

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Metode penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah penelitian yang bersifat deskriptif yang bertujuan untuk mengetahui aktivitas antifungi ekstrak etanol 70% daun teh - tehan (*Acalypha siamensis*) terhadap *Candida albicans*.

Tahap penelitian ini meliputi tiga tahap kerja. Pertama, determinasi tumbuhan teh-tehan (*Acalypha siamensis*), persiapan sampel daun teh-tehan (*Acalypha siamensis*), persiapan alat dan bahan. Kedua, tahap pelaksanaan dalam penelitian yaitu pembuatan simplisia daun teh-tehan (*Acalypha siamensis*), pembuatan sampel ekstrak daun teh-tehan (*Acalypha siamensis*), uji identifikasi fitokimia, pembuatan kontrol media, kontrol antifungi, pembuatan suspensi mikroba, sterilisasi alat dan bahan, persiapan uji fungi *Candida albicans* yang ditumbuhkan dan diremajakan dimedia SDA, identifikasi *Candida albicans*. Ketiga, tahap akhir dalam penelitian ini adalah aktivitas antifungi ekstrak etanol 70% daun teh-tehan (*Acalypha siamensis*) terhadap *Candida albicans* menggunakan metode difusi agar sumuran dengan melihat zona hambat ditandai dengan zona bening yang dihasilkan dari ekstrak daun teh-tehan (*Acalypha siamensis*) terhadap pertumbuhan *Candida albicans* yang ditanam pada media SDA.

3.2 Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi dalam penelitian ini adalah daun teh-tehan (*Acalypha siamensis*) sedangkan sampel uji yang digunakan adalah sebagian daun teh – tehan (*Acalypha siamensis*) yang diambil dari Desa Plandi Kecamatan Wonosari Kabupaten Malang.

3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian uji aktivitas antifungi ekstrak etanol 70% daun teh-tehan terhadap *Candida albicans* ini akan dilaksanakan di Laboratorium Farmakognosi dan Laboratorium Mikrobiologi Akademi Farmasi Putra Indonesia Malang pada tanggal 1 Maret sampai 30 Mei 2019.

3.4 Definisi Operasional Variabel

Definisi operasional variabel dalam penelitian ini terdiri dari dua sub variabel. Sub variabel satu dalam penelitian ini adalah Ekstrak daun teh-tehan (*Acalypha siamensis*). Sedangkan sub variabel dua dalam penelitian ini adalah aktivitas antifungi.

Definisi operasional variabel dalam penelitian ini dapat diklarifikasikan sebagai berikut :

Tabel 3.1 Definisi Operasional Variabel

Variabel	Definisi Variabel	Alat ukur	Hasil ukur	Skala ukur
Ekstrak etanol 70% daun teh-tehan (<i>Acalypha siamensis</i>)	Cairan ekstrak kental yang diperoleh dari ekstraksi metode maserasi daun teh – tehan (<i>Acalypha siamensis</i>).	Timbangan analitik	%	Nominal
Aktivitas antifungi ekstrak etanol 70% daun teh-tehan (<i>Acalypha siamensis</i>) terhadap jamur <i>Candida albicans</i>	Kemampuan suatu senyawa dapat memberikan efek bagi mikroorganisme	Jangka sorong	Adanya zona bening Disekitar sumuran pada media uji	Nominal

3.5 Alat dan Bahan

3.5.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain pisau, gunting, bak cuci, Loyang, oven, blender, ayakan, timbangan analitik, botol coklat, kertas saring, corong Buchner, *rotary evaporator*, cawan penguap, *waterbath*, tabung reaksi, rak tabung reaksi, cawan petri, Erlenmeyer, *beaker glass*, *blue tip*, kapas, kertas coklat, oven, autoklaf, inkubator, jarum ose, Bunsen, kawat kasa, kaki tiga,

korek api, batang pengaduk, spektrofotometer UV-Vis, bor, LAF (*Laminar Air Flow*), alat pelubang sumuran, jangka sorong.

3.5.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain daun teh-tehan (*Acalypha siamensis*), air, etanol 70%, FeCl₃ 3%, FeCl₃ 1%, NaOH, H₂SO₄, dragendroff, mayer, wagner, n-heksana, asam asetat anhidrat, biakan murni *Candida albicans* yang didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas MIPA Universitas Brawijaya Malang, Sabouroud Dextrosa Agar, aquades, NaCl 0,9%.

3.6 Prosedur Kerja

Pengumpulan data dalam penelitian ini dilakukan melalui langkah kerja sebagai berikut:

3.6.1 Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman teh-tehan (*Acalypha siamensis*) dilakukan di LIPI balai konservasi tumbuhan kebun raya Purwodi (2019).

1.6.2 Pengambilan Sampel daun Teh-tehan (*Acalypha siamensis*)

3.6.2.1 Pembuatan simplisia

Adapun cara pembuatan serbuk simplisia adalah sebagai berikut :

1. Dikumpulkan daun teh-tehan (*Acalypha siamensis*) yang akan dijadikan simplisia, daun yang diambil adalah daun keempat dan kelima dari pucuk
2. Disortasi daun teh-tehan (*Acalypha siamensis*) yang masih kotor
3. Dicuci daun teh-tehan (*Acalypha siamensis*) yang telah disortasi, dengan cara direndam dan dibilas menggunakan air mengalir
4. Dikering anginkan daun teh-tehan (*Acalypha siamensis*) untuk mengurangi kadar air sisa dicuci.

5. Dikeringkan daun teh-tehan (*Acalypha siamensis*) dibawah sinar matahari dengan menggunakan penutup kain hitam.
6. Diblender daun teh-tehan (*Acalypha siamensis*) yang telah kering kemudian diayak menggunakan ayakan 40 mesh (Rizkia, 2014).

1.6.3 Pembuatan Ekstrak

Pembuaan ekstrak daun teh-tehan (*Acalypha siamensis*) dilakukan dengan metode maserasi dengan pelarut etanol 70% yaitu sebagai berikut :

1. Ditimbang serbuk simplisia sebanyak 100 gram
2. Dimasukkan kedalam botol coklat demudian ditambahkan etanol 70% sebanyak 500 mL.
3. Disimpan selama 7 hari, sambil sesekali diaduk, dilakukan pengulangan sebanyak empat kali.
4. Disaring menggunakan corong buchner
5. Dituangkan filtrat kedalam tabung *rotary evaporator*, diuapkan dengan suhu 40⁰C sampai tetesan berwarna coklat muda.
6. Dituangkan hasil ke cawan penguap, diuap di waterbat dengan suhu 40⁰C sampai diperoleh ekstrak kental (Sari V. Y., 2010)

1.6.4 Uji Skrining fitokimia

3.6.4.1 Uji Fenol

1. Sebanyak 2 mL ekstrak daun teh-tehan dimasukkan ke dalam tabung reaksi
Kemudian ditambahkan 10 tetes air panas dan 3 tetes pereaksi FeCl₃ 3%
2. Apabila warna larutan berubah menjadi hijau kebiruan atau biru gelap maka menunjukkan bahwa ada senyawa fenol (Rijayanti, 2014).

3.6.4.2 Uji Tanin

1. Diambil 1 mL ekstrak daun teh-tehan dimasukkan ke dalam tabung reaksi
2. Kemudian dimasukkan 2 mL air dan ditambahkan 3 tetes larutan FeCl_3 1%
3. Apabila timbul warna biru kehitaman atau hijau kehitaman berarti terdapat senyawa tanin (Rijayanti, 2014)

3.6.4.3 Uji Flavonoid

1. Sebanyak 5 mL ekstrak daun teh-tehan dimasukkan ke dalam tabung reaksi
2. Ditambahkan 3 tetes larutan NaOH
3. Jika terbentuk warna kuning intens yang menjadi tidak berwarna dengan penambahan H_2SO_4 encer menunjukkan adanya senyawa flavonoid (Rahmadani, 2015)

3.6.4.4 Uji Alkaloid

1. Sebanyak 0,1g ekstrak daun teh-tehan dilarutkan 10mL kloroform amoniak lalu hasilnya dibagi menjadi dua bagian yang sama.
2. Untuk bagian pertama kemudian ditambahkan H_2SO_4 2N, lalu dikocok sampai terbentuk 2 lapisan.
3. Diambil lapisan asam dan dibagi menjadi 3 tabung.
 - a) Tabung I : Ditetesi dragendroff 2-3 tetes, hasil positif ditunjukkan dengan adanya endapan atau kekeruhan (hitam).
 - b) Tabung II : Ditetesi pereaksi mayer 2-3 tetes, hasil positif ditunjukkan dengan adanya endapan putih/kekuningan.
 - c) Tabung III : Ditetesi pereaksi wagner 2-3 tetes, hasil positif ditunjukkan dengan adanya endapan coklat kemerahan (Rijayanti, 2014).

3.6.4.5 Saponin

1. Sebanyak 2 mL ekstrak daun teh-tehan dimasukkan ke dalam tabung reaksi

2. Kemudian ditambahkan 10 mL air panas, lalu didinginkan setelah itu dikocok dengan kuat selama 10 menit hingga terbentuk buih dan jika buih tidak hilang selama 10 menit dengan tinggi 1-10 cm, maka ekstrak tersebut mengandung saponin (Rijayanti, 2014)

3.6.4.6 Uji Steroid

1. Sebanyak 2 mL ekstrak daun teh-tehan dilarutkan dengan 1 mL n-Heksana
2. Lalu ditambah dengan 0,5 mL asam asetat anhidrat
3. Campuran larutan tersebut kemudian ditetesi 2 mL H₂SO₄ pekat melalui dinding tabung.
4. Apabila diperoleh cincin berwarna hijau kebiruan pada perbatasan dua pelarut maka ditandai dengan adanya senyawa steroid (Rijayanti, 2014).

1.6.5 Sterilisasi Alat Dan Bahan

1. Disiapkan alat dan bahan terlebih dahulu yang akan digunakan seperti tabung reaksi, cawan petri, erlenmeyer, *beaker glass*, *bluetip*.
2. Disiapkan 8 cawan petri kosong, 5 bluetip dimasukkan ke dalam beaker glass 100 mL, 5 tabung reaksi dan dibungkus menggunakan kertas coklat.
3. Disterilkan erlenmeyer dan *bluetip* dalam autoklaf dengan suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit.
4. Disterilkan cawan petri menggunakan oven dengan suhu 170⁰C selama 15-30 menit (Rahmadani, 2015)

1.6.6 Pembuatan Media

3.6.6.1 Pembuatan media SDA

1. Pembuatan media agar dilakukan dengan mencampurkan 10,075 gram SDA dengan 155 mL aquadest dalam erlemeyer 250 mL.
2. Media dipanaskan dan disterilkan didalam autoklaf selama 15 menit, pada suhu 121⁰C pada 1 atm.

3.6.6.2 Peremajaan Fungi

1. Inokulasi 1 ose *Candida albicans* dari biakan murni kedalam 5 tabung reaksi yang berisi media Saboroud Dextrose Agar
2. Setelah itu, diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37⁰C selama 24 jam. (Rahmawati, 2015).

3.6.6.3 Identifikasi jamur *Candida albicans*

1. Bersihkan gelas obyek dengan alkohol 70%, kemudian ditetesi dengan larutan Methylen Blue
2. Ambil satu ose biakan murni dan letakkan di atas gelas obyek
3. Tutup dengan cover glass kemudian amati dibawah mikroskop

3.6.6.4 Pembuatan Suspensi

1. Diambil satu ose biakan jamur *Candida albicans* yang berumur 24 jam,
2. kemudian dicampurkan kedalam tabung reaksi yang berisi cairan NaCl 0,9% sebanyak 10 mL.
3. Suspensi jamur dihomogenkan dengan dikocok selama kurang lebih 15 detik, lalu dituangkan ke dalam cuvet sebanyak 7 mL.

4. Cuvet dimasukkan ke dalam spektrofotometri untuk diukur kekeruhannya dengan panjang gelombang 530 nm dengan 90%T (Krisyanella, et al., 2016)

1.6.7 Pembutan Kontrol

1.6.7.1 Kontrol Media

1. Dimasukkan media SDA sebanyak 15 mL ke dalam cawan petri steril
2. Digoyang-goyangkan sesuai dengan angka 8 sampai merata dan ditunggu hingga memadat.
3. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 24 jam (Krisyanella, et al., 2016)

3.6.7.2 Kontrol Fungi

1. Dimasukkan suspensi fungi *Candida albicans* ke dalam cawan petri sebanyak 1 mL menggunakan mikropipet.
2. Kemudian dimasukkan media SDA sebanyak 15 mL lalu digoyang-goyangkan sesuai angka 8.
4. Biarkan memadat dan dibungkus dengan kertas coklat dan diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 24 jam (Krisyanella, et al., 2016).

1.6.8 Pengujian Antifungi

1. Disiapkan alat dan bahan
2. Dimasukkan suspensi jamur ke dalam cawan petri
3. Kemudian ditambahkan media sebanyak 15 mL, digoyang - goyangkan sesuai angka delapan dan dibiarkan memadat.

4. Dibuat lubang sumuran pada 5 cawan petri dengan menggunakan bor (pelubang) steril pada tengah cawan petri, lalu dilakukan perlakuan pada masing-masing cawan petri yaitu :

Maserat : 5 cawan petri yang telah dibuat lubang sumuran kemudian diisi dengan maserat daun teh-tehan, dilakukan didalam LAF (*Laminar Air Flow*).
5. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 48-120 jam.
6. Dihitung diameter zona bening atau zona (Krisyanella dkk., 2016)

1.7 Analisa Data

Dalam penelitian ini analisa data di analisis menggunakan data yang diperoleh meliputi hasil rendemen ekstrak dan hasil pengukuran zona bening pada lempeng media menggunakan jangka sorong. Data tersebut disajikan dalam bentuk tabel dan dimasukkan kedalam kategori kuat, sedang, lemah atau tidak punya daya hambat.