digunakan merupakan daun yang telah berwarna hijau tua dengan kematangan sedang yaitu tidak terlalu muda dan tidak terlalu tua (Sembiring *et al.*, 2003).

D. Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Maret sampai Juni 2011 yang dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Pendidikan Biologi, FPMIPA UPI, Jalan Dr. Setiabudi No. 229 Bandung.

E. Alat dan Bahan

Tabel 3.1 Alat Penelitian

No.	Nama Alat	Spesifikasi	Jumlah
1	Blender	National	1 unit
2	<i>Autoclave</i>	HL36AE	1 unit
3	<i>Waterbath</i>	EYELA NTT-1100	1 unit
4	Lemari inkubator	Gllenkamp	2 unit
5	<i>Laminar air flow</i>		1 unit
6	Timbangan digital	AND HF-300	1 unit
7	<i>Colony counter</i>	SIBATA	1 unit
8	<i>Spectrophotometer</i>	Milton Roy Spectronic 20D	1 unit
9	<i>Hot plat and magnetic stirrer</i>		2 unit
10	Vortex mixer	Sibata TTM-1	1 unit
11	Centrifuge		1 unit
12	Alat GCMS		1 unit
13	Inkubator	Gallenkamp	1 unit
14	Lemari Es	LG	1 unit

No.	Nama Alat	Spesifikasi	Jumlah
15	Cawan Petri	Normax	35 buah
16	Gelas ukur (10 mL, 100 mL, 250 mL, 1000 mL)	Iwaki Pyrex	@1buah
17	Beaker glass (50 mL, 250 mL, 500 mL, 1000 mL)	Iwaki Pyrex Schott Duran	@2 buah
18	Tabung reaksi (20 mL)	Iwaki Pyrex	70 buah
19	Labu erlenmeyer (250 mL, 500 mL)	Iwaki Pyrex Schott Duran	@3 buah
20	Mikropipet (20 μ L-200 μ L)	Socorex Calibra 822	1 buah
21	Makropipet (1 mL, 5 mL, 10 mL)	Socorex Calibra 822	@ 1 buah
22	Cuvette	Pyrex	5 buah
23	Pinset	-	4 buah
24	Spatula	-	2 buah
25	Corong	-	2 buah
26	Batang pengaduk kaca	-	2 buah
26	Kaca arloji	-	2 buah
27	Batang L	-	2 buah
29	Lampu spiritus	-	2 buah
30	Bunsen	-	1 unit
31	Jangka sorong	Caliper	1 buah
32	Jarum inokulasi	-	2 buah
33	Pipet tetes	-	2 buah
34	Kertas saring	Whatman no. 1	secukupnya
35	Kertas cakram	Whatman no. 1	\pm 150 keping
36	pH meter	Universal	1 buah
37	Botol kaca gelap	-	10 buah

Tabel 3.2 Bahan Penelitian

No.	Nama Bahan	Spesifikasi	Jumlah
1	Tanaman <i>Syzygium polyanthum</i>	Daun	500 gram
2	Biakan murni <i>Candida albicans</i>	ATCC 10231 Farmasi ITB	1 tabung reaksi
3	<i>Potato Dextrose Agar</i> (PDA)	Conda dan Acumedia	2 liter
4	<i>Potato Dextrose Cair</i> (PD)	-	1 liter
5	Dextrose	Wako pure Chemical	22 gram
6	NaCl 0.85%	Medilabs	3 gram
7	BaCl ₂	P.A, Chemicals	0,5 gram

No.	Nama Bahan	Spesifikasi	Jumlah
8	H ₂ SO ₄ 1%	P.A, Merck	2 mL
9	Etanol	Absolut, Merck	200 mL
10	DMSO (Dimethyl Sulfoxide) absolut 1%	P.A, Merck	1 mL
11	Alkohol 70%	-	500 mL
12	Aquades	-	10 liter
13	Spiritus	-	1 liter
14	Aluminium foil	-	1 gulung
15	Plastik anti panas	Diamond	1 bungkus
16	Kain kassa	Nasa Husada	5 gulung
17	Kapas	Nasa Husada	100 gram
18	Ketoconazole	Kimia Farma	2 gram
19	Tissue gulung	Multi	5 gulung

F. Prosedur Penelitian

1. Tahap Persiapan

a. Identifikasi Daun *Syzygium polyanthum* (Wight) Walp.

Tahap awal penelitian, dilakukan identifikasi daun *Syzygium polyanthum* yang mengacu pada kunci identifikasi Becker & Brink (1963).

b. Pembuatan Medium Kultur Jamur

Medium yang digunakan untuk mengkultur jamur *Candida albicans* adalah *Potato Dextrose Agar* (PDA) dan *Potato Dextrose Broth* (PDB). Medium PDA dibuat dengan melarutkan 39 gram PDA dalam 1000 mL akuades. Medium PDB dibuat dengan merebus 200 gram kentang yang dipotong kecil-kecil dalam 1000 mL akuades hingga kentang empuk, kemudian disaring sehingga didapatkan ekstrak kentang. Ekstrak kentang ditambahkan 20 gram dextrose dan dilarutkan dalam akuades sampai volumenya 1000 mL.

c. Sterilisasi

Alat tahan panas, bahan dan medium yang akan digunakan untuk penelitian disterilisasi dengan menggunakan *autoclave* selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm. Sebelumnya, alat-alat dicuci bersih, dikeringkan, dan dibungkus dengan kertas (Cappuccino & Sherman, 2005). Alat yang tidak tahan panas disterilkan dengan menggunakan alkohol 70%.

2. Tahap Pelaksanaan

a. Ekstraksi Bahan

Daun salam (*Syzygium polyanthum*) yang akan digunakan sebagai simplisia dipanen dan dibersihkan dengan mencucinya menggunakan air kran, kemudian dikeringkan pada tempat yang tidak langsung terkena matahari dengan cara diangin-anginkan supaya terdapat sirkulasi udara yang baik dan kandungan senyawa kimianya tidak rusak. Proses pengeringan daun dilakukan hingga daun kering atau beratnya konstan. Daun yang telah kering (Gambar 3.1 a), dihancurkan dengan menggunakan blender sampai halus sehingga berbentuk serbuk yang siap untuk diekstraksi (Gambar 3.1 b).



(a)



(b)

Gambar 3.1 (a) Daun Salam (*S. polyanthum*) yang Telah Dikeringkan
(b) Serbuk Daun Salam (*S. polyanthum*)

Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan metode maserasi (Patel *et al.*, 2009). Simplisia berupa serbuk sebanyak 50 gram ditambahkan pelarut etanol Absolut (*Analyst*) sebanyak 200 mL (1:4) (Doughari, 2006), kemudian diaduk dan dimaserasi selama 24 jam. Simplisia yang telah direndam selanjutnya disaring dengan menggunakan kertas saring Whatman No.1. Ekstrak etanol daun salam selanjutnya dievaporasi dengan menggunakan *Rotary evaporator* pada suhu 50°C, kemudian dipisahkan dari pelarut etanol menggunakan *waterbath*.

b. Pembuatan Standar Turbiditas Inokulum

Untuk menentukan aktivitas antifungi, kultur jamur disesuaikan dengan konsentrasi standar 0.5 McFarland (10^6 CFU/mL) (Doughari, 2006). Standar turbiditas McFarland biasanya digunakan untuk standarisasi perkiraan jumlah jamur dalam suspensi cair secara visual, dengan membandingkan turbiditas suspensi uji dengan standar turbiditas McFarland. Standar McFarland yang umum digunakan untuk uji aktivitas antimikroba adalah 0.5, yang dianggap sesuai $1\sim 5 \times 10^6$ CFU/mL.

c. Pembuatan Kurva Tumbuh dan Kurva Baku *Candida albicans*

Metode pembuatan kurva tumbuh ini dinamakan metode turbidimetri. Jamur uji disubkultur pada medium agar miring PDA pada suhu 37°C selama 2 x 24 jam. Kemudian diambil sedikit biakan jamur dengan menggunakan jarum inokulasi dan dimasukkan ke dalam 4 mL larutan fisiologis (NaCl 0,85%). Setelah itu dibandingkan kekeruhannya sesuai dengan standar turbiditas 0.5 McFarland 530 nm untuk mendapatkan jumlah inokulum yang

dianggap sesuai dengan 5×10^6 CFU/mL. Inokulum yang telah siap diambil 3 mL (5% dari medium inokulasi) dan diaktivasi ke dalam 50 mL Medium PDB (*potato dextrose broth*) steril, lalu inkubasikan pada suhu 37°C . Untuk mendapatkan kurva tumbuh *Candida albicans* yang lengkap, maka sel dipanen setiap interval waktu 2 jam selama 1 x 24 jam, dari labu kultur inokulum diambil sebanyak 4-5 mL, lalu dimasukkan ke dalam *cuvette*. Kemudian nilai absorbansi diukur dengan menggunakan *Spectrophotometer* dengan panjang gelombang 530 nm. Selanjutnya dibuat kurva tumbuh yang didasarkan pada hubungan nilai absorbansi (sumbu Y) dengan waktu (sumbu X), dari kurva tumbuh ini dapat diketahui umur inokulum pada saat mencapai fase logaritmik dan selanjutnya dilakukan pembuatan kurva baku.

Pembuatan kurva baku didasarkan pada hasil pembuatan kurva tumbuh yaitu pada saat pertumbuhan jamur mencapai fase logaritmik. Biakan yang diambil untuk pembuatan kurva baku *C. albicans*, yaitu pada jam ke-8, 10, 12, dan 14. Untuk mendapatkan kurva baku *C. albicans*, jumlah sel dihitung dengan cara biakan pada medium cair diambil 1 mL, kemudian dimasukan ke dalam 9 mL aquades steril dan dilakukan pengenceran sampai 10^{-6} . Pada pengenceran 10^{-4} , 10^{-5} , dan 10^{-6} dilakukan *pour plate* (cawan tuang) secara duplo dengan cara diambil 1 mL biakan, lalu dimasukkan ke dalam cawan Petri steril kemudian ditambahkan 9 mL Medium PDA cair. Biakan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah 24 jam, jumlah koloni jamur yang tumbuh dihitung sampai mendapatkan waktu yang terbaik untuk dijadikan inokulum pada uji aktivitas selanjutnya.

Kurva baku dilakukan untuk menentukan usia inokulum pada fase logaritmik yang memiliki nilai laju pertumbuhan yang tertinggi sebagai tahapan awal untuk melakukan uji aktivitas daya hambat ekstrak, MIC dan MFC. Kurva baku dibuat berdasarkan nilai absorbansi dan jumlah sel jamur. Kedua variabel tersebut dihubungkan untuk memperoleh kurva baku pertumbuhan jamur *Candida albicans*. Usia inokulum yang paling tinggi laju pertumbuhannya diperoleh dari persamaan regresi. Laju pertumbuhan jamur yang paling tinggi itulah yang akan digunakan sebagai inokulum uji selanjutnya.

d. Pembuatan Konsentrasi Ekstrak

Ekstrak etanol daun *Syzygium polyanthum* yang diperoleh dari proses ekstraksi kemudian dilarutkan dengan pelarut Dimethyl Sulfoksida (DMSO) 1% untuk memperoleh konsentrasi ekstrak yang dikehendaki dalam perlakuan. Larutan yang telah diperoleh disimpan dalam botol kecil bertutup dan berwarna gelap, kemudian disimpan pada suhu 4°C.

e. Analisis Ekstrak dengan *Gas Chromatography Mass Spectrometry* (GCMS)

Pada sampel ekstrak etanol daun *S. polyanthum* dilakukan identifikasi dengan menggunakan alat GCMS untuk mengetahui jenis senyawa-senyawa kimia yang terkandung dalam ekstrak tersebut. Sampel yang akan dianalisis disiapkan, ekstrak daun *S. polyanthum* berupa pasta sebanyak 0,1 gram dilarutkan dalam 2 mL etanol Absolut (*Analyst*) kemudian dimasukkan ke dalam botol gelap. Selanjutnya dianalisis dengan GCMS.

f. Penyediaan Inokulum Jamur *Candida albicans*

Tahapan ini dilakukan dengan menginokulasikan satu ose biakan jamur *Candida albicans* yang telah disubkultur pada Medium PDA selama 2 x 24 jam ke dalam 50 mL Medium *Potato Dextrose broth* (PDB) steril, kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C. Inokulum jamur diaktivasi hingga mencapai fase logaritmik dengan laju pertumbuhan tertinggi yaitu pada jam ke-14. Inokulum yang berumur 14 jam dipanen sebanyak 10 mL dan dimasukkan ke dalam tabung *Eppendorf* steril, kemudian di sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Pelet dan supernatan yang dihasilkan lalu dipisahkan. Pelet tersebut dicuci dengan larutan fisiologis (NaCl 0,85%) steril kemudian di sentrifugasi kembali. Proses pencucian ini dilakukan sebanyak dua kali. Pelet yang dihasilkan disuspensikan kembali dengan larutan NaCl 0,85% steril dan disesuaikan turbiditasnya dengan standar turbiditas 0.5 McFarland (Ogunmwonyi, *et al.*, 2010; Nazemiyeh, *et al.*, 2011) dengan panjang gelombang 530 nm untuk mendapatkan jumlah inokulum jamur $1\sim 5 \times 10^6$ sel/mL (Scorzoni *et al.*, 2007).

3. Tahap Perlakuan

a. *Disc-diffusion*

Pengujian aktivitas antifungi tahap awal dilakukan menggunakan metode *disc-diffusion* dengan teknik *spread plate*. Medium yang digunakan pada metode ini yaitu Medium *Potato Dextrose Agar* (PDA). Sebanyak 9 mL Medium PDA cair ditempatkan ke dalam cawan Petri, medium dibiarkan

hingga memadat. Penutup setiap cawan Petri diberi label sesuai dengan isolat dan konsentrasi ekstrak yang akan diuji.

Suspensi inokulum jamur *Candida albicans* yang telah disesuaikan dengan standar turbiditas 0.5 McFarland disiapkan, kemudian diambil sebanyak 200 μ L suspensi inokulum jamur, dan ditetaskan ke atas permukaan PDA yang telah memadat di dalam cawan Petri, lalu inokulum diratakan di atas permukaan Medium PDA dengan menggunakan batang L steril. Kertas cakram direndam ke dalam setiap konsentrasi ekstrak selama 1 menit dan ditempelkan ke atas permukaan medium yang telah bercampur biakan jamur dengan menggunakan pinset steril. Cakram ditekan perlahan untuk memastikan cakram menempel pada medium. Hal yang sama dilakukan untuk kontrol positif dan negatif. Kultur diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah inkubasi, lempeng agar diamati inhibisi pertumbuhannya dengan mengukur diameter daerah bening disekitar cakram (Cappuccino and Sherman, 2005).

b. *Minimum Inhibitory Concentration (MIC)*

Pengujian ini dilakukan dengan menggunakan metode *macro-dilution*. Sebanyak 4 mL Medium *Potato Dextrose Broth* (PDB) steril dimasukkan ke dalam tabung steril. Sebanyak 900 μ L suspensi inokulum yang telah disesuaikan dengan standar 0.5 McFarland ditambahkan ke dalam tabung yang berisi 4 mL PDB. Lalu 100 μ L *aliquot* dari masing-masing konsentrasi ekstrak dimasukkan ke dalam tabung yang telah berisi PDB 4 mL dan 900 μ L suspensi jamur uji. Untuk tabung kontrol positif dengan antibiotik

ketokonazol serta untuk kontrol negatif dengan DMSO 1% dilakukan dengan cara yang sama. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dan diamati pertumbuhan dan nilai MIC. Penentuan nilai MIC dilakukan secara kasat mata dengan melihat kekeruhan kultur jamur pada setiap konsentrasi ekstrak, kultur jamur dengan konsentrasi ekstrak terendah yang menunjukkan adanya penghambatan pertumbuhan jamur *Candida* dinyatakan sebagai nilai MIC (Himratul-Aznita *et al.*, 2011).

c. *Minimum Fungicidal Concentration (MFC)*

Penentuan nilai MFC dilakukan dengan metode lempeng agar. MFC ditentukan dengan mengambil 1 mL inokulum dari setiap tabung reaksi pada penentuan MIC. Inokulum diinokulasi dengan cara dimasukkan ke dalam cawan Petri, kemudian ditambahkan 9 mL Medium PDA yang telah mencair, diratakan dan dibiarkan hingga memadat. *Plate* diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Parameter pada uji ini yaitu dengan menghitung jumlah koloni jamur yang tumbuh pada lempeng agar (Doughari, 2006). Nilai MFC adalah konsentrasi dimana tidak ada pertumbuhan yang diperoleh untuk memberikan sekitar 99-99,5% aktivitas membunuh (Himratul-Aznita *et al.*, 2011).

G. Analisis Data

Data hasil uji aktivitas daya hambat ekstrak dengan metode *disc-diffusion* dianalisis dengan uji statistik menggunakan program SPSS versi 16.0 *for window* untuk mengetahui aktivitas ekstrak etanol daun *Syzygium polyanthum* terhadap pertumbuhan *Candida albicans*. Data yang diperoleh terlebih dahulu dilakukan uji normalitas (*Kolmogorov smirnov*). Selanjutnya dilakukan uji homogenitas (*Levene Test*) untuk mengetahui variasi data hasil eksperimen dan kontrol. Data aktivitas ekstrak etanol daun *S. polyanthum* terhadap pertumbuhan jamur *C. albicans* tidak berdistribusi normal dan homogen, maka analisis data dilanjutkan dengan uji non parametrik *Kruskal-Wallis* untuk menguji hipotesis.

