

BAB III
METODE PENELITIAN
3.1 Bahan Dan Alat

3.1.1 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain kapang endofit tanaman tin (*Ficus carica* L.), alkohol 70%, aquadest steril, BaCl₂ encer 1%, *Bayclin* (kadar NaOCl 5,25%), *Dimethyl Sulphoxide* (DMSO), etil asetat, H₂SO₄ encer 1%, Jamur *Candida* sp, Kapas, Kassa steril, Kloramfenikol 100mg/L (*Erlamycetin* tetes telinga dengan kadar kloramfenikol 1%), *Microplate 96 well*, *Mueller Hinton Broth* (MHB), NaCl 0,9%, *Potato Dextrose Agar* (PDA), *Potato Dextrose Broth* (PDB), *Saboroud Dextrose Agar* (SDA), pipa kapiler, plat silika gel 60 GF254, *aluminium foil*, Blue tip, Yellow tip, White tip, *petri dish disposable*, pisau steril, tisu steril, kertas saring (Whatman No. 1, England).

3.1.2 Alat

Alat-alat yang digunakan di dalam penelitian ini adalah *Laminar Air Flow Purifer Class II Cabinet* (ESCO), inkubator (Memmert), *microplate reader*, *microwave* (Panasonic), *autoclave* (ALL AMERICAN), *shaker incubator* (Mandiri Technics MFG), *vacuum rotary evaporator* (Heidollph – L4000), *chamber*, timbangan analitik (Mettler Toledo), skalpel, corong pisah, ose, bunsen, pipet, *cork borer*, *micropipet* (BRAND), tabung reaksi (Pyrex) dan alat-alat gelas lainnya.

3.2 Cara Penelitian

3.2.1 Isolat Kapang Endofit Tanaman Tin

Isolat yang digunakan merupakan hasil penelitian sebelumnya. Rimbawan (2018), telah melakukan beberapa tahapan untuk mendapatkan isolat. Tahapan tersebut meliputi koleksi dan determinasi tanaman tin, sterilisasi permukaan tanaman uji, isolasi kapang endofit, pemurnian kapang endofit, dan karakterisasi kapang endofit. Tahapan skema kerja tersebut terlampir dalam Lampiran 1, 2, dan

3. Setelah semua tahapan dilakukan didapatkan 5 isolat tunggal kapang endofit yaitu A₂ dari akar, Ba₂ dari batang, Bu₂ dari buah D₁ dari daun 1, dan D₂ dari daun 2 (Rimbawan, 2018). Isolat-isolat yang telah didapatkan dari peneliti sebelumnya kemudian dilanjutkan dengan proses peremajaan hingga pengujian senyawa dan aktivitas antifungi.

3.2.2 Tempat Pelaksanaan Penelitian

3.2.2.1 Peremajaan Kapang Endofit

Peremajaan kapang endofit dilakukan di Laboratorium Mikologi, Fakultas Pertanian UGM, Jalan Flora, Bulaksumur, Caturtunggal, Depok, Sleman, Yogyakarta.

3.2.2.2 Ekstraksi Kapang Endofit

Ekstraksi kapang endofit dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi, Fakultas MIPA UII, Sleman, Yogyakarta.

3.2.2.3 Kultur Cair dan Uji Aktivitas Antifungi Kapang Endofit

Kultur Cair dan uji aktivitas antibakteri kapang endofit dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Farmasi, Fakultas MIPA UII, Sleman, Yogyakarta.

3.2.3 Pembuatan Media Agar

Media yang digunakan telah tersedia dalam bentuk kemasan, sehingga dalam pembuatannya dengan cara ditimbang kemudian melarutkannya dengan aquadest sesuai dengan instruksi yang terdapat pada tiap kemasan. Jumlah media yang ditimbang sesuai dengan volume yang dibutuhkan.

3.2.3.1 Media *Potato Dextrose Agar (PDA) Plate*

Pembuatan media *Potato Dextrose Agar (PDA) plate* dilakukan sesuai dengan prosedur yang tertera di dalam kemasan. *Potato Dextrose Agar (PDA)* ditimbang sebanyak 12,09 gram, kemudian dilarutkan dengan menggunakan *aquadest* 310 ml selanjutnya dimasukkan ke dalam *erlenmeyer*. Setelah itu dicampur hingga homogen dengan cara diaduk dan dipanaskan dalam *microwave*. Kemudian bagian mulut *erlenmeyer* ditutup rapat menggunakan kapas dan

aluminium foil lalu disterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15-20 menit dengan tekanan 1 atm. Media yang telah disterilisasi selanjutnya dituang ke dalam *petri dish* dan didiamkan hingga memadat.

3.2.3.2 Media *Potato Dextrose Broth* (PDB)

Pembuatan media *Potato Dextrose Broth* (PDB) dilakukan secara manual yaitu dengan cara menimbang kentang yang telah dikupas sebanyak 200 gram. Kemudian dipotong seperti bentuk kubus dan direbus dengan *aquadest* hingga mendidih selama ± 30 menit. Setelah itu dipisahkan air rebusan dengan kentang menggunakan kertas saring. Selanjutnya, air rebusan ditambahkan *dextrosa* sebanyak 20 gram dan ditambahkan *aquadest* hingga volume akhir 1 liter. Kemudian dituang ke dalam *erlenmeyer* dan bagian mulut *erlenmeyer* ditutup rapat menggunakan kapas dan *aluminium foil* lalu disterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15-20 menit dengan tekanan 1 atm. Setelah dilakukan sterilisasi media siap digunakan.

3.2.3.3 Media *Saboroud Dextrose Agar* (SDA) *Slant*

Pembuatan media *Saboroud Dextrose Agar* (SDA) *slant* dilakukan sesuai dengan prosedur yang tertera dalam kemasan yaitu cara pertama dengan ditimbang SDA sebanyak 1,3 gram, kemudian dilarutkan dengan menggunakan *aquadest* 20 ml selanjutnya dimasukkan ke dalam *erlenmeyer*. Setelah itu dicampur hingga homogen dengan cara diaduk dan dipanaskan dalam *microwave*. Kemudian, media dituang ke dalam tabung reaksi sebanyak 3 ml, selanjutnya bagian mulut tabung reaksi ditutup rapat menggunakan kapas dan *aluminium foil* lalu disterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15-20 menit dengan tekanan 1 atm. Setelah media disterilisasi, tabung reaksi tersebut diletakkan dalam posisi miring $\pm 45^\circ$ dan dibiarkan hingga memadat.

3.2.3.4 Media *Mueller Hinton Broth* (MHB)

Pembuatan media *Mueller Hinton Broth* (MHB) dilakukan sesuai dengan prosedur yang tertera dalam kemasan yaitu cara pertama dengan ditimbang MHB

sebanyak 0,525 gram, kemudian dilarutkan menggunakan *aquadest* 25 ml selanjutnya dimasukkan ke dalam *erlenmeyer*. Setelah itu dicampur hingga homogen dengan cara di aduk dan dipanaskan dalam *microwave*. Kemudian bagian mulut *erlenmeyer* ditutup rapat menggunakan kapas dan *aluminium foil* lalu disterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15-20 menit dengan tekanan 1 atm. Setelah dilakukan sterilisasi media siap digunakan.

3.2.4 Peremajaan Kapang Endofit

Peremajaan kapang endofit dengan diinokulasikan menggunakan pisau steril kemudian dipindahkan ke dalam media PDA selanjutnya dibiarkan selama 7-14 hari pada suhu ruangan. Semua pengerjaan dilakukan di dalam LAF secara aseptis.

3.2.5 Kultur Cair dan Ekstraksi Kapang Endofit

Proses kultur cair dimulai dengan mengambil isolat sekitar 3-5 potong menggunakan *cork borer*. Kemudian dilakukan inokulasi ke dalam labu *Erlenmeyer* 250 ml yang sudah berisi media *Potato Dextrose Broth* (PDB) sebanyak 100 ml. Selanjutnya dilakukan inkubasi secara kultur dinamis dengan menggunakan *shaker incubator* pada kecepatan 60 rpm pada suhu 25-30°C selama 14 hari. Kultur hasil inkubasi tersebut, kemudian disaring menggunakan kertas saring (Whatman No. 1, England) yang berfungsi untuk memisahkan filtrat dengan miselia. Filtrat yang didapat berupa cairan bening. Filtrat tersebut selanjutnya diekstraksi cair-cair menggunakan etil asetat dengan perbandingan filtrat:etil asetat yaitu 1:1 dalam corong pisah. Sebelum dilakukan pemisahan dengan corong pisah ekstraksi dibantu dengan ultrasonikator yang berfungsi untuk mempercepat ekstraksi. Proses ekstraksi cair – cair tersebut dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan. Fase etil asetat dikoleksi selanjutnya diuapkan dengan *vacuum rotary evaporator* hingga diperoleh *crude extract*. Kemudian yang didapat *crude extract*, selanjutnya diencerkan dengan DMSO sebanyak 2 ml untuk pengujian (Rimbawan, 2018).

3.2.6 Peremajaan Jamur Uji

Peremajaan jamur uji berupa jamur *Candida albicans* dilakukan dengan menginokulasikan masing-masing bakteri ke dalam media SDA *slant* menggunakan ose steril dengan teknik *continuous streak*. Pengerjaan dilakukan secara aseptis di dalam LAF. Kemudian media yang berisi bakteri uji diinkubasi selama 72 jam pada suhu 27°C.

3.2.7 Pembuatan Standar *Mc Farland* (Standar Kekeruhan)

Standar McFarland yang dibuat adalah Standar McFarland 0,5. Adapun cara pembuatannya yaitu mencampurkan 1% barium klorida encer sebanyak 0,05ml dengan 1% asam sulfat encer sebanyak 9,95 ml ke dalam tabung reaksi lalu divortex, sehingga diperoleh Standar McFarland 0,5 yang setara dengan jumlah bakteri $1,5 \times 10^8$ CFU/ml.

3.2.8 Pembuatan Suspensi Jamur Uji

Jamur yang tumbuh dalam media SDA *slant* kemudian dipindah ke dalam media PDB sebanyak 1 ml lalu ditambahkan NaCl 0,9% yang telah steril hingga kekeruhannya sama dengan Standar McFarland 0,5 yang telah dibuat. Semua pengerjaan dilakukan di dalam LAF secara aseptis.

3.2.9 Pembuatan Larutan PBS (*Phosphat Buffer Saline*)

Cara pembuatan larutan PBS sesuai dengan cara pembuatan yang tertera dalam kemasan, yaitu melarutkan 1 tablet PBS 100ml *aquadest*. Lalu di sterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15-20 menit dengan tekanan 1 atm.

3.2.10 Pembuatan Reagen MTT

Cara pembuatan reagen MTT dengan cara menimbang serbuk MTT sebanyak 15mg kemudian dilarutkan dalam PBS steril sebanyak 3ml. Lalu diambil 300µl dan dilarutkan kembali dengan PBS sebanyak 2,7ml. Selanjutnya disimpan di tempat terlindung dari cahaya matahari.

3.2.11 Uji Golongan Senyawa dengan KLT dan Pereaksi Semprot

Metabolit sekunder kapang endofit tanaman tin dielusi pada plat KLT silika gel 60 GF254 ukuran 10 cm x 3 cm pada setiap ekstrak dengan menggunakan fase gerak yaitu etil asetat : kloroform. Perbandingan fase gerak yang digunakan pada kelima ekstrak A₂, Ba₂, Bu₂, D₁, dan D₂ yaitu sebagai berikut, A₂ yaitu 3 : 2, Ba₂ yaitu 1 : 1, Bu₂ yaitu 1 : 1, D₁ yaitu 5 : 3, dan D₂ yaitu 5 : 3. Penotolan ekstrak pada plat silika gel menggunakan pipa kapiler dan ditotolkan ditengah-tengah plat. Setelah terelusi, diidentifikasi secara kualitatif kandungan golongan senyawa kimianya menggunakan pereaksi semprot yaitu *Lieberman-burchard*, feri-klorida (FeCl₃), anisaldehyd-asam sulfat, aluminium-klorida (AlCl₃), dan *Dragendorff*. Pereaksi semprot *dragendorff* digunakan untuk mendeteksi senyawa alkaloid dengan memberikan perubahan warna menjadi jingga (Fried and Sherma, 1994). Pereaksi semprot AlCl₃ mendeteksi senyawa flavonoid dengan memberikan warna kuning bila dilihat pada sinar UV 366 (Fried and Sherma, 1994). Senyawa fenolik dideteksi menggunakan pereaksi semprot FeCl₃ dengan memberikan warna biru kehitaman, hijau atau biru kehijauan atau dengan menggunakan reagen *4-aminoantipyrine* akan berubah warna menjadi merah, oranye atau pink (Fried and Sherma, 1994). Senyawa terpenoid (steroid) dideteksi menggunakan pereaksi semprot LB (*Liebermann Burchard*) dengan memberikan warna ungu kecoklatan (da Silva, *et al.*, 2007). Senyawa terpenoid lain dapat dideteksi menggunakan pereaksi semprot anisaldehyd-asam sulfat dengan memberikan warna ungu kemerahan (Fried and Sherma, 1994).

3.2.12 Uji Aktivitas Antifungal terhadap *Candida albicans*

Pengujian aktivitas antifungi dilakukan dengan menggunakan metode MTT Assay. Pengujian menggunakan *microplate 96 well* yang terbagi atas 4 zona, yaitu perlakuan (P), kontrol jamur (KJ), kontrol pelarut (KP), dan kontrol media (KM). Zona perlakuan (P) pada sumuran ke-1 berisi 196µl media MHB yang mengandung suspensi jamur uji *C. albicans* (1,5x10⁵ CFU/ml) dan 4µl ekstrak filtrak kapang endofit. Sumuran ke-2 berisi 100µl media MHB yang mengandung suspensi jamur uji *C. albicans* (1,5x10⁵ CFU/ml). Kemudian dilakukan

pengenceran bertingkat dari sumuran ke-1 hingga sumuran ke-9 untuk mendapatkan konsentrasi ekstrak filtrak kapang endofit dari 2000 μ g/ml hingga 7,8125 μ g/ml dan volume akhir pada setiap sumuran yaitu 100 μ l. Kontrol jamur diberikan 100 μ l media MHB yang mengandung suspensi jamur uji *C. albicans* ($1,5 \times 10^5$ CFU/ml). Kontrol pelarut diberikan 90 μ l media MHB yang mengandung suspensi jamur uji *C. albicans* ($1,5 \times 10^5$ CFU/ml) ditambah 10 μ l DMSO 100%, dan untuk kontrol media diberikan 100 μ l media MHB. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dalam inkubator. Selanjutnya ditambahkan 10 μ l reagen MTT pada semua kontrol dan didiamkan selama 30 menit. Proses terakhir yang dilakukan yaitu pengukuran absorbansi dengan *microplate reader* pada panjang gelombang 570 nm.

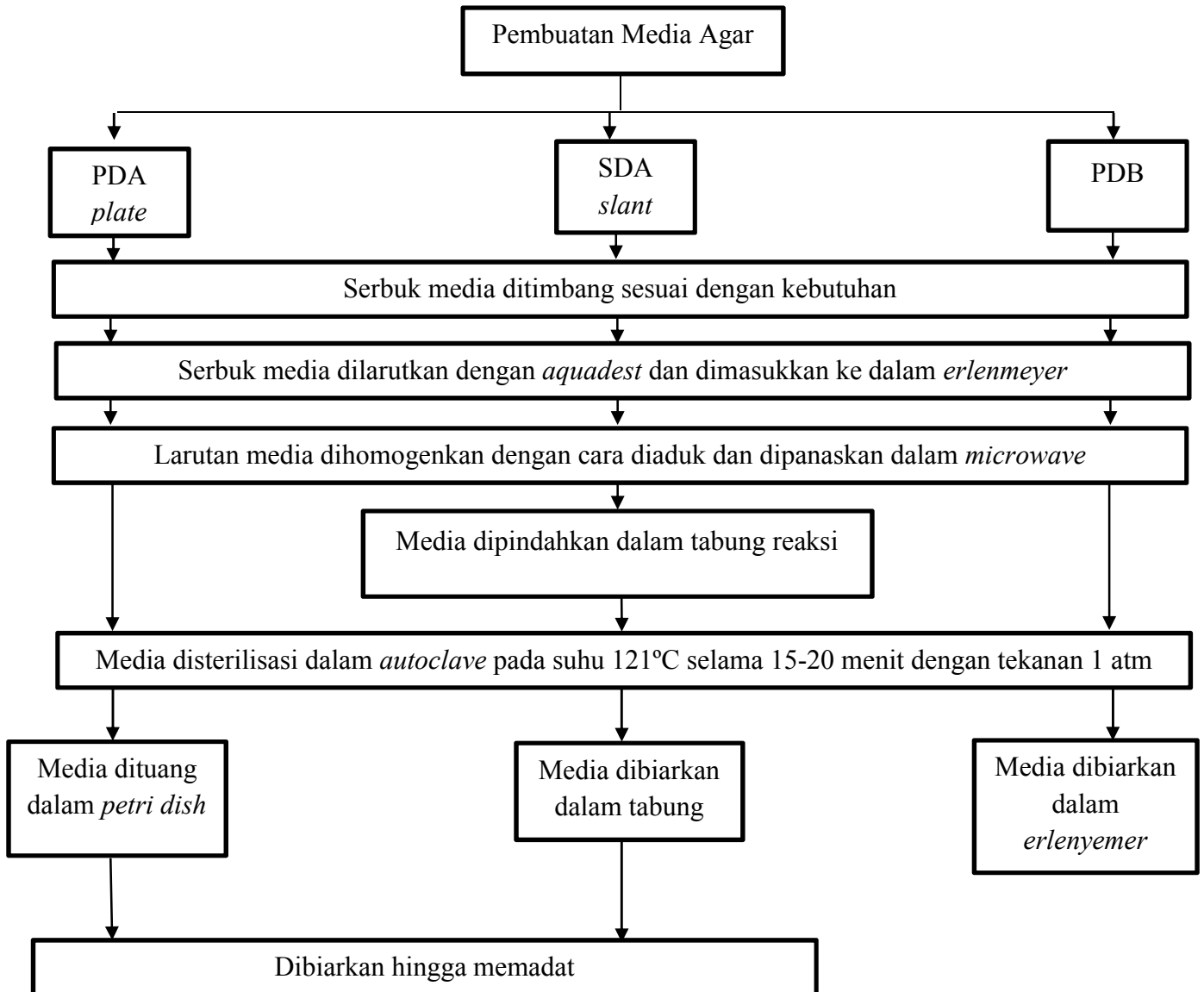
3.3 ANALISIS HASIL

Hasil pengujian aktivitas antifungal dari *Ficus carica* L. dianalisis secara kualitatif dengan cara mengamati perubahan warna setelah penambahan reagen MTT dan secara kuantitatif dengan menghitung persen nilai kematian sel jamur dari hasil pembacaan nilai absorbansi setiap sampel menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 570nm. Persen kematian sel jamur dihitung menggunakan rumus:

$$\%kematian\ jamur = \frac{absorbansi\ kontrol\ jamur - absorbansi\ kontrol\ perlakuan}{absorbansi\ kontrol\ jamur} \times 100\%$$

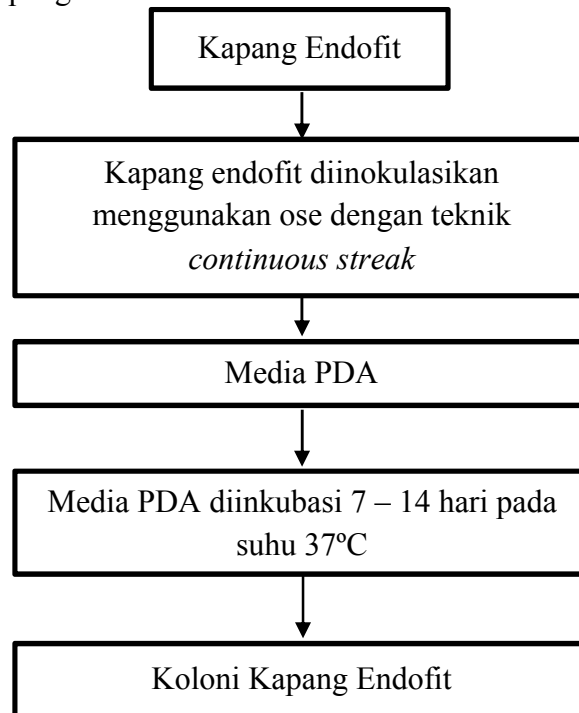
3.4 Skema Kerja

1. Pembuatan Media Agar

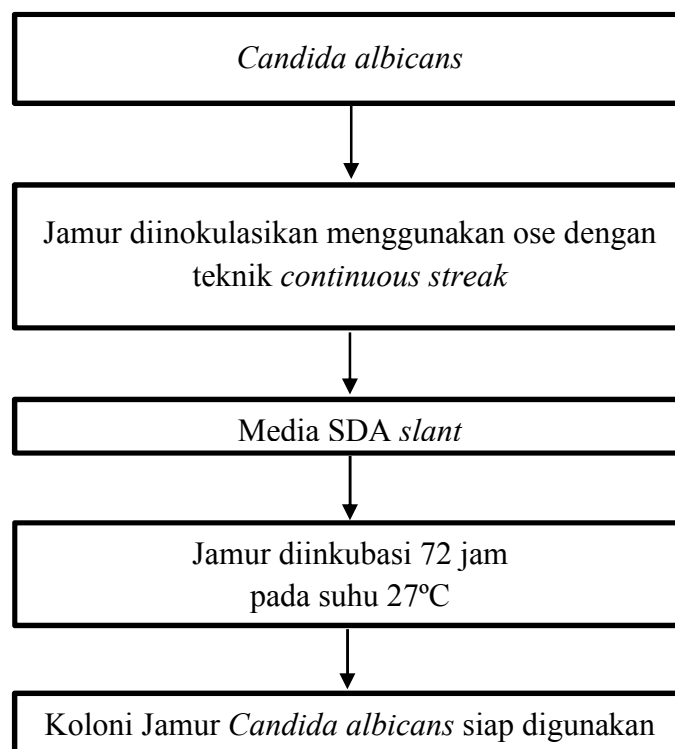


Gambar 3.1 Skema Kerja Pembuatan Media Agar

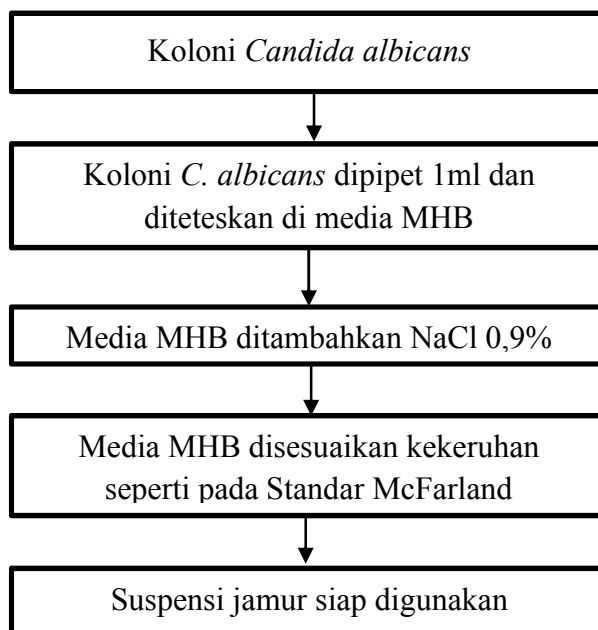
2. Peremajaan Kapang Endofit

**Gambar 3.2** Skema Kerja Peremajaan Kapang Endofit

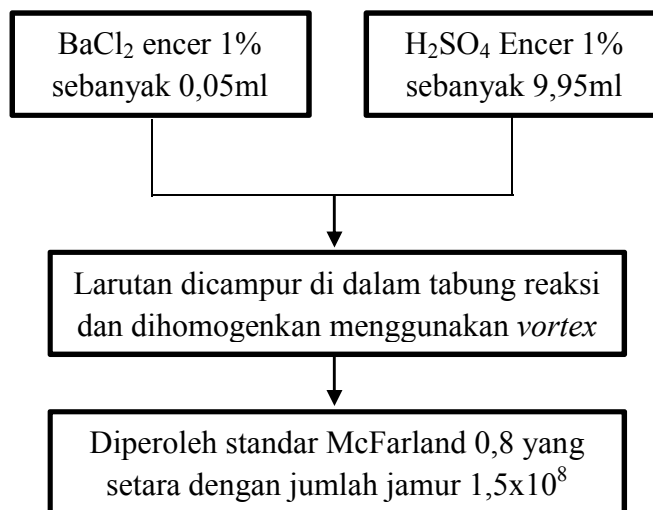
3. Peremajaan Jamur Uji

**Gambar 3.3** Skema Kerja Peremajaan Jamur Uji

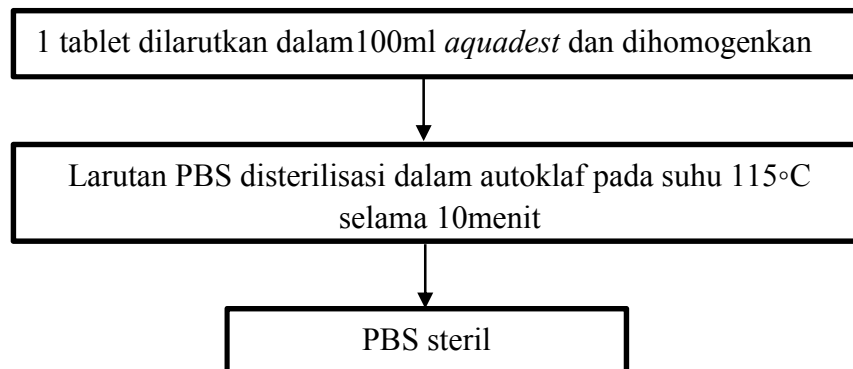
4. Pembuatan Suspensi Jamur Uji

**Gambar 3.4** Skema Kerja Pembuatan Suspensi Jamur Uji

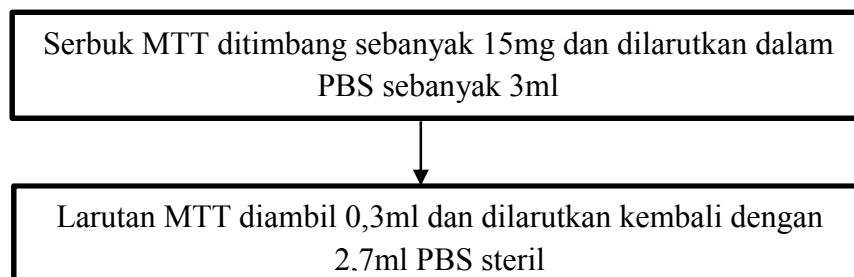
5. Pembuatan Standar McFarland 0,5 (Standar Kekeruhan)

**Gambar 3.5** Skema Kerja Pembuatan Standar McFarland 0,8 (Standar Kekeruhan)

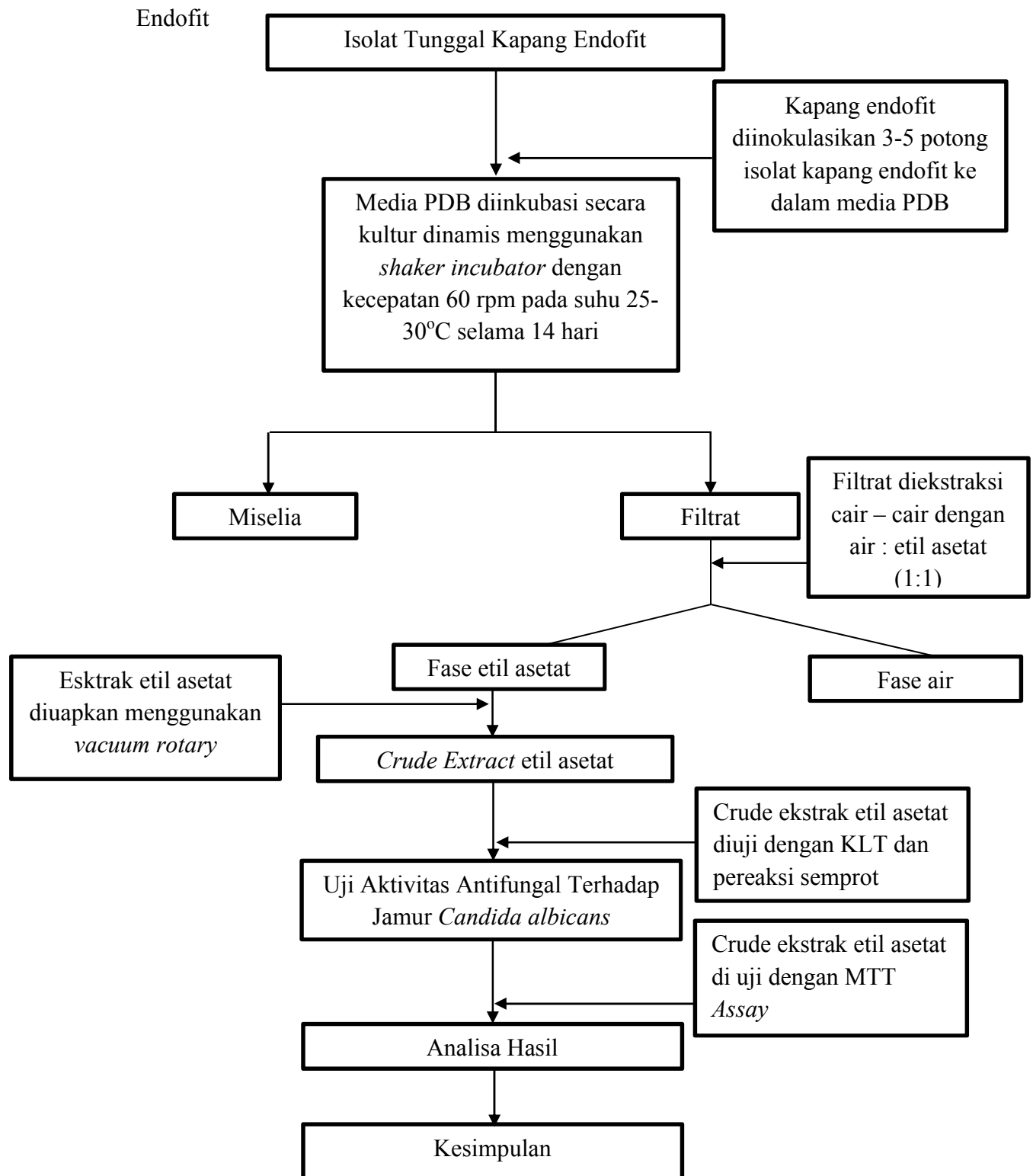
6. Pembuatan Larutan PBS steril

**Gambar 3.6** Skema Kerja Pembuatan Larutan PBS steril

7. Pembuatan Reagen MTT

**Gambar 3.7** Skema Kerja Pembuatan Larutan MTT

8. Ekstraksi, Uji Senyawa dengan KLT, dan Uji Aktivitas Antifungal Kapang Endofit



Gambar 3.8 Skema Kerja Ekstraksi dan Uji Aktivitas Antifungal Kapang Endofit