

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi adalah semua objek yang menjadi sasaran penelitian pengambilan sampel. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun salam (*Syzygium polyanthum* (Wight) Walp.) yang diperoleh dari daerah Badegan, Ponorogo, Jawa timur pada tanggal 25 Desember 2018.

2. Sampel

Sampel merupakan bagian dari populasi yang menjadi sumber informasi bagi data yang diperlukan guna sebagai menjawab permasalahan suatu penelitian. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun salam dengan kualitas baik seperti daun yang tua dan segar, tidak berpenyakit, permukaan daunnya tidak rusak dan bentuknya utuh.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama pertama dalam penelitian adalah ekstrak etanol 96% daun salam (*Syzygium polyanthum* (Wight) Walp.), fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air dari ekstrak etanolik daun salam.

Variabel utama kedua pada penelitian ini adalah aktivitas antijamur fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air daun salam terhadap jamur *Pityrosporum ovale* ATCC 3179.

2. Klasifikasi Variabel Utama

Variabel utama yang telah diidentifikasi dapat diklasifikasikan yaitu variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkendali.

2.1. Variabel Bebas. Variabel bebas adalah variabel yang direncanakan untuk diteliti dapat mempengaruhi variabel tergantung. Variabel bebas yang dimaksud dalam penelitian ini adalah fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air dari ekstrak etanolik daun salam (*Syzygium polyanthum* (Wight) Walp.).

2.2. Variabel Terkendali. Variabel terkendali adalah sesuatu yang dianggap dapat mempengaruhi jalannya penelitian. Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah kemurnian jamur uji *Pityrosporum ovale* ATCC 3179, sterilitas, suhu, kondisi laboratorium, media, konsentrasi sampel uji, metode dan kondisi penelitian.

2.3. Variabel Tergantung. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah aktivitas antijamur fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi air dari ekstrak etanol daun salam (*Syzygium polyanthum* (Wight) Walp.).

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, daun salam adalah daun yang diperoleh dari tanaman salam (*Syzygium polyanthum* (Wight) Walp.) yang di ambil dari daerah Ponorogo, Jawa Timur pada tanggal 25 Desember 2018.

Kedua, serbuk daun salam adalah daun salam yang telah dicuci dengan air mengalir kemudian dikeringkan dalam alat pengering (oven) pada suhu 40°C, lalu diserbuk dan diayak dengan ayakan no. 40.

Ketiga, ekstrak etanol daun salam adalah hasil ekstraksi daun salam dengan larutan penyari etanol 96% menggunakan metode maserasi selama 5 hari kemudian dipekatkan menggunakan evaporator pada suhu 40°C dan dilanjutkan dengan fraksinasi.

Keempat, fraksi *n*-heksana adalah fraksi dari ekstrak etanol 96% daun salam yang difraksinasi dengan pelarut *n*-heksana, kemudian dipekatkan dengan *evaporator* sehingga didapat fraksi *n*-heksana.

Kelima, fraksi etil asetat adalah fraksinasi dari residu *n*-heksana daun salam dengan menggunakan etil asetat, kemudian dipekatkan dengan *evaporator* sehingga didapat fraksi etil asetat.

Keenam, fraksi air adalah hasil fraksinasi dari residu etil asetat daun salam dengan menggunakan air.

Ketujuh, *Pityrosporum ovale* ATCC 3179 adalah jamur *Pityrosporum ovale* ATCC 3179 yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Farmasi Universitas Setia Budi, Surakarta.

Kedelapan, uji aktivitas antijamur adalah metode difusi dan dilusi untuk fraksi teraktif. Metode difusi dengan mengukur luas daerah hambat yaitu daya hambat terhadap pertumbuhan jamur, dengan kontrol negatif DMSO 5% dan kontrol positif antibiotik ketokonazol. Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) ditentukan berdasarkan hasil tabung rekasi, sedangkan KFM (Konsentrasi Fungisidal Minimum) ditentukan berdasarkan hasil pengamatan pada media. Metode dilusi yaitu berupa seri pengenceran dalam berbagai konsentrasi dengan cara penapisan hingga konsentrasi akhir sebagai berikut : 50%; 25%; 12,5%; 5,6%; 3,12%; 1,65%; 0,78%; 0,39%; 0,19%; 0,09%.

C. Bahan dan Alat

1. Bahan

Bahan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun salam (*Syzygium polyanthum* (Wight) Walp.) yang diperoleh dari daerah Ponorogo, Jawa Timur pada tanggal 25 Desember 2018. Jamur yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Pityrosporium ovale* ATCC 3179 yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Farmasi Setia Budi, dengan menggunakan media yang digunakan dalam penelitian ini adalah SDA (*Sabround Dekstrosa Agar*), SGC (*Sabround Glukosa Cair*).

Bahan kimia yang digunakan adalah etanol 96%, *n*-heksana, etil asetat, aquadest steril, HCl, H₂SO₄ pekat, CH₃COOH, Mc Farland 0,5, ketokonazol, spiritus, amil alkohol, indikator fenol red, serbuk Mg, butanol, asam asetat, kloroform, methanol, *n*-butanol, aquadest, FeCl₃, Liberman bouchard, sitroborat.

2. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah oven dengan suhu rendah dan konstan, alat penyerbuk, *Sterling Bidwell*, timbangan analitik, *vacuum rotary evaporator*, alat maserasi, corong, botol cairan penyari, kertas saring, botol maserator, pinset. Alat gelas lain yang digunakan seperti gelas ukur, batang pengaduk, tabung reaksi, cawan penguap, corong pisah, alat untuk uji kualitatif seperti tabung reaksi, cawan petri.

Alat uji aktivitas antijamur digunakan adalah autoklaf, inkubator, inkas, jarum ose, tabung reaksi, oven, lampu spiritus, kapas lidi steril, beaker glass, pipet ukur, pinset, dan cawan petri.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi Tanaman

Tahap pertama dari penelitian ini adalah melakukan determinasi tanaman salam (*Syzygium polyanthum* (Wight) Walp.) yang dimaksudkan untuk menetapkan kebenaran sampel daun salam (*Syzygium polyanthum* (Wight) Walp.) dengan mencocokkan ciri-ciri morfologi yang ada dalam tanaman salam terhadap pustaka dan dibuktikan di Laboratorium Morfologi Sistemika Tumbuhan Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi, Surakarta.

2. Pengambilan Bahan

Sampel helaian daun salam yang diambil secara acak dengan memilih daun yang tidak terlalu tua dan tidak terlalu muda, berwarna hijau, segar dan bebas dari hama diambil dari daerah Badegan, Kecamatan Badegan, Ponorogo, Jawa Timur pada tanggal 25 Desember 2018.

3. Pengeringan Bahan

Daun salam yang sudah dibersihkan, dikeringkan menggunakan oven 50°C -60°C kemudian di haluskan dengan mesin penghancur. Tujuan dari pengeringan ini adalah untuk mengurangi kadar air pada tanaman sehingga dapat mencegah terjadinya perubahan kimiawi, reaksi enzimatik dan dapat terhindar dari pertumbuhan jamur dan bakteri yang tidak diinginkan serta dapat memudahkan dalam proses pembuatan serbuk (Depkes 1987).

4. Pembuatan Serbuk Simplisia

Daun salam yang telah dipanen, dibersihkan agar terhindar dari kotoran atau benda asing lainnya menggunakan air mengalir, kemudian dikeringkan dengan oven pada suhu 40°C sampai menjadi kering. Selanjutnya untuk mendapatkan serbuk simplisia maka simplisia digiling dan terakhir diayak dengan menggunakan ayakan no. 40 (Depkes 1987).

5. Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Salam Metode Maserasi

Metode ekstraksi daun salam dalam penelitian ini menggunakan metode maserasi. Serbuk kering dimasukkan ke dalam alat maserator, kemudian ditambahkan larutan penyari dengan perbandingan 1:7,5 hingga seluruh sampel terendam. Perendaman dilakukan selama 5 hari dengan sesekali digojog. Peras ampas kemudian sari diencerkan. Ampas dicuci dengan cairan penyari secukupnya hingga diperoleh 100 bagian. Rendemen yang diperoleh adalah persentase bobot (b/b) antara rendemen dengan bobot serbuk simplisia (Depkes 2008). Skema dapat dilihat pada gambar 4.

6. Penetapan Kadar Air

Penetapan kadar air dilakukan dengan menggunakan alat *Sterling-Bidwell*. Timbang serbuk/ekstrak daun salam 10 gram lalu dimasukkan ke dalam labu destilasi dan ditambahkan pelarut toluen kurang lebih 200 ml hingga serbuk terendam. Alat *Sterling-Bidwell* dipasang dan dipanaskan dengan penangas air. Pemanasan dihentikan apabila pada penampung tidak menetes lagi dan dilanjutkan dengan mengukur kadar air dengan melihat volume pada skala alat. Penetapan dilakukan sebanyak 3 kali replikasi (Kemenkes RI 2001).

7. Penetapan susut pengeringan

Susut pengeringan adalah pengurangan berat bahan setelah dikeringkan dengan cara yang telah ditetapkan. Kecuali dinyatakan lain dalam masing-masing monografi, simplisia harus dalam bentuk serbuk dengan derajat halus nomor 8, suhu pengeringan 105°C dan susut pengeringan ditetapkan sebagai berikut: alat dikalibrasi terlebih dahulu, plat aluminium ditara dan ditimbang, kemudian sampel dimasukkan ke dalam plat sebanyak 5 g. Alat di set dengan suhu 105°C selama 4 menit atau sampai bobot tetap (DepKes 2000).

8. Fraksi dari Ekstrak Etanol Daun Salam

Fraksi daun salam yang telah dikentalkan dengan cara menimbang 10 gram ekstrak etanol daun salam dari maserasi kemudian dilarutkan dengan pelarut air 75 ml, difraksinasi dengan pelarut *n*-heksana sebanyak tiga kali dengan masing-masing 75 ml, fraksi *n*-heksana yang diperoleh dipekatkan. Residu yang diperoleh dari fraksi *n*-heksana kemudian difraksinasi dengan etil asetat sebanyak

tiga kali dan masing-masing dengan 75 ml pelarut etil asetat. Hasil yang diperoleh adalah fraksi etil asetat kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator*, dan fraksi air dipekatkan dengan *waterbath* sampai larut lalu ditimbang.

9. Penetapan Bobot Jenis Ekstrak Daun Salam

Penetapan bobot jenis ekstrak untuk memberikan gambaran kandungan kimia yang terlarut pada suatu ekstrak (Depkes RI, 2000). Piknometer ditimbang dengan volume tertentu dalam keadaan kosong. Selanjutnya piknometer diisi penuh dengan air dan ditimbang, sehingga kerapatan air dapat ditetapkan. Piknometer dikosongkan dan diisi penuh dengan 5% ekstrak daun salam yang telah diencerkan dengan pelarut etanol, kemudian ditimbang sehingga kerapatan ekstrak daun salam dapat ditetapkan (Utami 2016). Bobot jenis dilakukan pada suhu kamar.

$$BJ = \frac{\text{kerapatan ekstrak}}{\text{kerapatan air}}$$

10. Uji Kandungan Kimia Serbuk dan Ekstrak Daun Salam

9.1. Identifikasi Steroid/Terpenoid. Ekstrak pekat dilarutkan dalam 0,5 ml kloroform kemudian ditambah dengan anhidrat asetat 5 tetes dan asam sulfat pekat 5 tetes melalui dinding tabung. Hasil positif ditunjukkan dengan perubahan warna menjadi biru atau hijau untuk steroid dan merah jingga atau coklat kemerahan untuk triterpenoid (Setyowati *et al.* 2014).

9.2. Identifikasi Flavonoid. Sejumlah 0,5 gram bahan uji dilarutkan dalam 5 mL air, kemudian dimasukkan tabung reaksi dan dipanaskan lalu saring. Filtrat yang diperoleh di tambah serbuk Mg secukupnya, kemudian ditambah 1 mL asam sulfat pekat dan 2 mL etanol. Terbentuk warna merah menunjukkan hasil positif senyawa flavonoid (Tiwari *et al.* 2011).

9.3. Identifikasi Tanin. Sebanyak 1 mg bahan uji dilarutkan kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 1 mL larutan FeCl₃ 10%. Kocok hingga homogen, jika terbentuk warna biru kehitaman atau hijau kehitaman menunjukkan positif mengandung senyawa tanin (Robinson 1995).

9.4. Identifikasi Saponin. Sebanyak 2 mg bahan uji ditambahkan dengan aquadest 5 mL kemudian dikocok vertical selama 10 detik. Hasil positif

ditunjukkan dengan timbulnya busa stabil selama 10 menit tinggi 1-10 cm. pada penambahan 1 tetes HCl 2N busa tidak hilang (Setyowati *et al* 2014).

9.5. Alkaloid. Sebanyak 2 mg bahan uji ditambahkan 1 mL HCl 2N dan 6 ml air suling, kemudian dipanaskan selama 2 menit, didinginkan dan disaring. Filtrat ditambah dengan 2-4 tetes pereaksi mayer/dragendrof. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya endapan putih kekuningan dengan pereaksi mayer dan kekeruhan atau endapan jingga kecoklatan dengan dragendrof (Setyowati *et al* 2014).

11. Sterilitas

Media yang digunakan dalam penelitian ini disterilkan dengan menggunakan autoclave selama 15 menit pada suhu 121°C. Cawan petri dan tabung reaksi disterilkan selama 2 jam dengan oven pada suhu 170°C-180°C, sedangkan jarum ose disterilkan langsung menggunakan lampu spiritus didalam inkas yang sudah disterilkan dengan formalin (Suriawira 2005).

12. Pembuatan stok jamur uji *Pityrosporum ovale* ATCC 3179

Mengambil biakan murni *Pityrosporum ovale* ATCC 3179 sebanyak 1-2 ose, lalu menggoreskan pada media *Sabouraud Dektrosa Agar* (SDA) pada tabung dan inkubasi selama 2-3 hari pada suhu kamar. Hasil inkubasi digunakan untuk stok jamur uji *Pityrosporum ovale* ATCC 3179.

13. Pembuatan Suspensi Jamur *Pityrosporum ovale* ATCC 3179

Jamur uji *Pityrosporum ovale* ATCC 3179 diambil 1-2 ose dari biakan jamur dan dimasukkan dalam tabung reaksi yang berisi 10 mL larutan SGC. Campuran dikocok hingga homogen hingga didapatkan kekeruhan standar Mc Farland 0,5 dengan konsentrasi $1-5 \times 10^6$ CFU/ml. Kemudian hasil pengenceran digunakan untuk menguji antijamur *Pityrosporum ovale* (CLSI 2012). Penggunaan Mc Farland 0,5 sebagai standar adalah untuk menggantikan perhitungan koloni jamur satu per satu dan untuk perkiraan kepadatan sel yang akan digunakan pada prosedur pengujian antijamur. Skema dapat dilihat pada gambar 7.

14. Identifikasi Jamur *Pityrosporium ovale* Berdasarkan Koloninya

13.1. Identifikasi Makroskopis. Identifikasi dilakukan dengan menggunakan media SGA yang telah diinokulasi selama 2-3 hari pada suhu 37°C. Pada identifikasi ini akan terbentuk koloni lunak berwarna krem dan bau seperti ragi, serta berbentuk lonjong tabung-tabung.

13.2. Identifikasi Mikroskopis. Identifikasi mikroskopis dilakukan menggunakan pewarnaan *Lactophenol Cotton Blue* (LCB) dengan mengambil 1 ose *Pityrosporium ovale* ATCC 3179 dari suspensi SGA dan ditanam pada kaca objek glass kemudian ditetesi *Lactophenol Cotton Blue* 1 tetes, ditutup dengan deg glass dan diamati dibawah mikroskop *Pityrosporium ovale* berkarakteristik oval, berukuran 1-2 x 2-4 mm (Sukandar et al 2006).

13.3. Identifikasi Biokimia. Identifikasi biokimia menggunakan uji gula-gula dan reaksi katalase. Identifikasi dengan menggunakan media gula dilakukan untuk memeriksa pemanfaatan sumber karbon berbeda oleh isolat. Dengan menggunakan gula sukrosa, glukosa, laktosa, dan maltosa. Media yang digunakan adalah gula dengan konsentrasi 1% dalam pepton dalam media gula di tambahkan phenol red 1%. Suspensi kultur ditambahkan ke setiap gula dan disimpan untuk diinkubasi untuk asimilasi gula selama 4-7 hari. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya perubahan warna pada media dari merah menjadi kuning. Dimana jamur dapat memfermentasi gula menjadi asam, serta adanya gelembung udara pada tabung durham menandakan jamur menghasilkan gas (Vaishali 2018). Identifikasi dengan reaksi katalase dilakukan dengan cara koloni diletakkan pada gelas objek sebanyak satu ose kemudian cairan H₂O₂ ditetaskan pada gelas objek. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya pembentukan gelembung udara pada isolat. Dimana adanya gelembung pada reaksi katalase menunjukkan bahwa isolat menghasilkan enzim katalase yang dapat mendegradasi hidrogen peroksida (H₂O₂) menjadi air dan O₂ (Karhoot 2012).

15. Pengujian Antijamur dengan Metode Difusi.

Ekstrak etanol fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi air dari daun salam yang diperoleh diuji secara mikrobiologi dengan jamur *Pityrosporium ovale* ATCC 3179. Pengujian daya antijamur dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi

Universitas Setia Budi, Surakarta. Metode yang digunakan adalah difusi dengan menggunakan *blank disc* (kertas cakram kosong) diameter 6 mm. Kapas lidi steril dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi suspensi jamur yang telah sesuai dengan standar *Mc Farland* 0,5 kemudian kapas lidi yang telah mengandung jamur dioleskan pada media SDA. Setelah olesan jamur berdifusi, larutan uji serta kontrol negatif diteteskan pada kertas cakram steril. Pembuatan konsentrasi 50% ; 25% dan 12,5% *n*-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi air menggunakan DMSO 1%. Inkubasi dilakukan selama 24-48 jam pada suhu 37°C dan diamati hasilnya. Pengamatan dilakukan untuk melihat ada tidaknya aktivitas antijamur dengan melihat kemampuan ekstrak menghambat pertumbuhan jamur pada media. Skema dapat dilihat pada gambar 6.

16. Pengujian Antijamur Daun Salam Secara Dilusi.

Memasukkan bahan uji ke dalam masing-masing tabung. Pembuatan larutan stok fraksi teraktif menggunakan pelarut DMSO, karena DMSO (Dimethyl sulfoxide) salah satu pelarut yang dapat melarutkan senyawa polar, nonpolar, dan juga tidak mempengaruhi hasil penelitian, hal ini disebabkan DMSO tidak memiliki aktivitas sebagai antijamur. Masing-masing tabung diisi dengan sediaan uji dengan konsentrasi pengenceran yang sudah ditentukan. Medium SGC dimasukkan 0,5 mL ke dalam masing-masing tabung uji secara aseptis. Tabung pertama ditambahkan 0,5 mL dan tabung kedua dimasukkan 0,5 mL bahan uji, dari tabung kedua diambil 0,5 mL dimasukkan ke dalam tabung ketiga begitu seterusnya sampai tabung kesepuluh. Suspensi jamur dalam media dimasukkan ke dalam tabung uji sebanyak 0,5 mL. Kontrol negatif berisi 1 mL, suspensi jamur dengan kontrol positif berisi 1 mL bahan uji. Seluruh tabung diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu kamar, lalu diamati kekeruhannya. Konsentrasi Fungisidal Minimum (KFM) ditentukan dengan tabung media yang jernih diinokulasi secara goresan pada media selektif untuk masing-masing jamur uji, kemudian diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu 37°C. Pengamatan dilakukan dengan melihat ada atau tidaknya koloni yang tumbuh pada permukaan media lempeng. Skema dapat dilihat pada gambar 8.

17. Identifikasi Kandungan Senyawa dari Fraksi Teraktif Daun Salam Menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

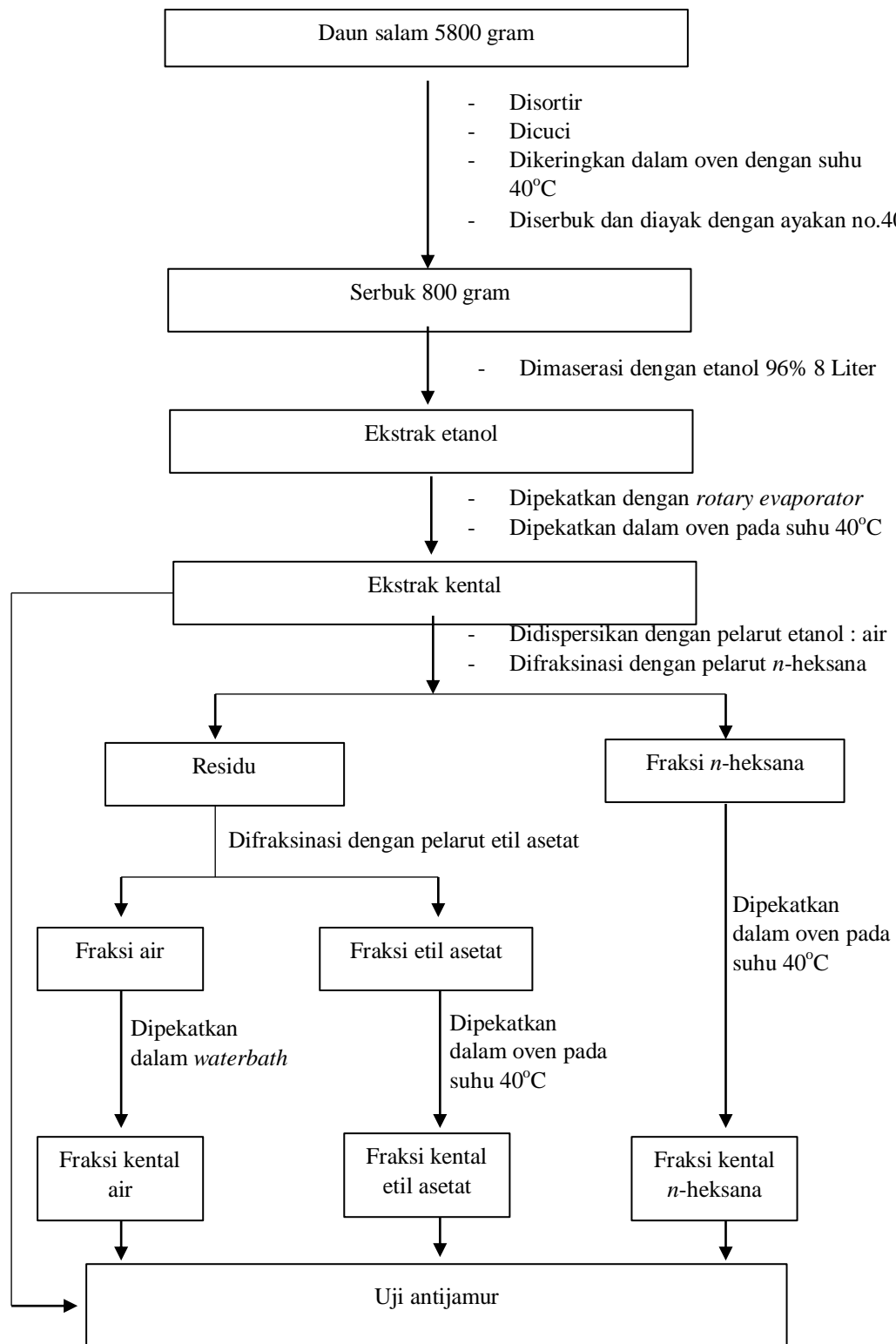
16.1. Steroid. Identifikasi steroid dengan KLT menggunakan fase gerak kloroform: metanol (9:1) dengan pereaksi *Lieberman burchard*. Pada sinar UV 356 dan UV 254 (Depkes RI 1979).

16.2. Flavonoid. Identifikasi flavonoid dengan KLT menggunakan fase gerak butanol : asam asetat : air (4:1:5) dengan pereaksi semprot sitoborat. Pada UV 254 nm memberi peredaman, UV 366 nm berfluoresensi biru, kuning, ungu gelap, dan berwarna kuning setelah diuap dengan ammonia (Harborne 2007).

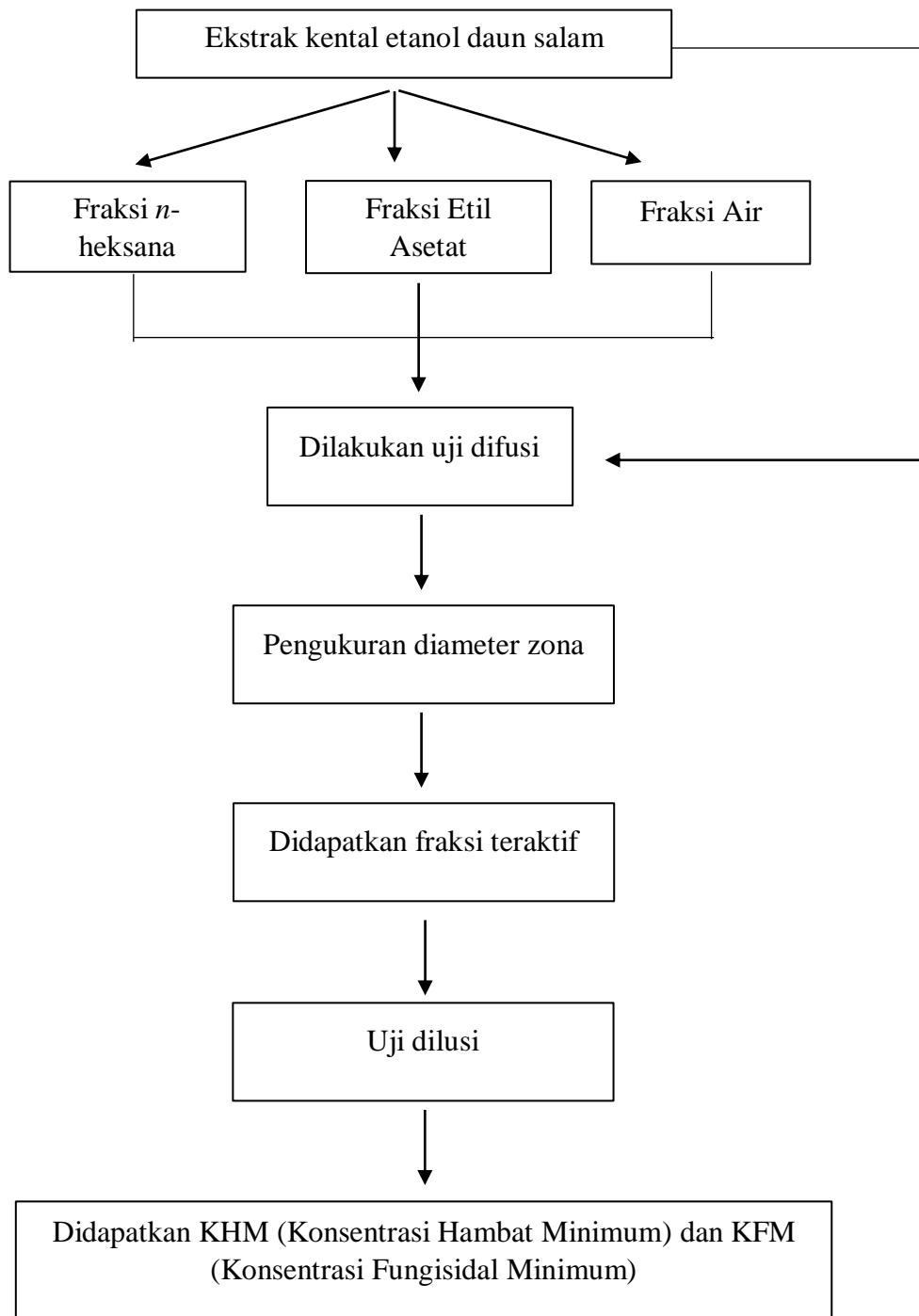
16.3. Tanin. Identifikasi tanin dengan KLT menggunakan fase n-butanol : asam asetat : air (4 : 1: 5) dengan pendeteksi FeCl_3 . Pada sinar tampak berwarna biru kehitaman (Depkes RI 1979).

E. Analisis Hasil

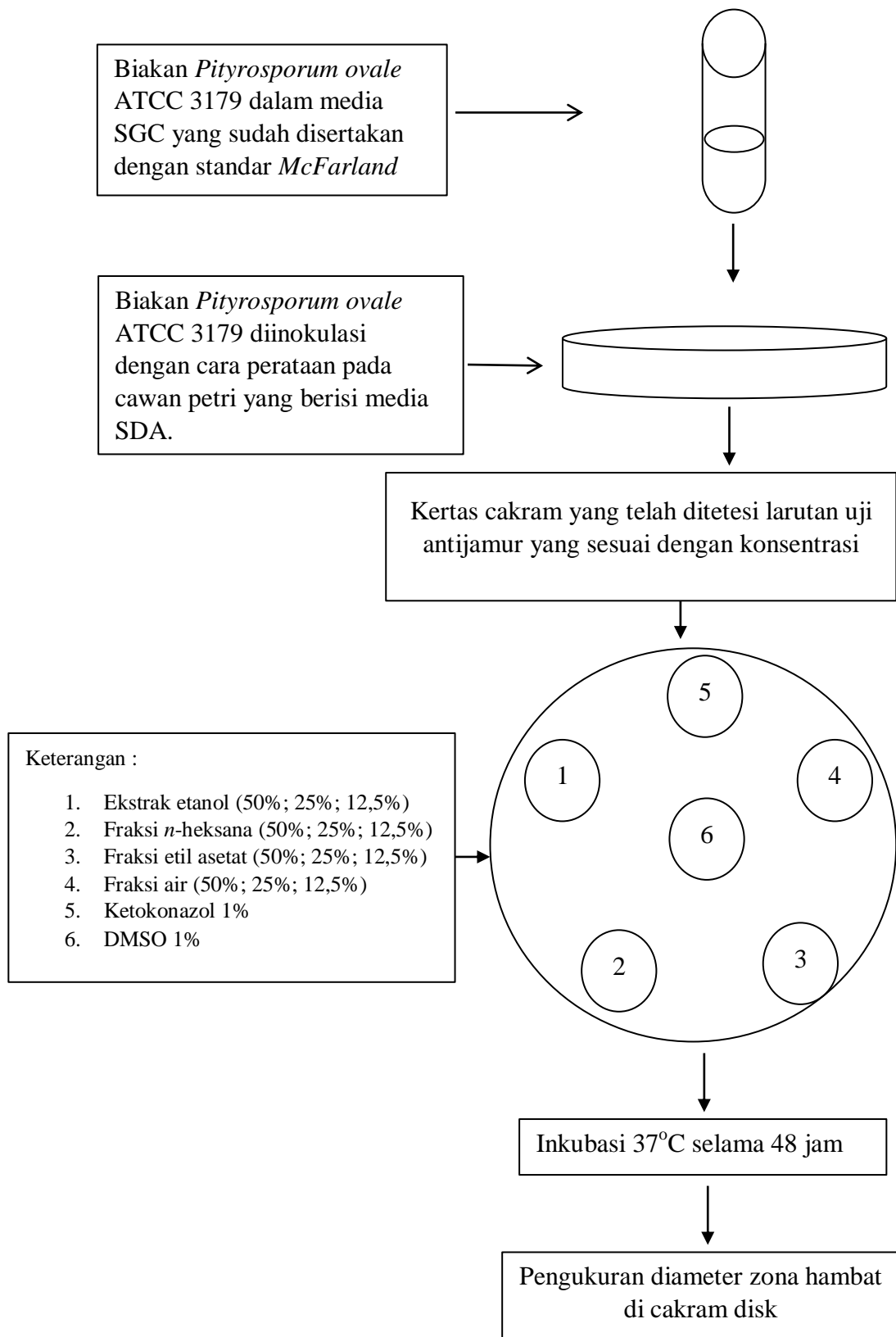
Data aktivitas antijamur antra fraksi ekstrak etanolik daun salam diuji secara statistik dengan *Analisis of Varian* (ANOVA) dengan menggunakan *software* SPSS 18 pada konsentrasi yang sama untuk data hasil uji difusi. Metode analisis yang digunakan dalam penelitian ini terlebih dahulu dilihat apakah data tersebut terdistribusi normal atau tidak terdistribusi normal ($p < 0,05$) dilanjutkan dengan metode non parametrik, sedangkan jika data terdistribusi normal ($p > 0,05$) dilanjutkan dengan uji parametrik (ANOVA).



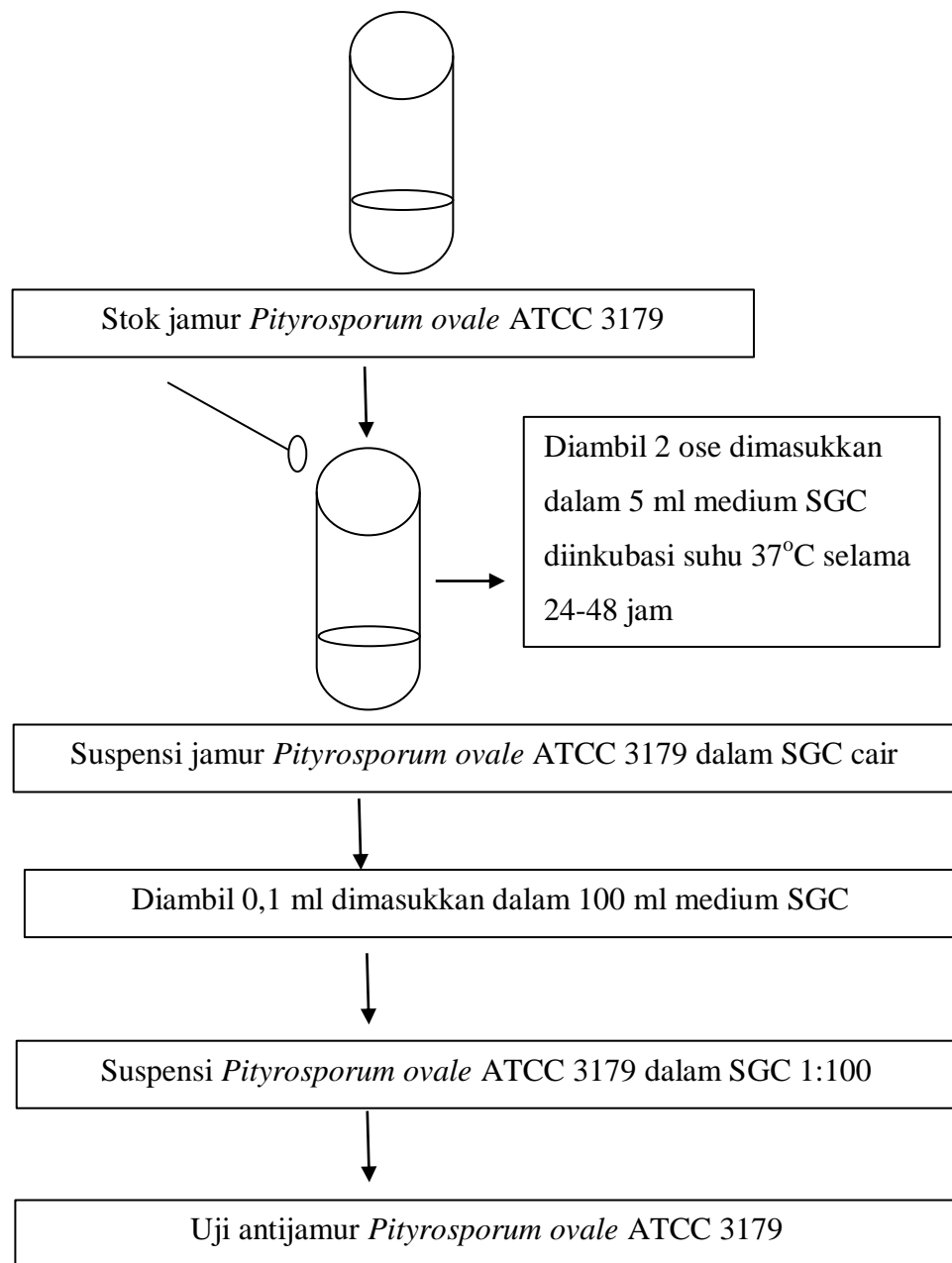
Gambar 4. Skema pembuatan ekstrak etanol dan fraksi daun salam (*Syzygium polyanthum* (Wight) Walp.)



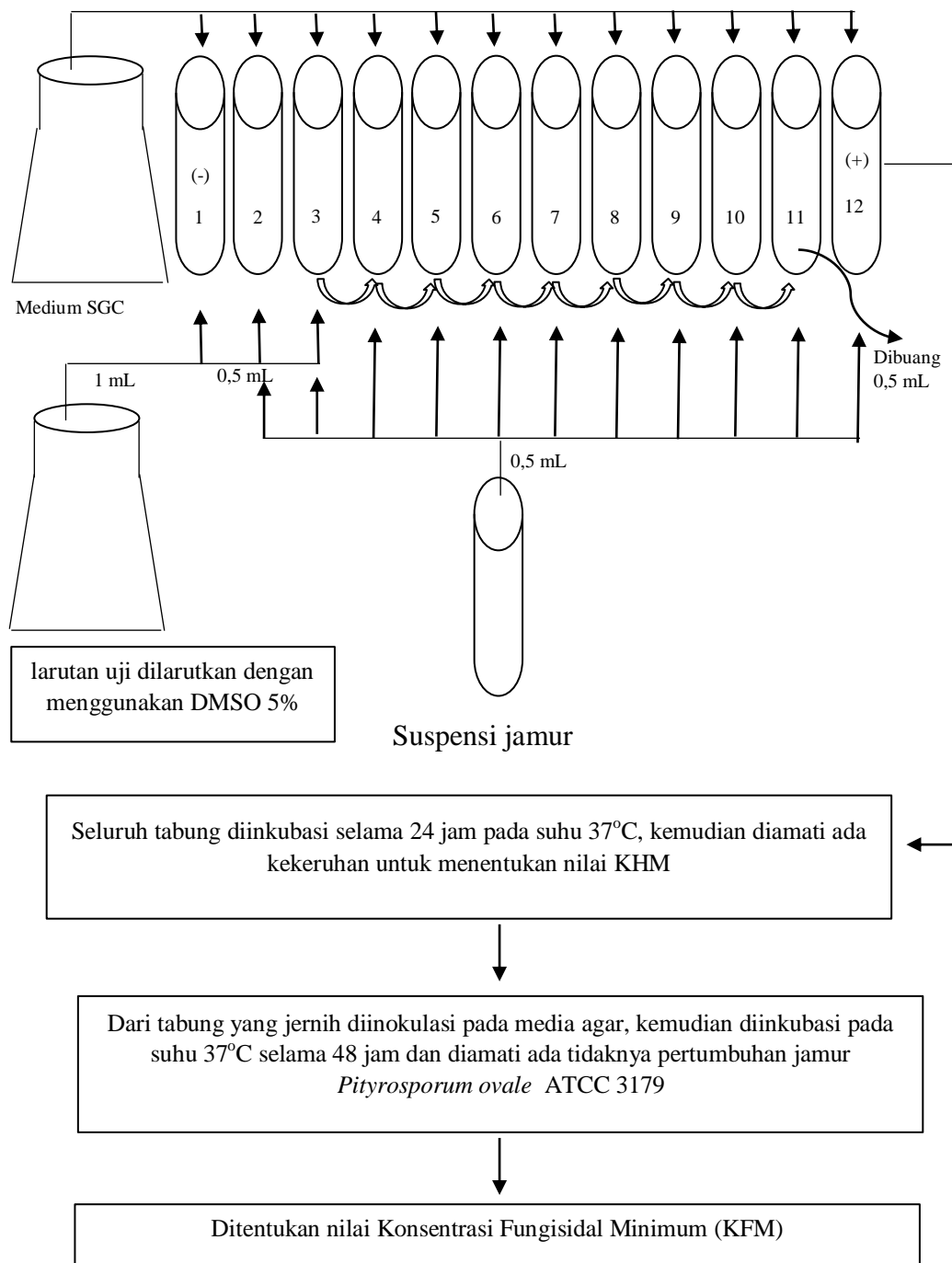
Gambar 5. Skema uji aktivitas antijamur dengan metode difusi dan dilusi



Gambar 6. Skema pengujian aktivitas antijamur dengan metode difusi



Gambar 7. Bagan kerja pembuatan suspensi jamur dengan perbandingan 1:100



Keterangan :

Tabung 1 : Fraksi etil asetat

Tabung 2 : 50%

Tabung 3 : 25%

Tabung 4 : 12,5%

Tabung 5 : 6,25%

Tabung 6 : 3,125%

Tabung 7 : 1,56%

Tabung 8 : 0,78%

Tabung 9 : 0,39%

Tabung 10 : 0,19%

Tabung 11 : 0,09%

Tabung 12 : Suspensi Jamur

Gambar 8. Skema pengujian aktivitas antijamur dengan metode dilusi