

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

Penelitian yang dilakukan bersifat eksperimental dengan desain penelitian berupa Rancangan Acak Lengkap (RAL). Terdapat dua variabel yaitu variabel bebas berupa ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta C.*) dengan konsentrasi 60%, 70%, 80%, 90%, 100% dan variabel terikat pertumbuhan jamur *Candida albicans*. Sebagai kontrol negatifnya adalah aquades dan sebagai kontrol positifnya adalah ketokonazol. Pemeriksaan menggunakan metode difusi cakram *Kirby-Bauer* dengan melihat zona hambat yang terbentuk. Pengulangan dilakukan sebanyak 5 kali yang didapat dari perhitungan menggunakan rumus Federer yaitu $(t-1)(n-1) \geq 15$.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikologi Jurusan Analis Kesehatan Politeknik Kesehatan Tangjungkarang dan dilaksanakan pada bulan April - Juni 2021.

C. Subyek Penelitian

Daun singkong yang digunakan adalah daun yang masih muda dengan kondisi segar yang berwarna hijau, utuh, berada kira-kira 4 ruas dari pucuk tanaman. Daun singkong muda memiliki kadar zat aktif lebih tinggi dibandingkan daun singkong tua (Wahyudin, 2010). Daun singkong (*Manihot esculenta C.*) dijadikan ekstrak lalu dibuat konsentrasi 60%, 70%, 80%, 90%, 100% yang digunakan sebagai larutan uji dalam menghambat pertumbuhan jamur *Candida albicans*. Jamur *Candida albicans* didapatkan dari Laboratorium Parasitologi Klinik Universitas Indonesia.

D. Variabel dan Definisi Operasional Penelitian

Variabel	Definisi	Cara Ukur	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala
Variabel Bebas Ekstrak daun singkong (<i>Manihot esculenta</i> C.)	Daun singkong diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96% lalu dilakukan pengenceran dengan berbagai konsentrasi	Ekstrak diencerkan dengan rumus $V1 \times \%1 = V2 \times \%2$	Pipet ukur dan labu ukur	Ekstrak daun singkong (<i>Manihot esculenta</i> C.) konsentrasi 60%, 70%, 80%, 90%, 100%	Interval
Variabel terikat Pertumbuhan jamur <i>Candida albicans</i>	Hambatan pertumbuhan jamur oleh ekstrak daun singkong (<i>Manihot esculenta</i> C.)	Mengukur diameter zona hambat dengan metode Difusi Kirby Bauer	Jangka sorong	Diameter zona hambat dalam kategori : 1. <10 mm daya hambat lemah 2. 10-15 mm daya hambat sedang 3. 16-20 mm daya hambat kuat 4. >20 mm daya hambat sangat kuat (Puthera dkk dalam Alfiah 2015).	Ordinal

E. Pengumpulan Data

1. Prosedur penelitian

- a. Pembuatan surat izin penelitian dan pemesanan strain jamur
- b. Pengumpulan alat dan bahan pemeriksaan

Alat yang digunakan adalah neraca analitik elektrik, *autoclave*, *beaker glass* 100 ml, wadah sampel, tabung reaksi, pipet ukur, lidi kapas steril, *disk blank*, pinset, plate, kertas kopi, oven, corong gelas, *vortex mixer*, *hot plate*, erlenmeyer 250 ml, lampu spiritus, korek api, jangka sorong, *handscoon*, dan inkubator.

Bahan yang digunakan adalah aquades steril, etanol 96%, NaCl, ketokonazol 200mg, media *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA), daun singkong (*Manihot esculenta* C.), dan strain murni *Candida albicans*.

c. Identifikasi daun singkong

Daun singkong (*Manihot esculenta* C.) yang didapatkan dideterminasi di Laboratorium Botani Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.

d. Identifikasi jamur *Candida albicans*

Strain murni jamur *Candida albicans* yang didapatkan dari Laboratorium Parasitologi Klinik Universitas Indonesia diidentifikasi dengan pengecatan gram.

e. Pembuatan larutan uji ekstrak daun singkong dan pengenceran bertingkat larutan uji menjadi konsentrasi 60%, 70%, 80%, 90%, 100%.

1) Pembuatan simplisia

Sampel daun singkong sebanyak ± 2 kg diambil dalam kondisi yang masih segar, kemudian dicuci dengan air mengalir dan ditiriskan. Daun singkong dikeringkan dengan cara ditutup kain hitam di bawah sinar matahari secara tidak langsung. Simplisia yang telah kering lalu dihaluskan dengan cara diblender dan disimpan dalam wadah yang kering.

2) Pembuatan ekstrak daun singkong

Simplisia yang telah halus dimasukkan kedalam wadah berwarna gelap sebanyak 10 bagian (500 gram), ditambahkan larutan ethanol 96% sebanyak 75 bagian dan didiamkan selama 5 hari di tempat yang terlindungi cahaya dengan pengadukan 2-3 kali setiap hari, kemudian dipisahkan antara filtrat dengan presipitat menggunakan kertas saring (maserat 1). Presipitat kembali direndam dengan ethanol 96% sebanyak 35 bagian kemudian disaring menggunakan kertas saring (maserat 2).

Maserat 1 dan maserat 2 dicampur dan diuapkan menggunakan evaporator sampai diperoleh ekstrak kental, ekstrak diuapkan kembali di hotplate dengan suhu 60°C . Kemudian dilakukan pengulangan untuk memastikan bahwa ekstrak sudah tidak mengandung pelarut lagi (ekstrak 100%). Ekstrak kemudian disimpan pada wadah berbahan gelas yang steril, bersih, dan kering.

Pengenceran dengan menggunakan rumus berikut :

$$V_1 \times \%_1 = V_2 \times \%_2$$

Keterangan :

V_1 = Volume larutan uji yang dipipet (ml)

$\%_1$ = Konsentrasi larutan uji (100%)

V_2 = Volume larutan uji yang diinginkan (ml)

$\%_2$ = Konsentrasi larutan uji yang akan dibuat (%)

f. Pembuatan Larutan Kontrol Positif

Dihaluskan 200 mg obat ketokonazol lalu ditambahkan dengan 10 ml alkohol dan dihomogenkan (Alfiah, 2015).

g. Pengujian ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta* C.) terhadap pertumbuhan jamur *Candida albicans*.

Metode : Difusi Cakram dengan cara *Kirby Bauer*

Prinsip : Cakram kertas filter yang mengandung sejumlah tertentu obat ditempatkan diatas permukaan medium padat yang telah diinokulasi pada permukaan dengan organisme uji. Setelah diinkubasi, diameter zona jernih inhibisi di sekitar cakram diukur sebagai ukuran kekuatan inhibisi obat melawan organisme uji tertentu (Jawetz dkk, 2014).

1) Sterilisasi Alat

Alat-alat gelas yang digunakan dalam penelitian ini dibersihkan dan dikeringkan terlebih dahulu kemudian dibungkus dengan kertas pembungkus. Disterilkan dengan menggunakan oven pada suhu 160° selama 60 menit (Soemarno, 2000).

2) Pembuatan Larutan Kloramfenikol

Kloramfenikol ditambahkan ke dalam media SDA berfungsi untuk menghambat pertumbuhan bakteri. Setiap 1000 ml *Sabouraud Dextrose Agar* memerlukan 400 mg kloramfenikol. Setiap 250 mg kloramfenikol dilarutkan dalam 10 ml NaCl 0,85% maka untuk 400 mg diperlukan NaCl 0,85% $\frac{400mg}{250 mg} \times 10 \text{ ml} = 16 \text{ ml}$ (Soemarno, 2000).

3) Pembuatan Media *Sabouraud Dextrose Agar*

Sebanyak 65 gram *Sabouraud Dextrose Agar* bubuk ditambahkan dengan 1000 ml aquades, diaduk kemudian dipanaskan. Setelah larut sempurna ditambahkan larutan kloramfenikol (untuk mencegah tumbuhnya kuman kontaminan), lalu media disterilkan di *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit pada tekanan 1 atm. Setelah disterilkan media dituang ke dalam plate yang telah disterilkan dan dibiarkan dingin (Soemarno, 2000).

Media yang telah selesai dibuat, diambil beberapa plate kemudian diinkubasi dengan suhu 37°C. Apabila ada pertumbuhan 2 koloni saja per plate itu dianggap tidak steril (Soemarno, 2000).

4) Pembuatan Larutan Standar *Mac Farland* 0,5

Mencampurkan 9,95 ml larutan H₂SO₄ 1% dengan 0,05 ml larutan BaCl₂.2H₂O 1% sehingga volume menjadi 10 ml dengan perkiraan jumlah mikroba yaitu $1,5 \times 10^8$, dikocok sampai homogen. Larutan harus dikocok setiap akan digunakan untuk membandingkan suspensi jamur (Soemarno, 2000).

5) Pembuatan NaCl 0,85%

Menimbang 0,85 gram NaCl, kemudian larutkan dalam 100 ml aquades steril, dihomogenkan (Soemarno, 2000).

6) Pembuatan Suspensi *Candida albicans*

Biakan murni *Candida albicans*, dibuat suspensi dengan menambahkan larutan NaCl 0,85% di dalam tabung, dihomogenkan dengan alat *vortec mixer* sampai didapatkan kekeruhan yang disesuaikan dengan standar kekeruhan *Mac Farland* 0,5. Jika kurang keruh, maka suspensi ditambahkan koloni jamur *Candida albicans* sedangkan jika lebih keruh maka ditambahkan NaCl 0,85% (Soemarno, 2000).

7) Pelaksanaan Uji Daya Hambat

- a) Kedalam suspensi jamur yang sudah distandarisasi kekeruhannya, celupkan lidi kapas steril dan tunggu agar suspensi meresap ke dalam kapas, kemudian lidi kapas diangkat dan diperas dengan cara menekannya pada dinding tabung bagian dalam sambil diputar-putar (Pollack dkk, 2014).
- b) Pulaskan lidi kapas tersebut pada permukaan media SDA sampai seluruh permukaan tertutup rapat dengan pulasan, dilakukan 3 x pulasan pada permukaan media dengan mombolak-balik lidi kapas pada setiap pulasan, dari pulasan I ke pulasan II plate diputar 90° sedangkan dari pulasan II ke pulasan III plate diputar 45° (Pollack dkk, 2014).
- c) Biarkan media SDA tersebut diatas meja selama 5 menit agar suspensi jamur meresap ke dalam media, kemudian melakukan penempelan disk obat yang telah direndam dalam ekstrak daun singkong selama 15 menit pada media SDA

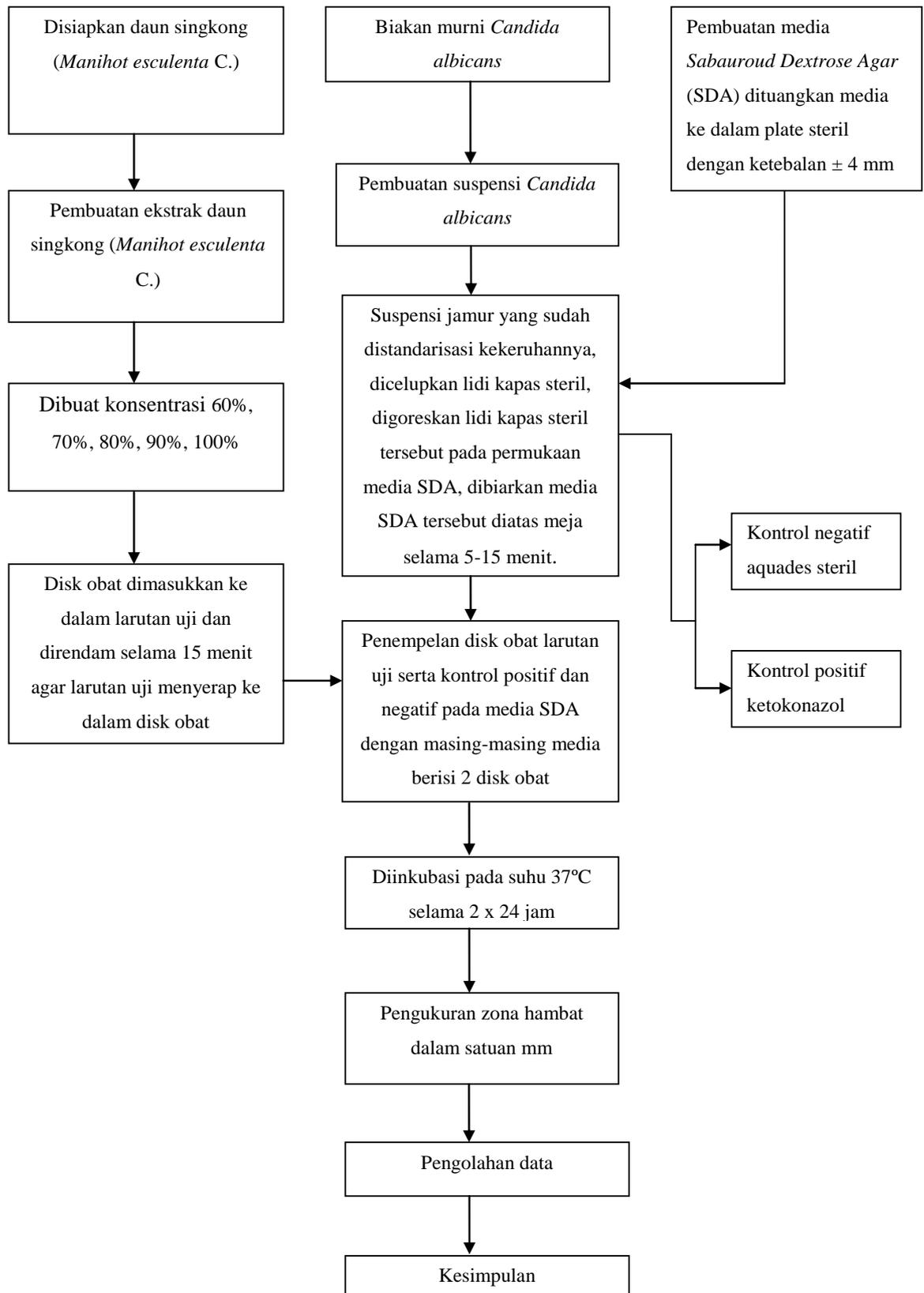
- dengan masing-masing media berisi 2 atau 3 disk obat, dengan cara menaruhkan disk di permukaan media dengan pinset lalu ditekan sedikit sehingga disk obat menempel pada media SDA dengan jarak antar disk obat lebih kurang 15 mm (Soemarno, 2000).
- d) Rendam pula disk obat ke dalam larutan kontrol positif (ketokonazol) dan kontrol negatif (aquades steril) selama 15 menit, lalu ditempelkan pada media SDA yang telah diinokulasi jamur *Candida albicans* dengan cara menaruhkan disk di permukaan media dengan pinset lalu ditekan sedikit sehingga disk obat menempel pada media SDA. Masing-masing media berisi 1 disk kontrol positif dan 1 disk kontrol negatif (Soemarno, 2000).
- e) Inkubasi media agar pada suhu 37°C selama 2x24 jam (Soemarno, 2000).
- f) Zona bening yang terbentuk di sekitar disk obat diukur diameternya dengan menggunakan jangka sorong melalui tengah disk sebagai diameter daya hambat ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta* C.) terhadap pertumbuhan jamur *Candida albicans*. Prosedur dilakukan sebanyak lima kali pengulangan (Soemarno, 2000).
- g) Interpretasi penentuan kategori respon hambatan pertumbuhan jamur dapat dilihat pada tabel 3.1.

Tabel 3.1 Klasifikasi respon hambatan pertumbuhan jamur

Diameter Zona Bening	Respon Hambatan Pertumbuhan
< 10 mm	Lemah
10 - 15 mm	Sedang
16 - 20 mm	Kuat
>20 mm	Sangat Kuat

(Puthera, dkk dalam Alfiah, 2015)

2. Skema Kerja Pemeriksaan



F. Pengolahan dan Analisa Data

1. Pengolahan data

Data diperoleh dengan cara:

- a. Melakukan pengujian daya hambat ekstrak daun singkong konsentrasi 60%, 70%, 80%, 90%, 100% terhadap pertumbuhan jamur *Candida albicans*.
- b. Melakukan pengukuran zona hambat dari masing-masing konsentrasi pada tiap pengulangan menggunakan alat ukur dalam satuan mm.
- c. Data zona hambat yang diperoleh disajikan dalam bentuk tabel dan kemudian dianalisa.

2. Analisa data

Analisa data yang digunakan adalah analisis data univariat dan bivariat.

- a. Analisa data univariat adalah data terhadap variabel dari hasil penelitian dengan masing-masing konsentrasi yang diukur zona hambatnya dilakukan pengulangan 5 kali kemudian diakumulasikan dan dihitung rata-ratanya.
- b. Analisa bivariat didapat dengan membandingkan rerata diameter zona hambat antar konsentrasi ekstrak daun singkong untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan signifikan antara masing-masing konsentrasi tersebut terhadap pertumbuhan *Candida albicans*. Analisa dilakukan dengan melihat hasil *P-value* pada uji *One-Way ANOVA*. Jika *P-value* < 0,05 dilanjutkan ke uji BNT (dengan taraf kepercayaan 95% dan kesalahan 5%).

G. Ethical Clearance

Penelitian yang dilakukan atas izin komisi etik, penelitian ini tidak akan menimbulkan bahaya bagi lingkungan, limbah yang dihasilkan dari proses penelitian ini akan dikumpulkan dan dimusnahkan dalam penanganan limbah. Limbah larutan uji ekstrak daun singkong ditangani dengan cara langsung dibuang pada saluran pembuangan, dikarenakan limbah larutan tidak membahayakan lingkungan. Limbah media plate dan limbah suspensi jamur *Candida albicans* pada tabung dimusnahkan dengan cara perebusan pada suhu 100°C selama 30 menit. Kemudian limbah media plate dan limbah suspensi jamur *Candida albicans* yang telah direbus dibuang pada saluran pembuangan. Plate dan tabung reaksi direbus kembali dengan penambahan detergen dan dicuci menggunakan air mengalir.