

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi adalah semua individu yang menjadi sumber pengambilan sampel. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun salam (*Syzigium polyanthum* (Wight) Walp.) yang diperoleh dari Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah pada bulan Agustus 2019.

Sampel adalah sebagian kecil dari populasi yang digunakan sebagai sumber informasi bagi semua data yang diperlukan untuk menjawab permasalahan penelitian. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu daun salam yang muda hingga cukup tua dengan kedudukan dari ujung tanaman pada daun ke 3 sampai 6 dan diperoleh dalam kondisi segar, bersih dan tidak busuk yang diambil secara acak.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pertama dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol 70% daun salam (*Syzigium polyanthum* (Wight) Walp.).

Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah sediaan obat kumur ekstrak etanol daun salam dengan konsentrasi 2,5%, 5%, dan 10%.

Variabel utama ketiga dalam penelitian ini adalah aktivitas antijamur sediaan obat kumur ekstrak etanol daun salam terhadap *Candida albicans* ATCC 10231.

2. Klasifikasi operasional variabel utama

Variabel yang dapat diidentifikasi terlebih dahulu dapat diklasifikasikan ke dalam berbagai macam variabel yaitu variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkontrol.

Variabel bebas merupakan variabel yang mempengaruhi atau yang menjadi sebab perubahannya atau timbulnya variabel tergantung. Variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak daun salam pada sediaan obat kumur dengan variasi konsentrasi 2,5%, 5%, dan 10%.

Variabel tergantung merupakan variabel yang dipengaruhi oleh variabel bebas. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah organoleptik, pH, viskositas, stabilitas dan mutu fisik, serta diameter zona hambat sediaan obat kumur ekstrak etanol daun salam terhadap *Candida albicans* ATTC 10231.

Variabel terkendali merupakan variabel atau faktor lain yang ikut berpengaruh yang dibuat sama pada media percobaan. Variabel kendali dalam penelitian ini adalah suhu, lama inkubasi, waktu, pH, metode difusi cakram, bakteri *Candida albicans* ATCC 10231, kondisi laboratorium seperti kebersihan dari ruangan dan instrument dari laboratorium.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun salam (*Syzigium polyanthum* (Wight) Walp.) adalah bagian daun salam yang muda hingga cukup tua dengan kedudukan dari ujung tanaman pada daun ke 3 sampai 6 dan diperoleh dalam kondisi segar, bersih dan tidak busuk diambil secara acak diperoleh dari B2P2TOOT Tawangmangu, Karanganyar pada bulan Agustus 2019.

Kedua, serbuk simplisia daun salam adalah hasil pengeringan di oven dengan suhu 40°C, penyerbukan dan pengayakan dengan nomor *mesh* 40.

Ketiga, ekstrak etanol daun salam adalah hasil maserasi serbuk daun salam dengan menggunakan pelarut etanol 70% yang kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 50°C sampai diperoleh ekstrak kental.

Keempat, sediaan obat kumur ekstrak etanol daun salam adalah hasil formulasi dengan menggunakan sorbitol, metil paraben, propil paraben, gliserol, tween 80, *oleum mentha*, akuades, dan ekstrak etanol daun salam.

Kelima, aktivitas antijamur adalah pengujian menggunakan metode difusi cakram dengan sediaan obat kumur konsentrasi 2,5%, 5%, dan 10%.

Keenam, konsentrasi aktif adalah konsentrasi terendah dimana zat aktif ekstrak etanol daun salam dapat menghambat secara signifikan.

Ketujuh, jamur yang digunakan adalah biakan jamur *Candida albicans* ATCC 10231 koleksi Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi Surakarta.

Kedelapan, diameter zona hambat adalah zona bening yang terbentuk disekitar cakram akibat adanya penghambatan terhadap pertumbuhan jamur.

C. Bahan dan Alat Penelitian

1. Bahan

Bahan sampel yang digunakan pada penelitian ini yaitu daun salam (*Syzygium polyanthum* (Wight) Walp.) dan untuk ekstraksi menggunakan etanol 70%.

Bahan untuk pengujian ekstrak adalah toluen jenuh air, asam klorida encer LP, kloroform, asam asetat anhidrat, H₂SO₄, metanol, serbuk Mg, HCl pekat, reagen Dragendroff, reagen Mayer, FeCl₃ 1%, serbuk magnesium, asam klorida pekat, amil alkohol, *n*-heksan, reagen Liebermann-Burchard, besi (III) klorida, reagen Wagner, petroleum eter, kuersetin, butanol, asam asetat.

Bahan untuk formulasi sediaan obat kumur adalah sorbitol, metil paraben, propil paraben, gliserol, tween 80, *oleum mentha*, akuades.

Bahan untuk uji antijamur adalah jamur *Candida albicans* ATCC 10231, Media *Potato Dextrosa Agar* (PDA) dan media *Saboraud Dextrose Broth* (SDB), media gula-gula, pewarna *Lactophenol Cotton Blue* (LCB), akuades, spirtus, alkohol, cakram nistatin.

2. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini terdiri atas timbangan analitik, ayakan nomor 40, *rotary evaporation*, destilator, pH meter, mikroskop, oven, alat-alat gelas, tabung reaksi, bunsen, ose, cawan petri, pinset, korek api, rak tabung reaksi, vortex, penggaris, spatula besi, kapas lidi, tisu, alat tulis, label, kamera, pengukur waktu, erlenmeyer, autoklaf, cakram uji kosong, inkas, inkubator 37°C aliran CO₂ 5% model 6200 (Napco).

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman salam

Tahap pertama penelitian adalah menetapkan kebenaran tanaman yang berkaitan dengan ciri-ciri mikroskopis dan makroskopisnya. Hal ini dilakukan dengan mencocokkan ciri-ciri morfologis tanaman pada pustaka yang dibuktikan di Laboratorium Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Sebelas Maret Surakarta.

2. Pengumpulan, pengeringan bahan dan pembuatan serbuk

Tanaman salam (*Syzigium polyanthum* (Wight) Walp.) diperoleh dari BP2P2TOOT Tawangmangu, Karanganyar pada bulan Agustus 2019. Daun yang digunakan adalah daun muda sampai cukup tua dengan kedudukan ketiga sampai keenam, segar dan tidak busuk. Daun dibersihkan dan dicuci dengan air bersih.

Daun salam (*Syzigium polyanthum* (Wight) Walp.) yang telah dibersihkan kemudian dikeringkan dengan menggunakan oven suhu 40°C. Pengeringan bertujuan untuk mengurangi kadar air, mencegah terjadinya perubahan kimiawi, reaksi enzimatik yang dapat menurunkan mutu, menghindari pertumbuhan jamur dan bakteri, dan memudahkan dalam proses pembuatan serbuk.

Daun salam (*Syzigium polyanthum* (Wight) Walp.) yang sudah kering, digiling dan diblender, kemudian diayak menggunakan ayakan nomor *mesh* 40 untuk mendapatkan serbuk halus. Serbuk yang diperoleh disimpan dalam wadah kering tertutup rapat.

3. Uji organoleptik

Pengamatan yang dilakukan terhadap kekhususan bau dan rasa simplisia daun salam (*Syzigium polyanthum* (Wight) Walp.)

4. Uji kadar air terhadap serbuk

Uji kadar air terhadap serbuk daun salam dilakukan dengan menggunakan *moisture balance*. Alat dihidupkan, kemudian *aluminium plate* ditempatkan ke dalam alat dan ditekan tombol tara untuk memposisikan berat *aluminium plate* pada pembacaan 0,00 gram. Simplisia daun salam ditiimbang sebanyak 2 gram, ratakan diatas *aluminium plate*. Suhu diatur sebesar 105°C kemudian alat ditutup dan tekan tombol *start*, akan terdengar bunyi *tit* sekali setelah kandungan air

didalam sampel habis. Angka yang tertera pada *display* dicatat dalam satuan persen (%). Kadar air tidak boleh lebih dari 10% (Kemenkes 2010).

5. Uji kadar abu total

Krus yang sudah dibersihkan ditimbang. Simplisia daun salam (*Syzigium polyanthum* (Wight) Walp.) ditimbang seksama sebanyak 2 sampai 3 gram pada krus yang sudah dipijar dan ditara, kemudian diarsang perlahan-lahan pada tanur listrik dengan suhu 441-601⁰C hingga habis. Abu didinginkan didalam eksikator dan ditimbang bobotnya.

Air panas ditambahkan, jika dengan cara ini arang tidak dapat dihilangkan, aduk, saring melalui kertas saring bebas abu. Kertas saring beserta sisa penyaringan dipijarkan dalam krus yang sama. Filtrat dimasukkan dalam krus, uapkan dan pijarkan hingga bobot tetap. Kadar abu dihitung terhadap berat bahan uji, dinyatakan dalam %b/b. Kadar abu total tidak boleh lebih dari 10,1% (Kemenkes 2010).

$$\text{Kadar abu} = \frac{(\text{bobot cawan+isi}) - \text{bobot cawan kosong}}{\text{bobot sampel}} \times 100\%$$

6. Uji kadar abu tidak larut asam

Abu yang diperoleh pada penetapan kadar abu total dididihkan dengan 25 ml asam klorida encer LP selama 5 menit. Bagian yang tidak larut asam dikumpulkan, disaring melalui kertas saring bebas abu, dan dicuci dengan air panas, kemudian dipijarkan dalam krus hingga bobot tetap. Kadar abu yang tidak larut dalam asam dihitung terhadap berat bahan uji, dinyatakan dalam %b/b. Kadar abu tidak larut asam tidak boleh lebih dari 0,8% (Kemenkes 2010).

7. Skrining fitokimia serbuk daun salam

7.1 Identifikasi flavonoid. Sebanyak 10 g sampel ditambahkan dengan 10 ml air panas, dididihkan selama 5 menit dan disaring dalam keadaan panas, kedalam 5 ml filtrat ditambahkan dengan 0,1 g serbuk magnesium dan 1 ml asam klorida pekat dan 2 ml amil alkohol, dikocok dan dibiarkan memisah. Flavonoida positif jika terjadi warna merah atau kuning jingga pada lapisan amil alkohol (Depkes 1995).

7.2 Identifikasi tanin. Sampel uji ditimbang sebanyak 1 g, dididihkan selama 3 menit dalam 100 ml air suling lalu didinginkan dan disaring. Larutan diambil 2 ml ditambahkan 1-2 tetes pereaksi besi (III) klorida 1%. Timbulnya warna biru atau hijau kehitaman menunjukkan adanya tanin (Depkes 1995).

7.3 Identifikasi alkaloid. Sebanyak 2 g serbuk sampel diekstrak dengan sedikit kloroform, ditambah dengan 10 ml kloroform-amoniak dan disaring. Filtrat ditambahkan beberapa tetes H_2SO_4 2N, kemudian dikocok hingga terbentuk 2 lapisan. Lapisan asam (tidak berwarna) dipipet ke dalam tabung diuji dengan menggunakan beberapa tetes pereaksi Dragendorff, Mayer dan Wagner. Uji ini dinyatakan positif bila larutan-larutan tersebut menghasilkan warna jingga (Dragendorff), putih kekuningan (Mayer), dan coklat (Wagner) (Depkes 1995).

7.4 Identifikasi minyak atsiri. Sebanyak 2 g serbuk simplisia dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan dengan 10 ml petroleum eter. Mulut tabung dipasang corong yang diberi lapisan kapas yang telah dibasahi dengan air, setelah dingin, disaring dengan kertas saring. Filtrat yang diperoleh diuapkan pada cawan penguap, residu dilarutkan dalam pelarut alkohol sebanyak 5 ml dan disaring dengan kertas saring. Residu yang berbau aromatik menunjukkan adanya senyawa golongan minyak atsiri (Djamil 2009).

8. Pembuatan ekstrak etanol daun salam (*Syzigium polyanthum* (Wight) Walp.)

Serbuk daun salam (*Syzigium polyanthum* (Wight) Walp.) yang telah dihaluskan ditimbang sebanyak 500 g, kemudian dimasukkan kedalam maserator, diekstraksi menggunakan cairan penyari etanol 70% sebanyak 2500 ml. Direndam selama 3 hari pertama sambil sesekali diaduk. Maserat dipisahkan dengan cara filtrasi (penyaringan), proses penyarian diulangi 2 kali dengan menggunakan jenis dan jumlah pelarut yang sama. Semua maserat dikumpulkan, kemudian diuapkan dengan penguap vakum atau penguap tekanan rendah hingga diperoleh ekstrak kental. Rendemen yang diperoleh ditimbang dan dicatat (Depkes 2000).

9. Uji kadar air terhadap ekstrak

Uji kadar air dilakukan dengan membuat toluen jenuh air dengan cara mengocok sejumlah toluen dengan sedikit air, biarkan memisah dan buang lapisan airnya.

Bahan ditimbang secara seksama yang diperkirakan mengandung 1 sampai 4 ml air, masukkan ke dalam labu kering. Batu didih ditambahkan untuk zat yang menyebabkan gejolak mendadak saat mendidih. Toluen jenuh air dimasukkan lebih kurang 200 ml ke dalam labu, rangkaian alat dipasang. Toluen jenuh air dimasukkan ke dalam tabung penerima melalui pendingin sampai leher alat penampung. Labu dipanaskan hati-hati selama 15 menit.

Penyulingan diatur dengan kecepatan lebih kurang 2 tetes tiap detik setelah mendidih, hingga sebagian besar air tersuling, kemudian kecepatan penyulingan dinaikkan hingga 4 tetes tiap detik. Bagian dalam pendingin dicuci setelah semua air telah tersuling, sambil dibersihkan dengan sikat tabung yang disambungkan pada sebuah kawat tembaga dan telah dibasahi dengan toluen jenuh air. Penyulingan dilanjutkan selama 5 menit. Tabung penerima didinginkan hingga suhu ruangan. Volume air dibaca setelah air dan toluen memisah secara sempurna. Kadar air dihitung dalam % v/b. Kadar air tidak boleh lebih dari 10% (Kemenkes 2010).

10. Identifikasi golongan senyawa aktif ekstrak etanol daun salam dengan uji fitokimia (Depkes 1980)

Uji fitokimia merupakan uji kualitatif pada tumbuhan tingkat tinggi sehingga dapat diketahui senyawa yang terdapat di dalamnya. Senyawa kimia pada tumbuhan dapat diketahui melalui uji fitokimia. Uji fitokimia ini dilakukan dalam tabung dengan jumlah sampel yang relatif sedikit, sehingga dikenal sebagai metode tabung.

10.1 Identifikasi flavonoid. Ekstrak daun salam (*Syzigium polyanthum* (Wight) Walp.) dimasukkan kedalam tabung reaksi kemudian dilarutkan 1-2 ml metanol panas 50%. Serbuk Mg dan 0,5 ml HCl pekat ditambahkan kedalam tabung. Kandungan flavonoid ditunjukkan dengan terbentuknya larutan berwarna merah atau jingga.

10.2 Identifikasi alkaloid. Ekstrak daun salam (*Syzigium polyanthum* (Wight) Walp.) dimasukkan kedalam tabung reaksi kemudian ditambahkan HCl 2% sebanyak 0,5 ml, larutan dibagi menjadi dua tabung, tabung I ditambahkan 0,5 reagen Dragendorff sedangkan tabung II ditambahkan 2-3 tetes reagen Mayer. Tabung I akan terbentuk endapan berwarna jingga dan pada tabung II terbentuk endapan berwarna kekuning-kuningan jika menunjukkan adanya alkaloid.

10.3 Identifikasi tanin. Ekstrak daun salam (*Syzigium polyanthum* (Wight) Walp.) dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditambahkan dengan 2-3 tetes larutan FeCl₃ 1%. Bahan mengandung tanin jika dihasilkan larutan berwarna hijau kehitaman atau biru tua.

10.4 Identifikasi minyak atsiri. Sebanyak 1 ml ekstrak diuapkan dalam cawan porselin hingga diperoleh residu, dari residu tersebut jika tercium bau yang khas maka positif mengandung minyak atsiri (Ciulei 1984).

11. Uji bebas alkohol ekstrak daun salam (*Syzigium polyanthum* (Wight) Walp.)

Pemeriksaan bebas alkohol etanol 70% terhadap ekstrak daun salam (*Syzigium polyanthum* (Wight) Walp.) bertujuan untuk memastikan ekstrak pekat daun salam bebas dari etanol 70% dengan reaksi esterifikasi. Asam asetat dan asam sulfat pekat ditambahkan kedalam tabung reaksi yang berisi ekstrak lalu dipanaskan, jika tercium bau ester khas alkohol maka ekstrak masih mengandung etanol 70%.

12. Formulasi dan pembuatan sediaan obat kumur

Daun salam diformulasikan dalam sediaan obat kumur dengan variasi konsentrasi pada ekstrak. Variasi konsentrasi yang digunakan yaitu 2,5%, 5%, dan 10% yang dibuat dalam 100 ml akuades.

Pembuatan sediaan obat kumur dilakukan dengan cara semua bahan ditimbang, kemudian tween 80 dilarutkan dengan air perbandingan 1 : 5, dipanaskan hingga larut diatas *waterbath* dengan suhu \pm 30°C-35°C. Larutkan sedikit demi sedikit ekstrak etanol daun salam dengan *oleum mentha*, kemudian ditambahkan dengan larutan tween 80 hingga seluruhnya dapat larut dan homogen (Larutan I). Propil dan metil paraben dilarutkan dengan sorbitol dan gliserol

sedikit demi sedikit, kemudian akuades ditambahkan sebanyak 10 ml (larutan II). Larutan II dimasukkan kedalam I. Aduk hingga homogen. Akuades ditambahkan hingga volumenya 100 ml. Atur pH hingga 5-6.

Rancangan formulasi dijelaskan sebagai berikut :

Tabel 1 Komposisi bahan-bahan yang digunakan dalam pembuatan obat kumur

Nama zat	Jumlah zat dalam formula (%b/v)			
	Kontrol Negatif	Formula I	Formula II	Formula III
Ekstrak etanol daun salam	-	2,5	5	10
Sorbitol	1	1	1	1
Gliserol	15	15	15	15
Metil paraben	0,18	0,18	0,18	0,18
Propil paraben	0,02	0,02	0,02	0,02
Tween 80	10	10	10	10
<i>Oleum mentha</i>	10 tetes	10 tetes	10 tetes	10 tetes
Akuades	ad 100 ml	ad 100 ml	ad 100 ml	ad 100 ml

13. Evaluasi mutu fisik dan stabilitas sediaan obat kumur ekstrak daun salam (*Syzigium polyanthum* (Wight) Walp.)

Evaluasi mutu fisik obat kumur daun salam dilakukan pada hari pertama dan pengujian stabilitas dilakukan dengan melakukan sampling pada penyimpanan minggu ke-1, minggu ke-2, minggu ke-3. Evaluasi mutu fisik dan stabilitas obat kumur daun salam meliputi uji organoleptik, uji pH, uji viskositas dan uji stabilitas.

13.1 Uji organoleptik. Uji yang dilakukan yaitu pemeriksaan bentuk, warna, bau dan rasa.

13.2 Uji pH. Uji dilakukan dengan menggunakan pH meter. Kalibrasi pada alat pH meter dengan larutan penyangga pH 7, kemudian dikeringkan dengan kertas tisu selanjutnya elektroda dibilas dengan air suling. Elektroda dibilas dengan sediaan obat kumur yang telah dibuat sampai pH meter menunjukkan pembacaan yang tetap. Hasil dicatat pembacaan skala atau angka pada tampilan dari pH meter.

13.3 Uji viskositas. Uji dilakukan dengan menggunakan viskometer. Viskotester dipasang pada klemnya dengan arah horizontal atau tegak lurus dengan arah klem. Rotor kemudian dipasang pada viskotester dengan menguncinya berlawanan arah jarum jam. Sampel dimasukkan kedalam mangkuk,

kemudian alat dihidupkan. Kekentalan sampel dicatat setelah jarum pada viskositas stabil.

13.4 Uji stabilitas. Sediaan larutan obat kumur disimpan pada suhu ruang atau kamar selama 21 hari pada suhu $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Kondisi fisik dan ada atau tidaknya pemisahan selama penyimpanan sediaan dibandingkan sebelum dan sesudah uji tersebut dilakukan (Rachma 2010).

14. Sterilisasi alat

Seluruh alat dicuci bersih dan dikeringkan, kemudian dibungkus dengan kertas perkamen. Tabung reaksi dan gelas erlenmeyer terlebih dahulu disumbat dengan kapas bersih. Alat yang akan digunakan disterilisasi di dalam oven selama 2 jam dengan suhu 180°C . Akuades yang digunakan harus steril, pembuatan aquadest steril dilakukan dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm.

15. Identifikasi jamur *Candida albicans*

15.1 Identifikasi jamur *Candida albicans* ATCC 10231 dengan pengecatan. Identifikasi jamur, kapang atau khamir salah satunya dilakukan dengan menggunakan pewarnaan *Lactophenol Cotton Blue* (LCB). Pewarnaan LCB, *phenol* berfungsi untuk mematikan jamur. Gliserol mengawetkan preparat dan mencegah presipitasi dari cat serta *cotton blue* berfungsi untuk mewarnai jamur menjadi biru. Metode pewarnaan LCB menggunakan bahan-bahan *phenol* 20 g, *lactic acid* 20 ml, gliserol 40 g, dan *cotton* 0,05 g. Cara kerjanya adalah jarum ose dipanaskan, diambil dua tetes pewarna LCB dan diletakkan diatas gelas obyek, kemudian dipanaskan ose kembali lalu dinginkan. Jamur diambil kemudian dicampur dengan larutan LCB pada obyek glass. Tutup dengan penutup gelas dan hasilnya dilihat dibawah mikroskop (Pohan 2013).

15.2 Identifikasi makroskopis *Candida albicans* ATCC 10231. Uji pemeriksaan jamur *Candida albicans* ATCC 10231 dilakukan dengan cara mengoleskan satu ose jamur pada media *Potato Dextrose Agar* (PDA) selama 5x24 jam, kemudian diamati bentuk, tepian, tekstur permukaan, elevasi dan warna. Positif jamur *Candida albicans* ATCC 10231 jika koloninya berwarna krem, berlendir, dan berbau ragi.

15.3 Identifikasi biokimia. Identifikasi biokimia dilakukan dengan media glukosa cair, sukrosa cair, laktosa cair, dan maltosa cair. Sebanyak 0,1 ml isolat dalam media *Sabaroud Dextrose Broth* (SDB) diinokulasikan pada medium glukosa, maltosa, laktosa, sukrosa cair. Isolat selanjutnya diinkubasi selama 7 hari pada suhu ruang dan diamati perubahannya. Pada reaksi fermentasi akan terbentuk asam ditunjukkan perubahan warna merah dari indikator fenol red menjadi kekuningan. Hasil positif ditunjukkan jika pada media glukosa cair terdapat gelembung pada tabung Durham. Gas yang terbentuk akan tampak sebagai ruang kosong pada tabung durham. Spesies *Candida albicans* ATCC 10231 memperlihatkan hasil reaksi fermentasi dan gas pada glukosa dan maltosa. Uji dilakukan dengan melakukan dua ulangan (Widyastutik 2012).

16. Peremajaan biakan jamur *Candida albicans* ATCC 10231

Koloni jamur diambil dari biakan murni yang tersedia, dilakukan secara aseptis dengan jarum ose dan digoreskan pada media *Potato Dextrose Agar* (PDA) lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 120 jam.

17. Pembuatan suspensi jamur

Biakan subkultur *Candida albicans* diambil dengan menggunakan ose steril ke dalam 25 ml media *Sabaroud Dextrose Broth* (SDB) lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Encerkan dengan media *Sabaroud Dextrose Broth* (SDB) dan diukur kekeruhan yang ekuivalen dengan 0,5 standar *Mc Farland* untuk mendapatkan kepadatan $1,5 \times 10^8$ colony forming unit (cfu)/ml.

18. Uji daya hambat sediaan obat kumur ekstrak etanol daun salam terhadap jamur *Candida Albicans*

Metode yang digunakan adalah difusi cakram. Metode difusi digunakan untuk mengetahui adanya daya hambat ekstrak etanol daun salam (*Syzigium polyanthum* (Wight) Walp.) terhadap jamur *Candida albicans* ATCC 10231.

Pengujian ini dilakukan menggunakan satu cawan petri yang berisi 30 ml media *Potato Dextrose Agar* (PDA) yang masih cair dituang kedalam cawan petri dalam keadaan panas $\pm 50^\circ\text{C}$, kemudian media dibiarkan dingin dan memadat. Bagi cawan petri menjadi 5 bagian dengan jarak yang sama dan diberi label untuk membedakan.

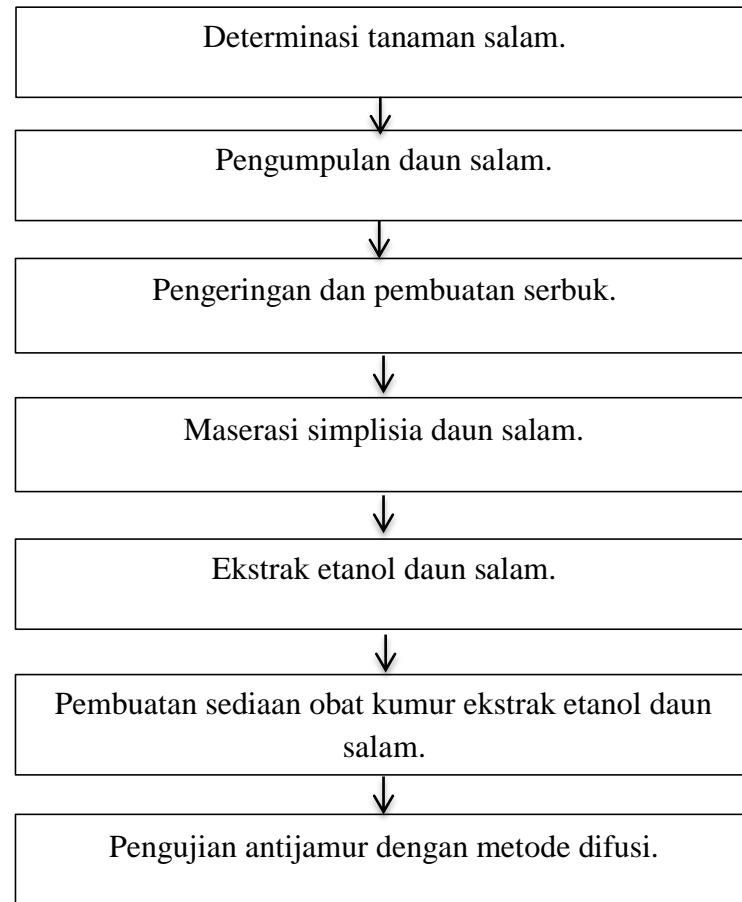
Pertama, jamur diambil dari media *Sabaroud Dextrose Broth* (SDB) yang berisi suspensi jamur yang setara dengan standar Mc Farland $1,5 \times 10^8$ colony forming unit (cfu)/ml dengan kapas lidi steril kemudian dioleskan pada cawan petri yang berisi media *Potato Dextrose Agar* (PDA) dan ditunggu sampai jamur berdifusi pada media ± 10 menit. Letakkan kertas cakram steril (6 mm) yang telah direndam dengan ± 50 μ l sediaan obat kumur ekstrak etanol daun salam selama 30 menit. Kertas cakram diletakkan di atas permukaan media menggunakan pinset dan ditekan sedikit.

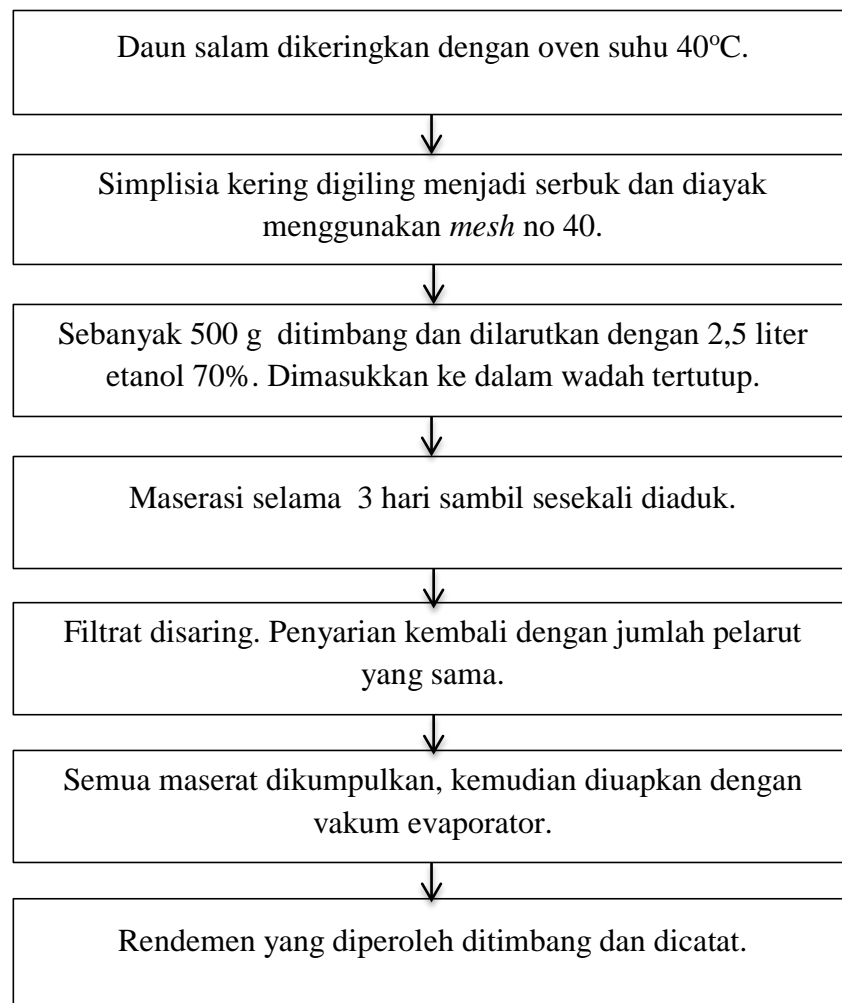
Media diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Kontrol positif yang digunakan adalah ketoconazole 2% dan kontrol negatif yang digunakan adalah sediaan obat kumur yang tidak mengandung ekstrak etanol daun salam (*Syzigium polyanthum* (Wight) Walp.). Tunggu setelah 48 jam diamati ada tidaknya zona bening yang tidak ditumbuhi oleh jamur disekitar kertas cakram. Zona bening yang terbentuk diukur diameternya menggunakan jangka sorong. Adanya daerah zona bening di sekeliling kertas cakram menunjukkan adanya aktivitas antijamur. Pengujian dilakukan sebanyak 3 kali replikasi.

Penentuan kadar respon hambatan pertumbuhan dapat dilihat pada tabel 2.

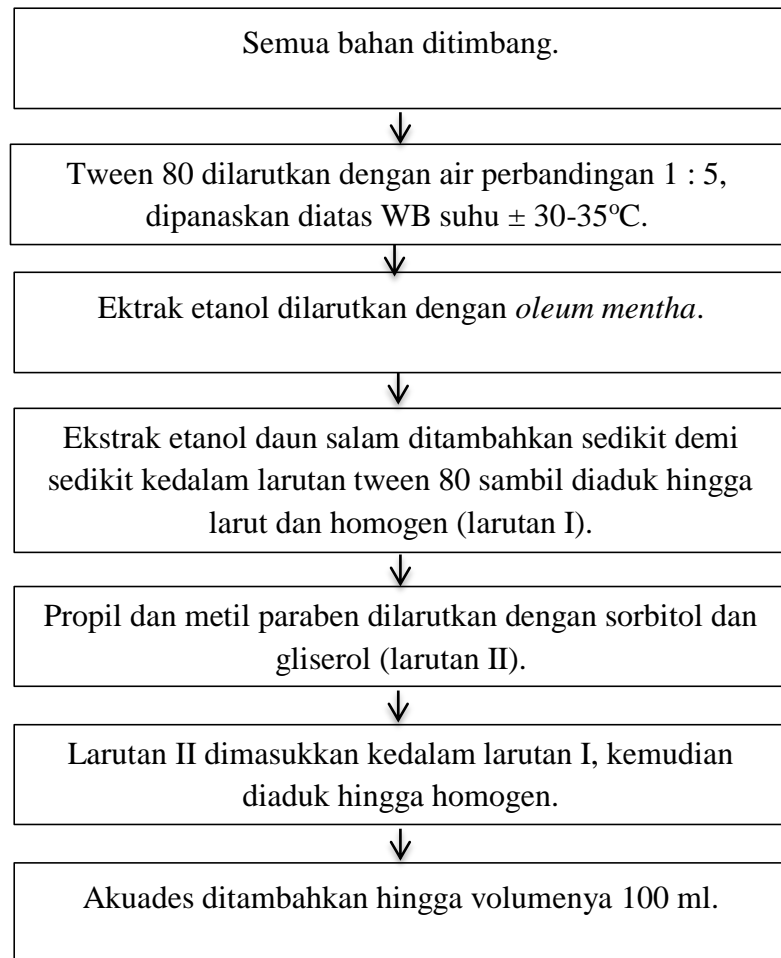
Tabel 2 Klasifikasi respon hambatan pertumbuhan jamur (Greenwood 1995)

Diameter zona bening	Respon hambatan pertumbuhan jamur
>20 mm	Sangat kuat
11-20 mm	Kuat
6-10 mm	Sedang
≤ 5 mm	Lemah

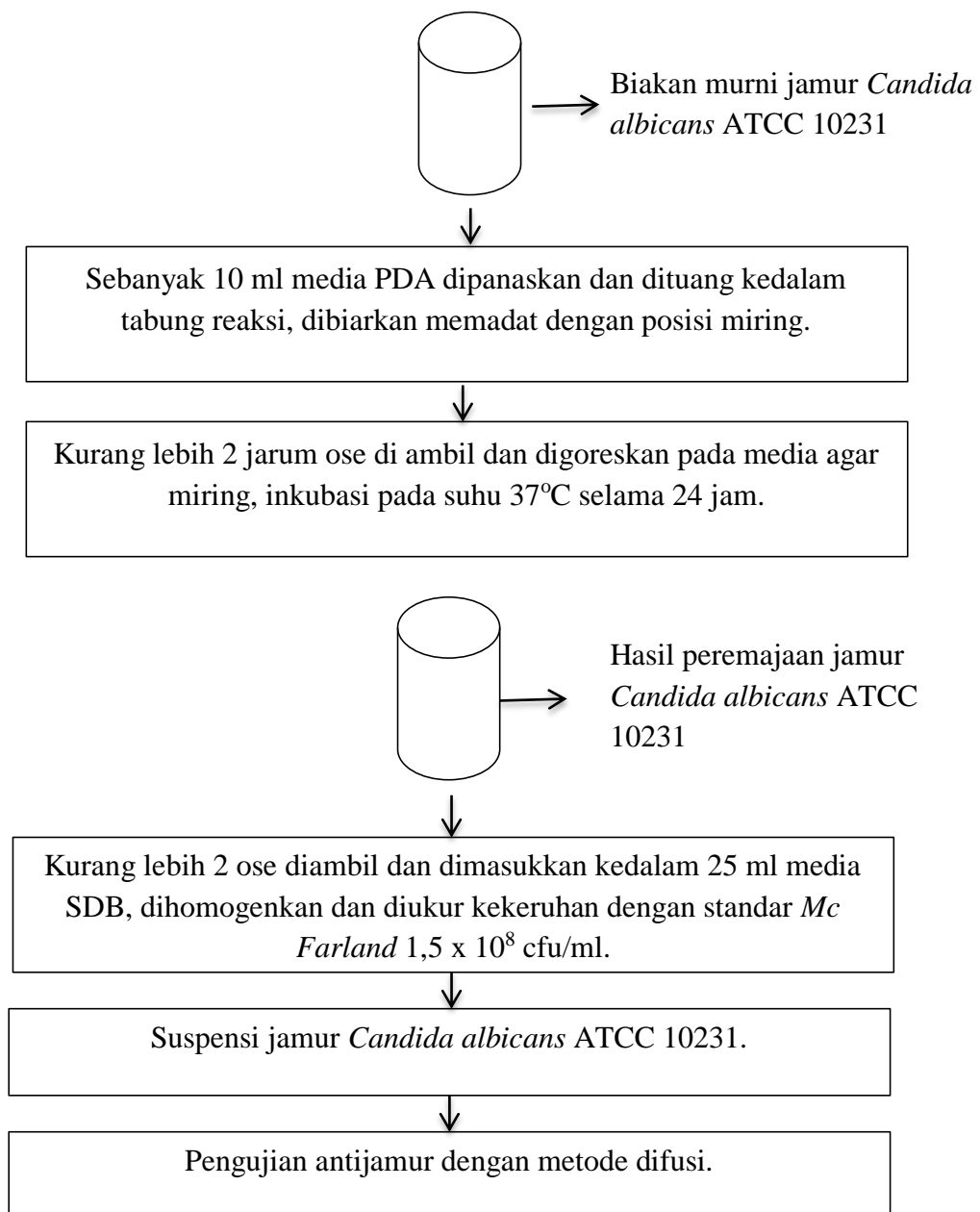
19. Skema jalannya penelitian**Gambar 1 Alur penelitian**



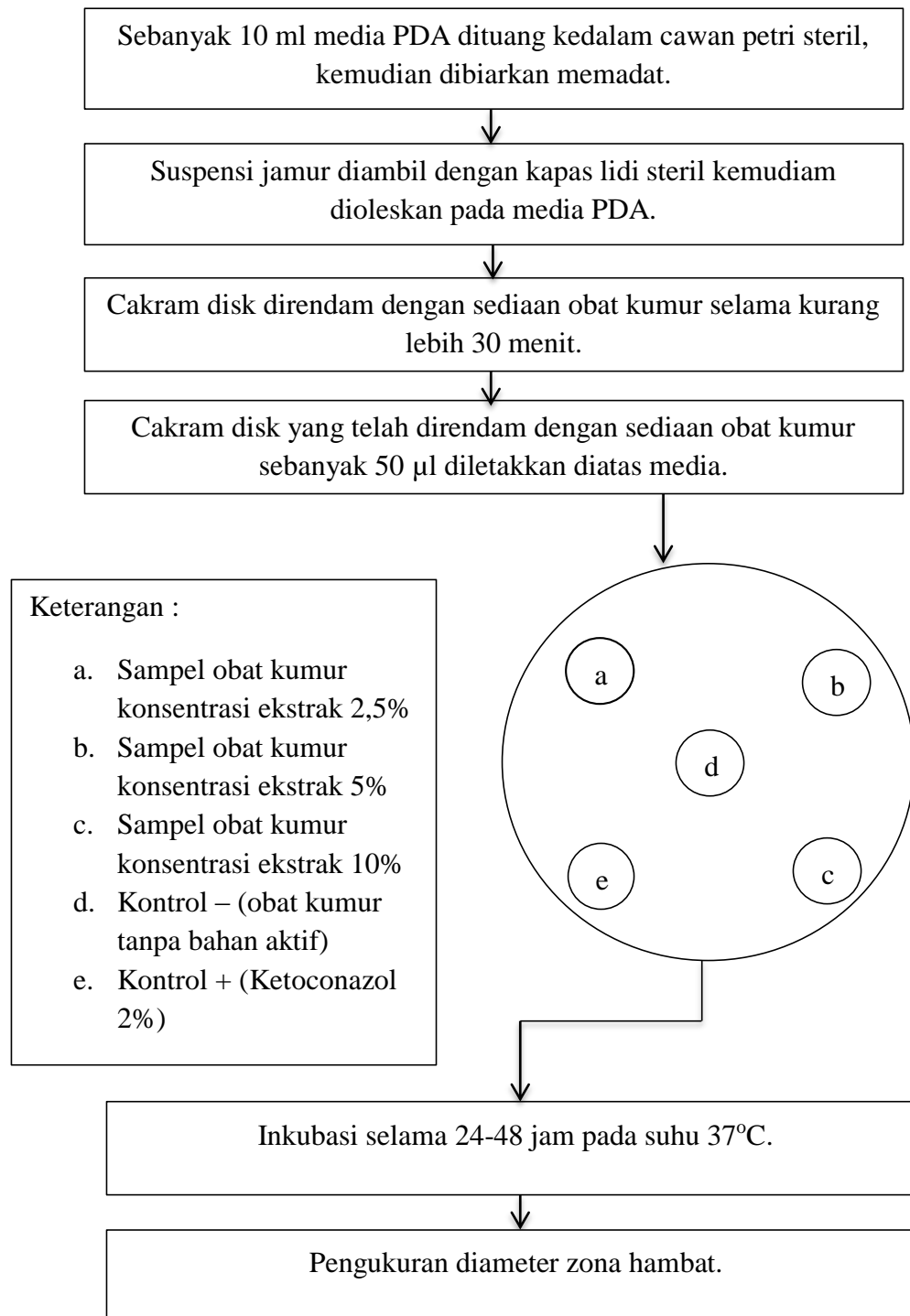
Gambar 2 Skema pembuatan ekstrak etanol daun salam dengan metode maserasi



Gambar 3 Skema pembuatan sediaan obat kumur



Gambar 4 Skema peremajaan dan pembuatan suspensi jamur *Candida albicans*



Gambar 5 Skema pengujian aktivitas anti jamur secara difusi

E. Analisis Hasil

Data hasil penelitian formulasi sediaan obat kumur ekstrak etanol daun salam (*Syzigium polyanthum* (Wight) Walp.) terhadap pertumbuhan jamur *Candida albicans* ATCC 10231 dianalisis menggunakan program SPSS 21.0. Pertama dilakukan uji *Kolmogorov-Smirnov* untuk melihat apakah data terdistribusi normal atau tidak. Data terdistribusi normal ($\text{sig} > 0,05$) maka dilakukan uji *One-Way ANOVA*, kemudian jika memberikan hasil yang signifikan dilanjutkan dengan uji *Tukey* untuk melihat perbedaan daya hambat jamur tiap kelompok. Data tidak terdistribusi normal maka dilakukan uji *Kruskal Wallis* ($\text{sig} < 0,05$), kemudian dilanjutkan uji *pos hoc* menggunakan uji *Mann Whitney* untuk melihat apakah ada perbedaan daya hambat jamur pada semua kelompok perlakuan.