

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah eksperimental laboratorium mengenai efek antibakteri dan antijamur dari senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* yang menyebabkan penyakit kulit seperti impetigo menggunakan metode difusi cakram kertas dan jamur *Trichophyton rubrum* yang menyebabkan mikosis superfisial menggunakan metode difusi sumuran.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat Penelitian

Proses uji daya hambat senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon dilakukan di Laboratorium Biomedik Universitas Ahmad Dahlan (UAD).

2. Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Agustus 2019 – September 2019.

C. Identifikasi Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

1. Variable Penelitian

- a. Variabel bebas: senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon dengan berbagai konsentrasi yaitu 1%, 1,5%, dan 2%.
- b. Variable Tergantung : nilai Daerah Zona Inhibisi (DZI) dari senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon terhadap pertumbuhan

bakteri *Staphylococcus aureus* dan jamur *Trichophyton rubrum* yang diukur dalam satuan milimeter.

- c. Variable Terkendali : jenis bakteri *Staphylococcus aureus* dan jamur *Trichophyton rubrum*, kontrol positif, kontrol negatif, media pertumbuhan, diameter paper disk 6mm, diameter lubang sumuran 6mm, suhu dan lamanya inkubasi

2. Definisi Operasional

- a. Senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon adalah senyawa turunan kalkon yang disintesis oleh Wibowo (2013) dengan cara mereaksikan 2,5-dihidroksiasetofenon dengan piridin-2-karbaldehid menggunakan metode radiasi *microwave* selama 4 menit dibantu oleh katalis K_2CO_3 tanpa pelarut. Senyawa ini memiliki warna kuning keorangean. Senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon dilarutkan dengan larutan Dimetil Sulfoksida (DMSO) dalam konsentrasi 1%, 1,5%, dan 2% dan digunakan sebagai larutan uji.
- b. DZI (Daerah Zona Inhibisi) *Staphylococcus aureus* adalah diameter zona bening yang terbentuk di daerah sekitar paper disk pada biakan media bakteri *Staphylococcus aureus* setelah proses inkubasi yang diukur dan dinyatakan dengan satuan millimeter (mm).
- c. Larutan kontrol positif untuk pertumbuhan bakteri adalah kontrol positif dari antibakteri yang berisi klindamisin dengan konsentrasi 1%

sebagai pembanding yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*.

Larutan kontrol positif untuk pertumbuhan jamur adalah larutan antijamur ketokonazol 2% sebagai pembanding yang dapat menghambat pertumbuhan jamur *Trichophyton rubrum*.

- d. Larutan kontrol negatif adalah larutan DMSO sebagai pembanding yang tidak memiliki aktivitas untuk menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dan jamur *Trichophyton rubrum*.

D. Instrumen Penelitian

1. Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah timbangan analitik (*ohaos*[®]), alat-alat gelas (*Pyrex dan Iwaki*[®]), pipet volume (*Pyrex*[®]), cawan petri (*Pyrex*[®]), aluminium foil (*Diamond*[®]), perforator, kertas saring (*Whatman*[®]), kompor listrik (*Maspion*[®]), laminar air flow, inkubator (*Memmert*[®]), autoklaf (*All American*[®]), bejana kromatografi (*Camag*[®]), microsyringe (*Hamilton*[®]), lampu UV₂₅₄, mikropipet, *blue tip*, *yellow tip*, ependrop, pinset, sendok, batang pengaduk, batang ose, lampu bunsen, kertas label, jangka sorong, kapas lidi, spidol, penggaris.

2. Bahan Penelitian

a. Bahan Utama

Senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon

b. Bahan Penunjang

Biakan bakteri *Staphylococcus aureus*, biakan jamur *Trichophyton rubrum*, Etanol 70% (General Labora[®]/grade teknis), Dimetil sulfoksida (DMSO), Natrium Klorida (NaCl), kloroform, media Muller Hinton Agar (MHA) (OXOID[®]), media Potato Dextrose Agar (PDA), Klindamisin fosfat dan tablet Ketokonazol yang diperoleh dari Apotek Indah Farma, Aquadest.

E. Cara Kerja

1. Uji Kemurnian Senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon dengan Analisis KLT

Uji kemurnian dilakukan untuk melihat senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon yang digunakan murni. Uji kemurnian dilakukan menggunakan metode KLT dengan fase diam silika 60 GF₂₅₄ dan fase gerak kloroform (Wibowo, 2013). Disiapkan plat KLT dengan membuat batas bawah dan batas atas. Larutan pembanding dan larutan uji ditotolkan secara terpisah menggunakan microsyringe. Kemudian plat KLT yang sudah dimasukkan ke dalam eluen dan didiamkan hingga fasa bergerak naik hingga batas atas. Setelah itu, plat dikeringkan dan disinari di bawah lampu UV 254 nm.

2. Sterilisasi Alat

Alat-alat yang digunakan terlebih dahulu disterilkan melalui proses sterilisasi agar tidak terkontaminasi. Alat berbahan gelas seperti

cawan petri, erlenmeyer, tabung rekasi, cotton bud, mikro tip, media MHA, dan media PDA yang telah dibuat disterilkan menggunakan autoklaf pada tekanan 1 atm dan suhu 121°C selama 15 menit. Alat seperti ose disterilisasi menggunakan pemijaran diatas api bunsen.

3. Pembuatan Media MHA

Timbang 3,8 gram Muller Hinton Agar (38 gr/L) kemudian dilarutkan ke dalam 100 ml *aquadest*. Panaskan hingga mendidih. Sterilkan selama 15 menit di autoklaf dengan tekanan 1 atm dan suhu 121°C kemudian disimpan di dalam lemari es (Ramadanti, 2008).

4. Pembuatan Media PDA

Timbang 6,5 gram Potato Dextrose Agar (65 gr/L) dilarutkan dalam 100 ml *aquadest*, kemudian dilakukan pemanasan hingga mendidih. Media dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditutup menggunakan kapas kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C.

5. Pembuatan Konsentrasi Senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon

Pada pengujian senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan jamur *Trichophyton rubrum*, digunakan variasi konsentrasi senyawa sebesar 1%, 1,5%, dan 2% yang dibuat dengan cara membuat larutan induk dan melakukan pengenceran menggunakan rumus $M_1V_1=M_2V_2$ dan dilarutkankan dalam DMSO.

Pembuatan larutan induk senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon 2% dilakukan dengan menimbang 200 mg senyawa dan melarutkan ke dalam DMSO hingga 10 ml. Dari larutan induk tersebut dibuat konsentrasi 1,5% yang dihitung dengan pengenceran dan diambil 0,75 ml larutan induk dilarutkan dengan DMSO 0,25ml. Sedangkan untuk senyawa konsentrasi 2%, diambil 0,5 ml larutan induk dilarutkan dalam 0,5ml DMSO.

6. Pembuatan Kontrol Positif (Klindamisin dan Ketokonazol)

Kontrol positif yang digunakan untuk uji antibakteri adalah klindamisin 1% yang diperoleh dari sediaan kapsul klindamisin 300 mg. Pembuatan klindamisin 1% dilakukan dengan menimbang bobot rata-rata kapsul yang memiliki rata-rata sebesar 404,7mg. Pembuatan klindamisin 1% dilakukan dengan menimbang 0,337 gram serbuk klindamisin kemudian melarutkannya dengan *aquadest* ke dalam labu takar hingga 25 ml.

Kontrol positif yang digunakan untuk uji antijamur adalah ketokonazol 2% yang diperoleh dari sediaan tablet ketokonazole 200 mg. Tablet ketokonazol ini memiliki rata-rata bobot tablet 446 mg. Pembuatan ketokonazol 2% dilakukan dengan menimbang 1,115 gram tablet yang telah digerus halus kemudian dimasukkan ke dalam labu takar dan ditambahkan dengan DMSO hingga 25 ml.

7. Pembuatan Suspensi Bakteri

Biakan bakteri *Staphylococcus aureus* diambil menggunakan ose sebanyak 1-2 ose, dan disuspensikan ke dalam larutan NaCl 0,9 sampai diperoleh kekeruhan yang sesuai dengan standar 0,5 *MacFarland* atau sebanding dengan jumlah bakteri 10^8 (CFU)/ml (Ramadanti, 2008). Diambil 1 ml dari tabung yang telah sesuai standar *MacFarland* tersebut kemudian dimasukkan ke dalam 9 ml NaCl (tabung B). Kemudian dari tabung B diambil kembali 1 ml dan dimasukkan ke dalam NaCl 9ml sehingga jumlah bakteri menjadi 10^6 (CFU)/ml.

8. Uji Aktivitas Antibakteri

Prosedur pengujian pada bakteri *Staphylococcus aureus* secara difusi cakram dilakukan sebagai berikut:

- a. Disiapkan larutan uji yang telah dibuat sebelumnya dalam eppendrop dengan konsentrasi 1%, 1,5%, 2%, kontrol positif (klindamisin 1%) dan kontrol negatif (DMSO)
- b. Disiapkan media MHA yang telah dituang ke cawan petri
- c. Dilakukan penggoresan suspensi bakteri yang telah disiapkan pada media MHA yang diambil menggunakan *cotton bud* steril kemudian digoreskan dengan 3-4 bagian secara horizontal. Lalu cawan petri diputar 90°.
- d. Diambil sebanyak 20µl dari larutan uji menggunakan mikropipet dan ditetaskan pada kertas cakram kosong yang berdiameter 6mm yang diletakkan di dalam cawan petri hingga larutan terserap sempurna.

- e. Kertas cakram yang telah berisi dosis larutan uji, kontrol positif, dan kontrol negatif diletakkan di atas permukaan media MHA yang telah digoresi oleh bakteri uji secara aseptis di dalam LAF. Agar diperoleh kontak yang baik, kertas cakram dapat ditekan secara lembut menggunakan pinset steril pada permukaannya. Jarak satu kertas cakram dengan kertas cakram yang lainnya diatur sedemikian rupa sehingga berjauhan.
- f. Dilakukan replikasi sebanyak 3 kali.
- g. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 18 jam.
- h. Dilakukan pengamatan yang dilakukan setiap 24 jam dengan melihat adanya diameter zona bening di sekitar kertas cakram. Zona hambat yang terbentuk diukur dalam satuan milimeter (mm)

9. Peremajaan Kultur Fungi

Proses peremajaan kultur *Trichophyton rubrum* dilakukan dengan cara mengambil satu jarum inokulasi dan digoreskan ke dalam media PDA, kemudian diinkubasi pada suhu 25°C selama 3x24 jam (Rantekata, 2018).

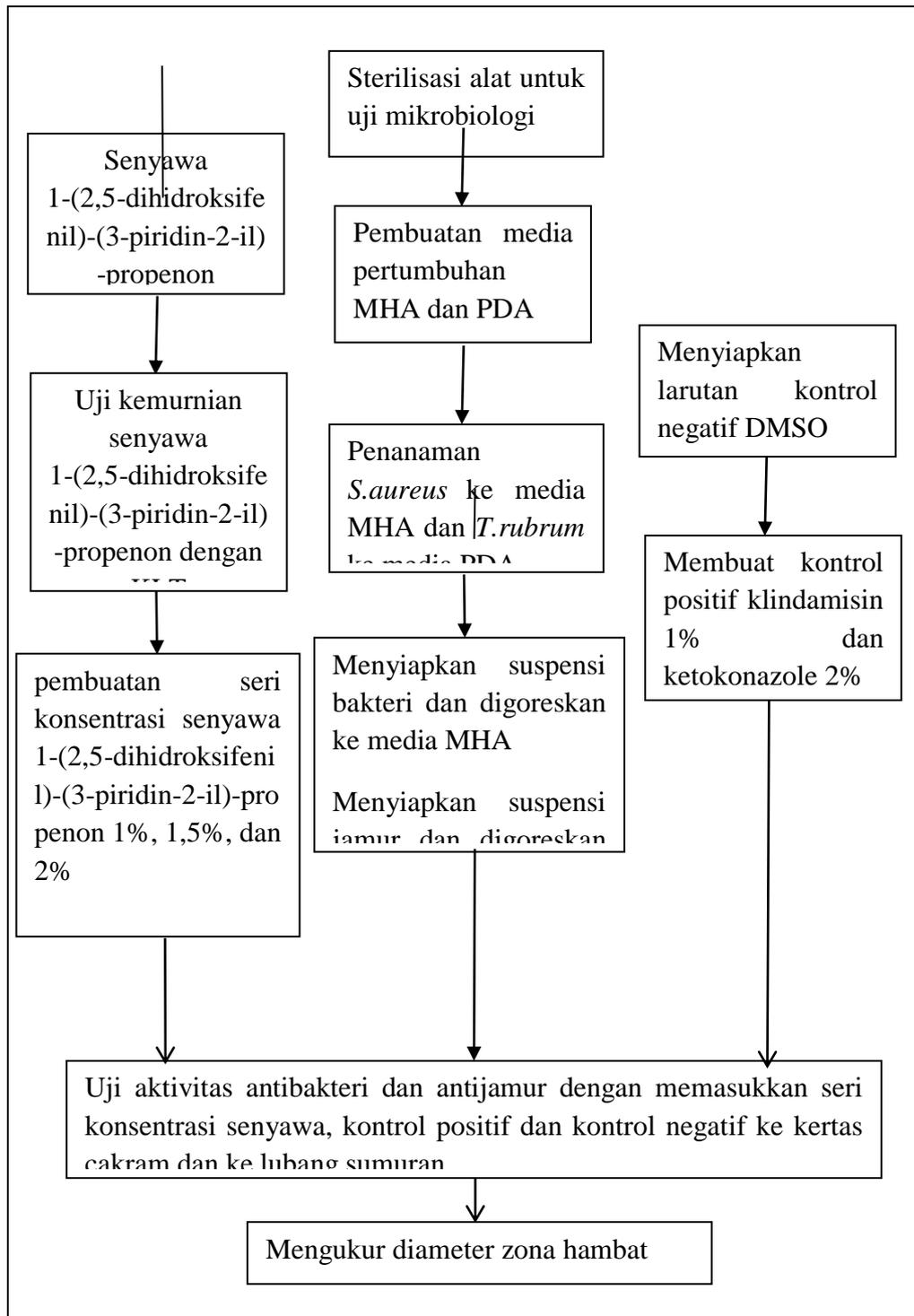
10. Persiapan Kultur Fungi

Trichophyton rubrum yang telah diremajakan diambil menggunakan ose steril sebanyak satu ose untuk 10 ml larutan NaCl 0,9% steril, selanjutnya kultur fungi diinkubasi pada suhu 25°C (Rantekata, 2018).

11. Uji Aktivitas Antifungi

Pengujian aktivitas *Trichophyton rubrum* dilakukan dengan metode difusi agar menggunakan lubang sumuran (*Kirby bauer*) dengan cara menggoreskan suspensi jamur ke dalam media PDA. Lubang sumuran dibuat di media tersebut sebanyak 4 lubang dengan jarak sama. Lubang sumuran diisi dengan konsentrasi senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon, kontrol positif ketokonazole 2% dan kontrol negatif DMSO sebanyak 40µl. Selanjutnya dilakukan inkubasi pada suhu 25°C selama 3x24 jam. Pada hari ke 3 dilakukan pengamatan pertumbuhan koloni dan zona hambat yang terbentuk di sekitar lubang sumuran. Pengukuran daerah zona hambat dilakukan dari sisi lubang hingga sisi luar zona bening (Rantekata, 2018).

F. Skema Langkah Kerja



Gambar 10. Skema Langkah Kerja

G. Analisis Data

Data yang diperoleh pada penelitian ini berupa nilai rata-rata daerah zona hambat. Daerah zona hambat ditandai dengan daerah bening yang tidak ditumbuhi oleh bakteri dan jamur yang berada di sekitar kertas cakram maupun lubang sumuran dan dikurangi dengan diameter kertas cakram dan lubang sumuran. Data hasil uji tersebut kemudian diolah menggunakan SPSS. Data uji antibakteri dan antijamur diuji normalitasnya menggunakan *Shapiro-Wilk* untuk mengetahui apakah data terdistribusi normal ($p > 0,05$) dan uji homogenitas menggunakan *Lavene*. Jika data terdistribusi normal dilanjutkan analisis menggunakan uji *one way ANOVA* untuk mengetahui adanya pengaruh pemberian konsentrasi senyawa 1-(2,5-dihidroksifenil)-(3-piridin-2-il)-propenon terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dan jamur *Trichophyton rubrum*. Namun apabila sebaran data tidak normal maka dilakukan analisis menggunakan *Kruskal-Wallis*.