

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 akar sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm.f) Ness) dengan konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, dan variabel terikat berupa pertumbuhan *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 berbentuk. Pengulangan dilakukan sebanyak 3 kali yang didapat dari perhitungan menggunakan rumus Federel yaitu $(t-1)(r-1) \geq 15$.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

Proses determinasi tumbuhan sambiloto dilakukan di Laboratorium Botani Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung. Proses ekstraksi dilakukan di Laboratorium Kimia Organik FMIPA Universitas Lampung. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikologi Jurusan Analisis Kesehatan Poltekkes Tanjung Karang yang dilaksanakan pada bulan April-Juni 2021.

C. Subyek Penelitian

Akar sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm.f) Ness) diperoleh dari daerah Putra Rumbia, Rumbia, Bandar Lampung, dan Lampung Barat. Akar sambiloto yang digunakan dalam penelitian ini yaitu akar sambiloto yang berumur 2-3 bulan setelah tanam, tanaman yang masih muda dengan ciri-ciri sebelum tanaman sambiloto berbunga, daun sambiloto yang masih muda berwarna hijau pekat dengan permukaan halus dan ujung daun lancip (Widyanata, 2020).

D. Variabel dan Definisi Operasional Penelitian

Tabel 3.1 Variabel dan Definisi Penelitian

No	Variabel	Definisi	Cara Ukur	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala
1	Variabel Bebas Ekstrak akar sambiloto (<i>Andrographis paniculata</i> (Burm.f) Ness)	Akar sambiloto dijadikan simplisia kemudian diekstrak dengan metode maserasi dengan penyari etanol 96% yang diencerkan menjadi beberapa konsentrasi.	Ekstrak diencerkan dengan pengenceran menggunakan rumus $V_1 \times \%_1 = V_2 \times \%_2$	Pipet Ukur dan Labu Ukur	Ekstrak akar sambiloto konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%.	Interval
2	Variabel terikat Pertumbuhan <i>Candida albicans</i>	Pertumbuhan <i>Candida albicans</i> yang dihambat oleh ekstrak akar sambiloto (<i>Andrographis paniculata</i> (Burm.f) Ness)	Mengukur diameter zona hambat dengan metode Kirby Bauer	Jangka sorong	Diameter zona hambat dalam kategori : 1. <10mm 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, 2007).	Ordinal

E. Pengumpulan Data :

1. Prosedur Penelitian
 - a) Pengajuan permohonan izin dari jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Tanjungkarang untuk dilakukan determinasi akar sambiloto di Laboratorium Botani Fakultas MIPA Universitas Lampung, proses ekstraksi dilakukan di Laboratorium Kimia Organik FMIPA Universitas Lampung, dan pemesanan strain jamur ke Universitas Indonesia (UI).
 - b) Pengumpulan bahan-bahan pemeriksaan seperti strain *Candida albicans*, media SDA, *blank disc* dan akar sambiloto (*Andrographis Paniculata* (Burm.f) Ness).
 - c) Determinasi bahan uji akar sambiloto di Laboratorium Botani Fakultas MIPA Universitas Lampung.
 - d) Pembuatan simplisia akar sambiloto.
 - e) Pengenceran bertingkat larutan uji menjadi konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%.

- f) Pembuatan suspensi *Candida albicans*.
- g) Pengujian daya hambat ekstrak etanol akar sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm.f) Ness) terhadap pertumbuhan *Candida albicans* dengan metode difusi cakram Kirby Bauer.
- h) Diamati zona hambat yang terbentuk pada masing-masing konsentrasi dan diukur menggunakan alat ukur jangka sorong dalam satuan (mm)

2. Metode Pemeriksaan

Difusi Cakram dengan cara Kirby Bauer

3. Prinsip Pemeriksaan

Cakram kertas filter yang telah mengandung sejumlah obat tertentu ditempatkan di atas permukaan medium padat yang telah diinokulasi pada permukaan dengan organisme uji. Setelah inkubasi, diameter zona jernih diinhibisi disekitar cakram diukur sebagai ukuran kekuatan inhibisi obat melawan organisme uji tertentu (Jawetz, dkk, 2008).

4. Prosedur Kerja Pemeriksaan

a. Persiapan alat dan bahan pemeriksaan, yaitu:

Alat yang digunakan adalah neraca analitik, *autoclave*, gunting, kapas, *beaker glass* 100 ml, wadah sampel, tabung reaksi, pipet ukur, lidi kapas steril, *disc blank*, pinset, cawan petri, kertas kopi, *oven*, corong gelas, *vortex mixer*, *hotplate*, erlenmayer 500 ml, lampu spiritus, korek api, jangka sorong, *handscoon*, masker dan inkubator.

Bahan yang digunakan yaitu aquadest steril, NaCl 0,85%, standar *McFarland* 0.5, kloramfenikol, ketokonazol, media *Sabouroud Dextrose Agar* (SDA), ekstrak etanol akar sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm.f) Ness) dan strain murni *Candida albicans*.

b. Identifikasi bahan uji yaitu akar sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm.f) Ness) di Fakultas MIPA Biologi Universitas Lampung. Untuk mengetahui kebenaran sampel, bahwa sampel benar-benar spesies *Andrographis paniculata* (Burm.f) Ness.

c. Pengujian daya hambat ekstrak etanol akar sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm.f) Ness) terhadap pertumbuhan *Candida albicans* dengan prosedur kerja sebagai berikut:

1) Sterilisasi Alat

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

2) Pembuatan Larutan Kloramfenikol

Setiap 1000 ml *Sabouroud Dextrose Agar* (SDA) memerlukan 400 mg kloramfenikol, setiap 250 mg kloramfenikol dilarutkan dalam 10 ml NaCl 0,85%, dengan perhitungan $\frac{400 \text{ mg}}{250 \text{ mg}} \times 10 \text{ ml} = 16 \text{ ml}$.

Maka untuk 400 mg Kloramfenikol diperlukan NaCl 0,85% sebanyak 16 ml (Soemarno, 2000). Tujuan ditambahkan kloramfenikol ke dalam media SDA adalah untuk mencegah kontaminasi bakteri (Basarang, 2020).

3) Pembuatan media agar dari *Sabouroud Dextrose Agar*

Sebanyak 65 gram *Sabouroud Dextrose Agar* bubuk ditambahkan dengan 1000 ml aquades dikalikan dengan volume yang dibutuhkan. Kemudian ditimbang, diaduk selanjutnya dipanaskan di atas *hotplate* sampai larut sempurna. Setelah larut sempurna, ditambahkan larutan kloramfenikol (untuk mencegah tumbuhnya kuman kontaminasi), lalu media disterilkan di *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit pada tekanan 1 atm. Setelah disterilkan media dituang kedalam cawan petri yang telah disterilkan dengan ketebalan ± 4 mm dan dibiarkan dingin (Soemarno, 2000).

4) Uji sterilisasi media

Media yang sudah selesai dibuat, diambil beberapa *plate* kemudian diinkubasi 37°C selama 2x24 jam. Apabila ada pertumbuhan 2 koloni saja per *plate*, maka dianggap tidak steril (Soemarno, 2000)

5) Pembuatan larutan standar *Mc Farland* 0,5

Dicampurnya 9,95 ml larutan H₂SO₄ 1% dengan 0,05 ml larutan BaCl₂·2H₂O 1% sehingga volume menjadi 10 ml. Kemudian dikocok hingga homogen. Larutan harus dikocok setiap akan digunakan untuk membandingkan suspensi jamur (Soemarno, 2000).

6) Pembuatan NaCl 0,85%

Ditimbang 0,85 gram NaCl dilarutkan dalam 100 ml aquadest steril, kemudian dihomogenkan.

7) Pembuatan Larutan Ketokonazol

Dihaluskan 200 gram ketokonazol, kemudian ditambahkan dengan 10 ml alkohol 96% dan dihomogenkan. Kemudian masukkan *disk blank* ke dalam larutan ketokonazol. Direndam *disk blank* ke dalam larutan tersebut selama 15 menit, setelah 15 menit diambil *disk blank* yang sudah direndam dan letakkan di atas media SDA yang telah dipulas dengan suspensi jamur (Alfiah, 2015).

8) Identifikasi *Candida albicans*

a) Pemeriksaan Makroskopis

Ditanam jamur pada media SDA *plate*, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 2x24 jam, lalu diamati koloni *Candida albicans* yang tumbuh.

Interpretasi hasil:

Candida albicans pada media SDA berwarna putih, permukaan licin, menonjol disertai bau khas ragi (Hartati, 2019).

b) Pemeriksaan Mikroskopis

(1) Diambil koloni jamur biakan media SDA yang telah ditanam, kemudian diletakkan pada permukaan *objek glass*, dibuat *preparat* dan ditambah NaCl 0,85%, kemudian dihomogenkan, lalu difiksasi.

(2) Diletakkan *objek glass* pada rak pengecatan, selanjutnya dilakukan pengecatan gram. Ditetaskan gram A didiamkan selama 1 menit, lalu dibilas dengan air mengalir. Ditetaskan gram B didiamkan selama 1 menit, lalu dibilas dengan air mengalir. Ditetaskan gram C didiamkan selama 30 detik, lalu dibilas dengan air mengalir. Ditetaskan gram D didiamkan selama 1 menit, lalu dibilas dengan air mengalir.

(3) Dikeringkan kemudian diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran awal 10x, kemudian lanjut perbesaran 100x (Yusmaniar, 2017).

Interpretasi Hasil:

Candida albicans pada pewarnaan gram akan menyerap warna ungu yang bersifat Gram Positif dan memiliki bentuk bulat lonjong (Ratnawati, dkk, 2016)

9) Pembuatan suspensi *Candida albicans*

Diambil koloni *Candida albicans* 1 ujung ose dan disuspensikan ke dalam larutan NaCl 0,85% yang telah dibagi ke dalam beberapa tabung reaksi, kemudian dihomogenkan dengan alat *mixer vortex* hingga kekeruhannya sama dengan standar *Mc Farland* 0,5. Koloni jamur yang sudah dibuat suspensi dibandingkan dengan tabung reaksi yang berisi kekeruhan *Mc Farland* 0,5 dengan latar belakang putih atau gelap. Apabila kurang keruh, tambahkan koloni *Candida albicans*, sedangkan apabila lebih keruh, maka ditambahkan NaCl 0,85% (Soemarno, 2000).

10) Pembuatan larutan uji ekstrak etanol akar sambiloto

a) Identifikasi bahan uji akar sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm.f) Ness) di Laboratorium Botani Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Lampung.

b) Pembuatan simplisia akar sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm.f) Ness)

Diambil ±4 kg akar sambiloto, kemudian dicuci dengan air mengalir dan ditiriskan. Akar sambiloto dikeringkan dengan cara ditutup kain hitam di bawah sinar matahari secara tidak langsung, selain itu dapat juga menggunakan *oven* dengan suhu 50°C selama 150 menit sebagai alternatif selain sinar matahari (Dharma, 2020). Simplisia yang telah kering dihaluskan dengan cara tumbuk, kemudian diayak agar didapatkan simplisia yang halus, dan disimpan dalam wadah yang kering.

c) Pembuatan ekstrak etanol akar sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm.f) Ness) dengan metode maserasi

Simplisia akar sambiloto dijadikan ekstrak dengan pelarut etanol 96%, kemudian dibuat konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, yang digunakan sebagai larutan uji dalam menghambat pertumbuhan *Candida albicans*. Simplisia yang telah halus dimasukkan ke dalam botol berwarna gelap dengan volume 1000 ml sebanyak 100 gram

dan dituang etanol 96% sebanyak 750 ml, kemudian dimasukkan ke dalam botol gelap dan ditutup menggunakan aluminium foil, selanjutnya diamkan selama 5 hari ditempat yang terlindung cahaya dengan pengadukan 2-3 kali setiap harinya. Setelah 5 hari, filtrat dan presifitat dipisahkan menggunakan kertas saring (maserat I). Kemudian presifitat yang telah dipisahkan direndam kembali dengan etanol 96% sebanyak 250 ml, dan didiamkan selama 2 hari kemudian disaring menggunakan kertas saring (maserat II).

Maserat I dan II dicampur kemudian diuapkan di atas *rotary evaporator* pada suhu 40°C hingga diperoleh ekstrak kental, ekstrak diuapkan kembali di atas *hotplate* pada suhu 60°C. Selanjutnya dilakukan pengulangan untuk memastikan bahwa ekstrak sudah tidak mengandung pelarut lagi (ekstrak 100%). Kemudian simpan ekstrak pada wadah berbahan gelas berwarna gelap dan steril, bersih dan kering.

Selanjutnya dilakukan pengenceran ekstrak dengan konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% (Manu, 2013).

Pengenceran dengan menggunakan rumus berikut:

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

Keterangan:

V1= Volume larutan uji yang dipipet (ml)

%1 = konsentrasi larutan uji (100%)

V2= volume larutan uji yang diinginkan (ml)

%2 = konsentrasi yang akan dibuat (%)

11) Pelaksanaan Uji Daya Hambat

- a) Disiapkan media SDA yang telah mengeras.
- b) Dichelupkan lidi kapas *steril* ke dalam suspensi *Candida albicans* yang telah dibandingkan kekeruhannya dengan standar *Mac Farland* 0,5, kemudian ditunggu sebentar supaya suspensi *Candida albicans* meresap ke dalam kapas, kemudian lidi kapas diangkat dan diperas di dalam dinding tabung dengan cara menekannya sambil diputar (Pollack, 2014).
- c) Dipulaskan lidi kapas pada permukaan media SDA sampai seluruh permukaan tertutup rapat dengan pulasan, dilakukan 3x pulasan pada

permukaan media dengan membolak balik lidi kapas steril pada setiap pulasan, dari pulasan ke I ke pulasan II, kemudian *plate* diputar 90°C sedangkan dari pulasan II ke pulasan ke III *plate* diputar 45°C (Pollack, 2014).

- d) Dibiarkan media SDA tersebut di atas meja selama 5-15 menit supaya suspsi jamur meresap ke dalam media.
- e) *Disk* kosong direndam dengan ekstrak akar sambiloto, kontrol positif dan kontrol negatif masing-masing 15 menit.
- f) Dilakukan penempelan *disc* obat, dengan cara meletakkan *disc* obat di permukaan media dengan pinset, dengan cara sedikit ditekan sehingga cakram menempel pada media SDA dengan masing-masing media berisi 2 cakram dengan jarak antar cakram yaitu ± 15 mm.
- g) Lempeng agar diinkubasi pada suhu 37°C selama 2x24 jam (Jawetz, 2008).
- h) Zona bening yang terbentuk di sekitar *disc* obat diukur diameternya dengan menggunakan jangka sorong sebagai diameter daya hambat ekstrak etanol akar sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm.f) Ness) terhadap pertumbuhan *Candida albicans* (Soemarno, 2000).

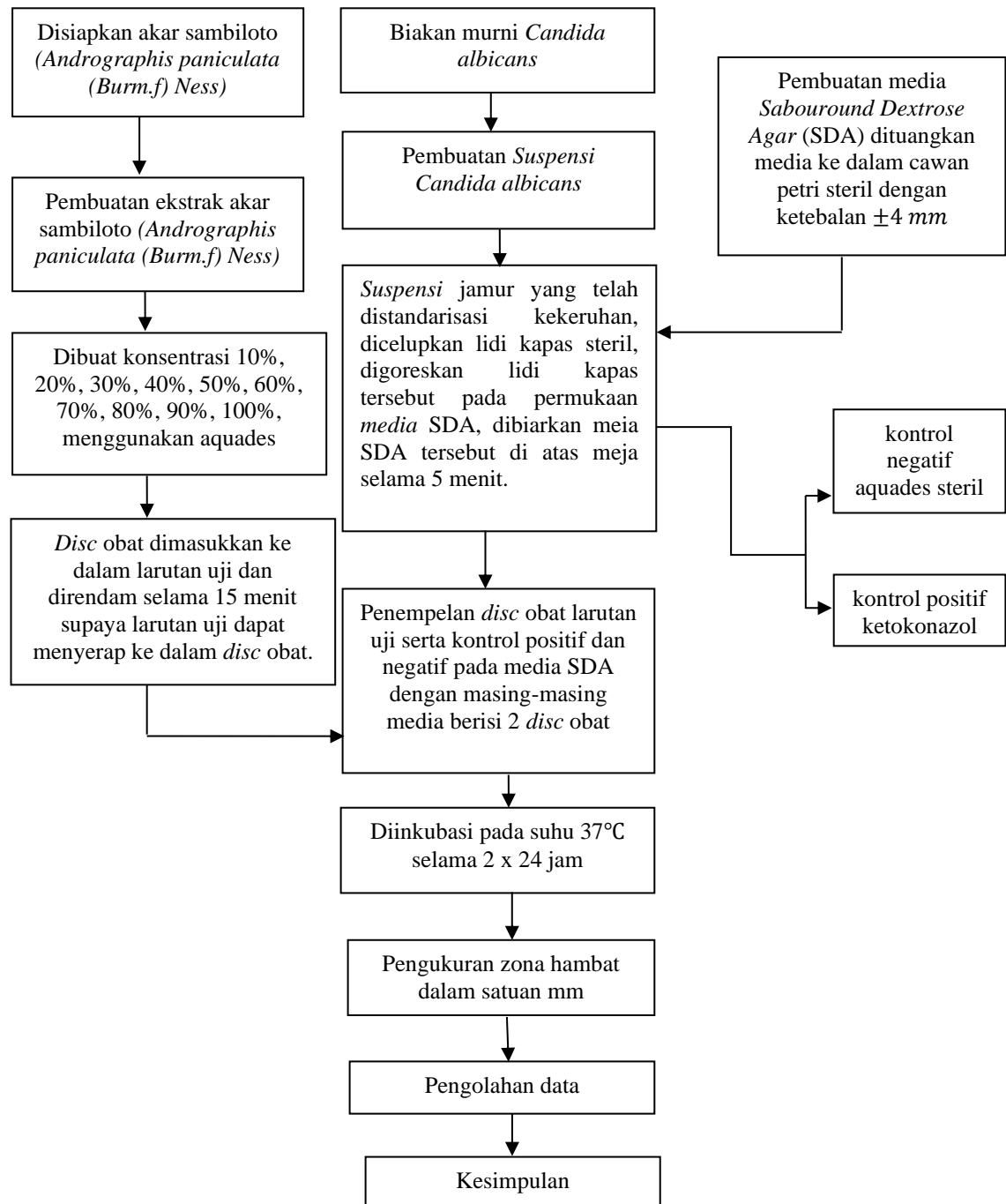
Interpretasi Hasil:

Penelitian kategori respon hambatan pertumbuhan jamur dapat dilihat pada Tabel 3.2 (Phutera, 2007).

Tabel 3.2 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

5. Skema kerja pemeriksaan



F. Analisa data

1. Pengolahan data

- a. Dilakukan pengujian daya hambat ekstrak akar sambiloto (*Andrographis Paniculata (Burm.f) Ness*) dengan konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% terhadap pertumbuhan *Candida albicans*.
- b. Dilakukan 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.

2. Analisis data

Data yang diperoleh berupa diameter zona hambat pada masing-masing konsentrasi ekstrak etanol akar sambiloto yang di analisis dengan uji *One Way Anova*. Apabila ada signifikansi zona hambat antar perlakuan, maka dilanjutkan dengan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) dengan taraf kesalahan 5%.

G. Ethical Clearance

Penelitian yang dilakukan atas izin etik, penelitian ini tidak menimbulkan bahaya bagi lingkungan, limbah yang dihasilkan dan proses penelitian ini akan dikumpulkan dan dimusnahkan dalam penanganan limbah. Limbah larutan uji ekstrak etanol akar sambiloto (*Andrographis Paniculata (Burm.f) Ness*) ditangani dengan cara langsung dibuang pada saluran pembuangan, dikarenakan limbah larutan tidak membahayakan lingkungan. Limbah media serta limbah suspensi *Candida albicans* pada tabung dimusnahkan dengan cara perebusan pada suhu 100°C selama 30 menit, air bekas rebusan limbah media dan suspensi *Candida albicans* dibuang pada saluran pembuangan, lalu setelah penelitian *plate* dan tabung direbus kembali dengan penambahan deterjen, setelah itu air bekas rebusan dibuang pada saluran pembuangan, *plate* dan tabung dicuci menggunakan deterjen pada air mengalir.