

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimental dengan kontrol positif dan kontrol negatif. Desain eksperimental bertujuan untuk membandingkan aktivitas antijamur ekstrak jamur Ling zhi (*Ganoderma lucidum*) terhadap jamur uji *Candida albicans*. Desain ini memungkinkan peneliti dapat mengukur secara langsung efektivitas ekstrak dalam menghambat atau mempengaruhi pertumbuhan *Candida albicans*.

B. Waktu dan Tempat Penelitian

1. Waktu

Penelitian dilakukan pada bulan Mei - Juni tahun 2024

2. Tempat

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikologi, Universitas Setia Budi, Surakarta.

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi penelitian ini adalah Jamur Ling zhi (*Ganoderma lucidum*)

2. Sampel

Sampel penelitian ini yaitu jamur Ling zhi (*Ganoderma lucidum*) yang diperoleh dari petani jamur di Bantul, Yogyakarta.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Konsentrasi ekstrak jamur Ling zhi (*Ganoderma lucidum*)
0,15%, 0,31%, 0,62%, 1,25%, 2,5%, 1,25%, 2,5%, 5%, 10%, 20%,
40%, 80%.

2. Variabel Terikat

Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh
Minimum (KBM)

E. Definisi Operasional

Tabel 3. 1 Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi Operasional	Parameter	Alat Ukur
1.	Konsentrasi Ekstrak <i>Ganoderma lucidum</i>	Konsentrasi ekstrak <i>Ganoderma lucidum</i> merujuk pada jumlah atau tingkat kepekatan komponen-komponen aktif yang diekstrak dari jamur <i>Ganoderma lucidum</i> .	Konsentrasi ekstrak <i>Ganoderma lucidum</i> (mg/ml)	Timbangan analitik dan gelas ukur
2.	KHM	Konsentrasi terendah ekstrak jamur Ling zhi pada tabung reaksi jernih namun masih ada pertumbuhan <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	Inokulasi pada media SDA	Adanya pertumbuhan jamur <i>Candida albicans</i> pada media SDA
3.	KBM	Konsentrasi terendah ekstrak jamur Ling zhi yang tidak terdapat pertumbuhan <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	Inokulasi pada media SDA	Tidak ada pertumbuhan jamur <i>Candida albicans</i> pada media SDA

F. Alat dan Bahan

1. Alat

- a) Cawan Petri
- b) Inkas
- c) Lampu Spiritus
- d) Tabung Reaksi
- e) Erlenmeyer
- f) Pipet volume
- g) Ose
- h) LAF (*Laminar Air Flow*)
- i) Handscoon
- j) Mikroskop
- k) Objek dan deck glass

2. Bahan

- a) Sampel uji ekstrak jamur Ling zhi (*Ganoderma lucidum*)
- b) Suspensi jamur *Candida albicans*
- c) Media *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA)
- d) Media *Sabouraud Glucosa Cair* (SGC)

G. Prosedur Penelitian

1. Pembuatan Ekstrak *Ganoderma lucidum*

- a) Jamur Ling zhi di ekstraksi dengan metode maserasi.

Pembuatan ekstrak jamur Ling zhi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70% dengan perbandingan bahan dan pelarut 1:10 bagian. Serbuk jamur Ling zhi (*Ganoderma lucidum*) ditimbang sebanyak 350 gram, dimasukkan dalam bejana maserasi dan tambahkan pelarut etanol 70% sebanyak 3,5 liter. Jamur Ling zhi (*Ganoderma lucidum*) yang sudah dicampuri etanol kemudian direndam selama 2 hari dengan sesekali digojog, setelah itu disaring menggunakan kain flanel. Ampas dari sisa maserat I dilakukan remaserasi 1 hari sambil sesekali digojog, kemudian dilakukan penyaringan kembali menggunakan kain flanel. Hasil dari maserasi I dan II dicampur dan disaring dengan menggunakan kertas saring, lalu maserat dipisahkan dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40°C sampai didapatkan ekstrak yang kental. Ekstrak pekat yang sudah diperoleh ditimbang, dan persen rendemen dihitung dengan membagi berat hasil ekstrak dengan berat serbuk, kemudian dikalikan dengan 100%.

- b) Ekstrak *Ganoderma lucidum* dibuat konsentrasi 0,15%, 0,31%, 0,62%, 1,25%, 2,5%, 5%, 10%, 20%, 40%, 80%.

2. Uji Fitokimia

- a) Flavonoid : Sebanyak 1 ml ekstrak ditambahkan beberapa tetes HCl pekat dan sedikit serbuk Mg. Reaksi dianggap positif jika terjadi perubahan warna menjadi orange atau jingga
- b) Alkaloid : Sebanyak 1 ml ekstrak diberi 2 tetes larutan pereaksi Dragendorff. Reaksi positif yang ditandai oleh terbentuknya endapan berwarna jingga hingga merah kecokelatan.
- c) Tanin : 1 ml sampel ditambahkan tambahkan 3 tetes larutan FeCl_3 1% menggunakan pipet tetes pada tabung reaksi. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna biru kehitaman, yang mengindikasikan adanya senyawa tanin dalam sampel.
- d) Terpenoid : Sebanyak 1 ml ekstrak dilarutkan dalam kloroform, kemudian ditambahkan pereaksi Liebermann-Bouchard (asam asetat anhidrat- H_2SO_4). Reaksi positif ditunjukkan dengan perubahan warna menjadi merah-ungu

3. Uji Bebas Etanol

Timbang 0,5 gram ekstrak dan masukkan ke dalam tabung reaksi. Tambahkan 1 ml asam asetat glasial dan 1 ml asam sulfat pekat, lalu homogenkan dan panaskan. Tutup bagian atas tabung dengan kapas. Jika tidak tercium bau ester, maka larutan tersebut positif bebas etanol. (Kurniawati, 2015).

4. Pembuatan Media

a) Pembuatan Media *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA)

Timbang 13 gram media *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA). Larutkan dalam 200 ml aquadest dan aduk sambil dipanaskan sampai media larut. Masukkan larutan kloramfenikol sebanyak 0,04 gram ke dalam media lalu homogenkan. Sterilkan media SDA dengan autoclave dengan suhu 121°C selama 15 menit. Tunggu media dingin kemudian tuang media SDA ke plate / cawan petri yang sudah terlebih dahulu disterilkan.

b) Pembuatan Media *Sabouraud Glucosa Cair* (SGC)

Timbang 6 gram media *Sabouraud Glucosa Cair* (SGC) lalu larutkan media SGC dalam 200 ml aquadest. Panaskan media SGC sambil diaduk selama beberapa menit. Tuang media ke dalam erlenmeyer, masukkan kloramfenikol sebanyak 0,04 gram lalu homogenkan. Tutup media dengan kapas dan kertas, setelah itu sterilkan media dengan autoclave suhu 121°C selama 15 menit.

5. Peremajaan Kultur Jamur *Candida albicans*

Candida albicans diremajakan menggunakan metode streak plate yaitu dengan cara ambil satu jarum inokulasi dan digores ke dalam media *Saboraud Dextrose Agar* (SDA) pada cawan petri, kemudian inkubasi suhu ruang selama 2x24 jam

6. Uji Germ Tube *Candida albicans*

Uji germ tube menggunakan sampel serum sebanyak 1 ml dimasukkan dalam tabung. Koloni jamur yang akan dibiakan dimasukkan ke dalam tabung lalu diinkubasi selama 3 jam pada suhu 37°C. Siapkan objek glass dan deck glass, pipet hasil inkubasi dalam tabung kemudian teteskan diatas objek glass lalu tutup dengan deck glass. Amati dibawah mikroskop dengan perbesaran 40 x 10. Uji germ tube positif ditandai dengan blastospora atau sel ragi yang membentuk kecambah.

7. Pembuatan Suspensi Jamur

Jamur uji *Candida albicans* diambil 2-3 jarum Ent steril dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 10 ml garam fisiologis secara aseptis. Kekeruhan disetarakan dengan standard Mc. Farland 0,5.

8. Uji Antijamur Metode Dilusi

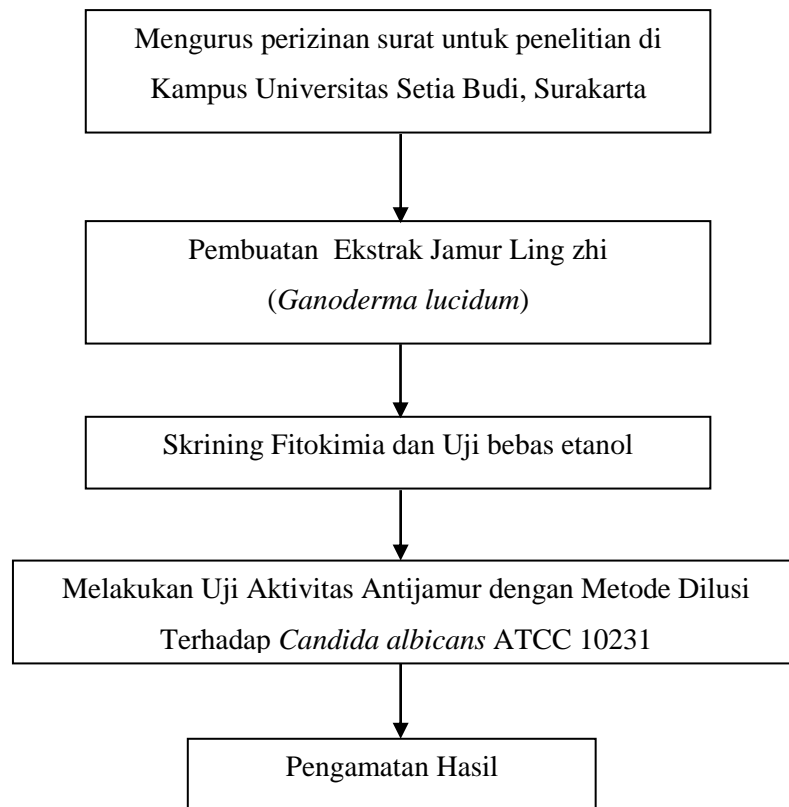
Pengujian antijamur metode dilusi atau seri pengenceran dilakukan dengan menyiapkan 12 tabung reaksi, kemudian tiap tabung dimasukkan sebanyak 1 ml *Sabouraud Glucose Cair* (SGC) secara aseptis. Tabung 1 dibuat konsentrasi 80% dengan menimbang ekstrak *Ganoderma lucidum* sebanyak 1,6 gram dan dilarutkan dalam aquadest steril 1 ml. Ekstrak *Ganoderma lucidum* dimasukkan ke dalam tabung 1 sebanyak 1 ml dan homogenkan, kemudian sebanyak

1 ml dari tabung 1 dipindahkan ke tabung 2 lalu homogenkan. Perlakuan sama juga dilakukan untuk tiap tabung berikutnya sampai tabung 11. Suspensi jamur uji ditambahkan 0,5 ml (*Candida albicans*) pada semua tabung kecuali tabung 11. Tabung 12 sebagai kontrol positif dan tabung 11 sebagai kontrol negatif. Pengujian antijamur metode dilusi dibuat 3 replikasi atau triplo. Inkubasi semua tabung selama 5 hari pada suhu kamar, lalu amati adanya pertumbuhan (kekeruhan) dengan membandingkan dengan kontrol negatif dan kontrol positif. KHM ditentukan berdasarkan tabung yang tidak menunjukkan kekeruhan, yang dapat diamati secara visual. Perbedaan untuk mengetahui dan memastikan antara KHM dan KBM, yaitu dilakukan inokulasi pada medium SDA dalam cawan petri dan inkubasi pada suhu kamar selama 1–2 hari. KBM ditandai dengan tidak adanya pertumbuhan jamur pada medium SDA dalam cawan petri.

H. Teknik Pengumpulan Data

Pengumpulan data dilakukan dengan cara mengumpulkan data hasil inokulasi dari tabung yang jernih ke media SDA, untuk mengetahui daya hambat dan daya bunuh dari ekstrak jamur Ling zhi (*Ganoderma lucidum*) terhadap *Candida albicans* yang ditandai ada atau tidaknya pertumbuhan koloni pada media SDA.

I. Alur Penelitian



Gambar 3. 1 Alur Penelitian