

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Rencana Penelitian**

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorium. Uji daya hambat antijamur dilakukan secara in vitro dengan metode difusi cakram untuk mengetahui daya hambat daun seledri sebagai antijamur terhadap *Candida albicans*.

#### **3.2 Tempat dan Waktu Penelitian**

##### **3.2.1 Tempat**

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi Surakarta.

##### **3.2.2 Waktu**

Penelitian dilakukan pada bulan Juni 2023.

#### **3.3 Alat dan Bahan**

##### **3.3.1 Alat Penelitian**

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah cawan petri steril, tabung reaksi, batang pengaduk, boor proof, erlenmeyer, pipet ukur, jarum ose, kapas steril, kapas lidi steril, kertas koran, mikropipet, blue tip, pembakar spirtus, entkas/laminar air flow, autoklaf, kompor, neraca analitik, rak tabung.

##### **3.3.2 Bahan**

- a. Bahan sampel yang digunakan adalah daun seledri (*Apium graveolens* L) yang diambil sebanyak 1 kg pada bulan Juni 2023 di Kecamatan Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah.
- b. Bahan Kimia : Flukonazol cair (kontrol positif), larutan standard Mc Farland 0,5, serbuk Magnesium, Larutan HCl 2N, pereaktif Dragendroff, FeCl<sub>3</sub> 1% dan FeCl<sub>3</sub> 5%.
- c. Bahan Uji Aktivitas Antijamur : Biakan murni *Candida albicans*, medium yang digunakan pada penelitian ini adalah medium *Sabouroud Glukosa Agar* (SGA) serta aquades steril. Medium SGA didapatkan di Laboratorium Mikologi Universitas Setia Budi Surakarta.

### **3.4 Variabel Penelitian**

- 3.4.1 Variabel Bebas :** Infusa daun seledri (*Apium graveolens* L) variasi 25%, 50%, 75%, dan 100%.
- 3.4.2 Variabel Terikat :** Diameter zona hambat dari pertumbuhan jamur *Candida albicans*.

### **3.5 Cara Kerja Penelitian**

#### **3.5.1 Pengumpulan Bahan**

Daun seledri dipilih yang masih segar, tidak layu maupun busuk. Daun yang digunakan tidak terlalu muda maupun tua.

#### **3.5.2 Sterilisasi Alat dan Bahan**

1. Tabung reaksi, erlenmeyer ditutup kapas, cawan petri dibungkus kertas koran.
2. Disterilisasi dengan autoklaf dengan tekanan 2 atm selama 15 menit pada suhu 121°C (Trianingsih, 2019).

#### **3.5.3 Pembuatan Media *Sabouroud Glukosa Agar***

Pembuatan SGA menurut Mauliya, (2017) yaitu sebagai berikut:

1. Ditimbang media SGA (*Sabouroud Glukosa Agar*) sebanyak 5,2 g.
2. Ditambah dengan 80 ml aquadest steril yang dimasak sampai mendidih.
3. Ditambah kloramfenikol 16 mg.
4. Dimasukkan media dalam keadaan hangat ke dalam tabung reaksi masing-masing 10 ml dan ditutup kapas steril.
5. Disterilkan tabung reaksi dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 2 atm.
6. Dituangkan media SGA sebanyak 10 ml ke dalam cawan petri steril secara aseptis dan biarkan memadat.

#### **3.5.4 Pembuatan Infusa Daun Seledri**

Pembuatan infusa daun seledri menurut Hamzah *et al.*, (2021) sebagai berikut :

1. Daun seledri yang telah dicuci dan dipotong kecil-kecil kemudian ditimbang 100 gr.
2. Daun seledri dimasukkan ke dalam panci infusa dengan penambahan 100 ml aquades steril.

3. Dipanaskan dengan pemanas air selama 15 menit yang dihitung setelah suhu panci mencapai 90°C sambil sesekali diaduk.
4. Disaring saat masih panas menggunakan kertas saring, apabila volume kurang dari 100 ml maka ditambah aquades steril panas pada ampas daun seledri sampai didapatkan volume infusa daun seledri 100 ml.
5. Larutan kemudian ditampung ke dalam erlenmeyer dan ditutup dengan kapas steril.

### 3.5.5 Pembuatan Larutan Uji

Menurut Trianingsih, (2019) pembuatan konsentrasi 25%, 50%, 75%, dan 100% sebagai berikut :

- a. Konsentrasi 25% = dipipet 7,5 ml aquades steril + 2,5 ml infusa daun seledri, dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditutup dengan kapas steril.
- b. Konsentrasi 50% = dipipet 5 ml aquades steril + 5 ml infusa daun seledri, dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditutup dengan kapas steril.
- c. Konsentrasi 75% = dipipet 2,5 ml aquades steril + 7,5 ml infusa daun seledri, dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditutup dengan kapas steril.
- d. Konsentrasi 100% = dipipet 10 ml infusa daun seledri, dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditutup dengan kapas steril.
- e. Kontrol Positif = menggunakan Flukonazol cair yang sudah siap dipakai.
- f. Kontrol Negatif = dipipet 10 ml aquades steril, dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditutup dengan kapas steril.

### 3.5.6 Identifikasi Jamur Uji

1. Jamur *Candida albicans* diidentifikasi di medium *Sabouroud Glukosa Agar* yang telah diinkubasi selama 1-2 hari.
2. Terbentuk koloni lunak warna krem dan baunya seperti ragi. Apabila *Candida albicans* yang masih muda diletakkan pada serum suhu 37°C selama 3 jam akan mambentuk “germ tube” (Efrian, 2016).

### 3.5.7 Standarisasi Mc Fahland 0,5

1. Diambil jamur *Candida albicans* secara aseptis sebanyak 1-2 ose.
2. Dimasukkan dalam tabung reaksi yang telah diberi NaCl fisiologis sebanyak 5 ml.
3. Kekeruhan dari jamur disamakan dengan standar Mc. Farland 0,5 yang setara dengan  $1,5 \times 10^8$  cfu/ml (Sulistyawati *et al.*, 2019).

### 3.5.8 Uji Kandungan Kimia dengan Uji Tabung

#### a. Uji Fenol

1. Infusa daun seledri 1 ml dimasukkan ke tabung reaksi.
2. Ditambah 3 tetes air panas dan 3 tetes pereaksi  $\text{FeCl}_3$  1%.
3. Jika larutan berubah menjadi hijau, ungu atau biru maka terdapat senyawa fenol (Novitasari, 2015).

#### b. Uji Flavonoid

1. Dimasukkan 1 ml infusa ke tabung reaksi.
2. Ditambah beberapa mg serbuk Magnesium dan 10 tetes larutan HCl pekat.
3. Jika warna larutan berubah warna menjadi hitam kemerahan, kuning atau jingga maka terdapat senyawa flavonoid (Rumagit *et al.*, 2015).

#### c. Uji Alkaloid

1. Dimasukkan 1 ml infusa daun seledri ke tabung reaksi.
2. Ditambah 1 ml HCl 2N dan 2 tetes pereaksi Dragendroff.
3. Jika terbentuk endapan jingga atau coklat maka terdapat senyawa alkaloid (Sulistyawati *et al.*, 2019).

#### d. Uji Tanin

1. Infusa daun seledri 1 ml dimasukkan tabung reaksi.
2. Ditambah 3 tetes  $\text{FeCl}_3$  5%.
3. Jika terbentuk warna biru dan hijau kehitaman maka terdapat senyawa tanin (Sulistyawati *et al.*, 2019).

#### e. Uji Saponin

1. Dimasukkan 0,5 ml infusa daun seledri ke tabung reaksi.
2. Ditambah 5 ml aquadest panas.

3. Didinginkan dan dikocok dengan kuat selama 10 menit.
4. Jika terdapat buih maka terdapat senyawa saponin (Sulistyawati *et al.*, 2019).

### **3.5.9 Uji Antijamur**

Pembuatan Kultur Jamur *Candida albicans*

1. Disiapkan media SGA miring dalam tabung steril.
2. Biakan *Candida albicans* diambil 1 ose dan diinokulasikan pada tabung secara *streak plate*.
3. Inkubasi 2-3 hari pada suhu 37°C (Sulistyawati *et al.*, 2019).

### **3.5.10 Pengujian Antijamur Dengan Metode Difusi**

#### **a. Penanaman pada Media Sabouroud Glucosa Agar**

1. Diambil suspensi jamur dalam tabung menggunakan kapas lidi steril.
2. Didiamkan hingga cairan menyerap ke dalam kapas lidi tersebut.
3. Kapas lidi diangkat dan ditekan sedikit pada dinding tabung bagian dalam untuk meniriskan kelebihan cairan.
4. Cairan pada kapas lidi steril digoreskan pada media *Sabouroud Glucose Agar* secara aseptis.
5. Tutup cawan petri dan bungkus dengan kertas koran (Della, 2020).

#### **b. Perendaman Cakram**

Kertas cakram ukuran 6 mm yang akan digunakan direndam dalam larutan infusa daun seledri yang sudah dibuat berbagai konsentrasi, masing-masing konsentrasi terdapat 2 kertas cakram (duplo), perendaman dilakukan selama 15 menit supaya infusa daun seledri dapat menyerap secara maksimal kedalam kertas cakram, kemudian kertas cakram diletakkan pada media yang telah ditanami oleh *Candida albicans* (Intan *et al.*, 2021).

#### **c. Inkubasi**

Cawan petri yang sudah diinokulasikan dengan suspensi *Candida albicans* kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 1-2 hari (Della, 2020).

#### **d. Analisis Hasil**

Hasil ditentukan dengan metode difusi yang diamati terhadap adanya zona radikal serta iradikal dan diukur daerah hambatnya sesuai dengan kategori respon zona hambat menurut Sulistyawati *et al.*, (2019), yaitu sebagai berikut :

**Tabel 3. 1** Kategori Respon Zona Hambat

Diameter Zona Hambat	Respon Hambat
< 5 mm	Lemah
5-10 mm	Sedang
10-20 mm	Kuat
>20 mm	Sangat Kuat