

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

Jenis dan desain penelitian ini adalah eksperimental laboratorium menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Terdapat dua variabel yang digunakan yaitu variabel independent/bebas berupa ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix Dc*) dengan konsentrasi 10%, 20%, 40%, 60%, 80%, 100% dan variabel dependent/terikat adalah zona hambat pertumbuhan jamur *Malassezia furfur* penyebab panu. Kontrol positif ketokonazol dan kontrol negatif aquades steril, serta menggunakan media *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA). Pada penelitian ini menggunakan metode difusi cakram *Kirby-Bauer* dengan melihat zona hambat yang terbentuk. Pengulangan dilakukan sebanyak 3 kali yang didapat dari perhitungan menggunakan rumus Federer yaitu:

$$(t-1)(n-1) \geq 15$$

Keterangan:

t = banyaknya pengulangan sampel

n = jumlah perlakuan sampel.

Perhitungan pengulangan perlakuan sampel menggunakan rumus Federer terdapat pada lampiran 1.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Politeknik Kesehatan Tanjungkarang pada bulan Maret-Juni 2022.

C. Subyek Penelitian

Subyek penelitian ini adalah daun jeruk purut (*Citrus hystrix Dc*). Daun jeruk purut yang digunakan adalah daun pada ranting diambil dengan karakteristik yaitu daun segar berwarna hijau tua permukaan atasnya, dan berwarna hijau muda pada permukaan bawahnya (Susilo, 2013). Daun jeruk purut (*Citrus hystrix Dc*) dijadikan ekstrak dengan pelarut etanol 70%, kemudian diencerkan dengan aquadest steril konsentrasi 10%, 20%, 40%,

60%, 80%, 100% yang digunakan sebagai larutan uji dalam menghambat pertumbuhan jamur *Malassezia furfur*.

D. Variabel dan Definisi Operasional Penelitian

Variabel	Definisi	Cara ukur	Alat ukur	Hasil ukur	Skala
Variabel bebas: Ekstrak daun jeruk purut (<i>Citrus hystrix Dc</i>)	Ekstrak daun jeruk purut (<i>Citrus hystrix Dc</i>) yaitu ekstrak dari daun jeruk purut yang diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70% lalu ekstrak hasil maserasi diencerkan dengan konsentrasi 10%, 20%, 40%, 60%, 80%, 100%	Ekstrak diencerkan dengan rumus $V_1 \times \%_1 =$ $V_2 \times \%_2$	Pipet ukur dan labu ukur	%	Rasio
Kontrol positif Ketokonazol	Obat antijamur ketokonazol dengan dosis 200 mg	Mengukur diameter zona hambat dengan metode difusi cakram <i>Kirby Bauer</i>	Jangka sorong	mm	Rasio
Variabel terikat: Zona hambat pertumbuhan jamur <i>Malassezia furfur</i>	Luas zona pertumbuhan jamur <i>Malassezia furfur</i> yang dapat dihambat oleh ekstrak daun jeruk purut dan obat antijamur ketokonazol	Mengukur diameter zona hambat dengan metode difusi cakram <i>Kirby Bauer</i>	Jangka sorong	mm	Rasio

E. Pengumpulan Data

1. Prosedur penelitian
 - a. Pengajuan Permohonan izin dari jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Tanjungkarang untuk dilakukan determinasi dan pembuatan ekstrak daun jeruk purut di Laboratorium Fakultas MIPA Universitas Lampung dan pemesanan strain jamur *Malassezia furfur* ke Laboratorium Parasitologi Klinik Universitas Mulawarman.
 - b. Pengumpulan alat dan bahan pemeriksaan

c. Identifikasi daun jeruk purut

Daun jeruk purut (*Citrus hystrix Dc*) yang didapatkan dideterminasi di Laboratorium Botani Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.

d. Pembuatan simplisia daun jeruk purut

e. Dilakukan uji fitokimia simplisia daun jeruk purut di Laboratorium Kimia Organik Fakultas MIPA Universitas Lampung.

f. Ekstraksi simplisia daun jeruk purut di Laboratorium Kimia Organik Fakultas MIPA Universitas Lampung.

g. Pengenceran larutan uji menjadi konsentrasi 10%, 20%, 40%, 60%, 80%, 100%.

h. Pembuatan suspensi jamur *Malassezia furfur*.

i. Pengujian ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix Dc*) terhadap pertumbuhan jamur *Malassezia furfur* dengan metode difusi cakram *Kirby Bauer* dan pengamatan zona hambat yang terbentuk pada masing-masing konsentrasi dan diukur menggunakan alat ukur jangka sorong dalam satuan mm.

2. Metode Pemeriksaan

Difusi agar cakram dengan cara *Kirby Bauer*.

3. Prinsip Pemeriksaan

Letakkan cakram kertas filter yang berisi sejumlah obat yang ditempatkan pada permukaan media kultur padat yang telah diinokulasi dengan mikroorganisme uji. Setelah diinkubasi, diameter zona hambat di sekitar cakram diukur sebagai ukuran kemampuan obat untuk menghambat organisme uji tertentu (Jawetz dkk, 2014).

4. Prosedur Kerja

a. Persiapan alat dan bahan pemeriksaan

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

Bahan-bahan yang digunakan adalah aquades steril, etanol 70%, NaCl 0,85%, ketokonazol 200 mg, media *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA), *olive oil*, standar *Mc Farland*, disk obat, kloramfenikol, LCB (Lactofenol Cotton Blue),

ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix Dc*) dan strain murni jamur *Malassezia furfur*.

- b. Identifikasi bahan uji daun jeruk purut (*Citrus hystrix Dc*) di Laboratorium Botani Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Lampung.
- c. Pengujian fitokimia daun jeruk purut
 - 1) Senyawa saponin
Dipipet 0,5 mL sampel + 5 mL aquades, kemudian dikocok selama 30 detik, lalu diamati. Bila hasil positif terdapat busa.
 - 2) Senyawa steroid
Dipipet 0,5 mL sampel + 0,5 mL asam asetat glacial + 0,5 mL H₂SO₄. Bila hasil positif warna sampel berubah menjadi biru atau ungu.
 - 3) Senyawa terpenoid
Dipipet 0,5 mL sampel + 0,5 mL asam asetat glacial + 0,5 mL H₂SO₄. Bila hasil positif warna sampel berubah menjadi merah atau kuning.
 - 4) Senyawa tannin
Dipipet 1 mL sampel + 3 tetes larutan FeCl₃ 10%. Bila hasil positif warna larutan hitam kebiruan.
 - 5) Senyawa alkaloid
Dipipet 0,5 mL sampel + 5 tetes kloroform + 5 tetes pereaksi mayer (1 g KI dilarutkan dalam 20 mL aquades, ditambahkan 0,271 g HgCl₂ hingga larut). Bila hasil positif warna larutan putih kecoklatan.
 - 6) Senyawa flavonoid
Dipipet 0,5 mL sampel + 0,5 g serbuk Mg + 5 mL HCl pekat (tetes demi setetes). Bila hasil positif warna larutan merah atau kuning dan terdapat busa.
- d. Pengujian ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix Dc*) terhadap pertumbuhan jamur *Malassezia furfur* dengan prosedur kerja sebagai berikut:
 - 1) Sterilisasi Alat
Alat gelas yang digunakan dalam penelitian ini dibersihkan dan dikeringkan, kemudian dibungkus dengan kertas pembungkus. Sterilkan pada suhu 160°C selama 60 menit dalam oven (Soemarno, 2000).

2) Pembuatan Larutan Kloramfenikol

Setiap 1000 mL media *Saboraud Dextrose Agar* (SDA) memerlukan 400 mg kloramfenikol. Setiap 250 mg kloramfenikol dilarutkan dalam 10 ml NaCl 0,85%, menurut perhitungan, diperlukan 16 ml NaCl 0,85% untuk melarutkan 400 mg kloramfenikol (Soemarno, 2000).

3) Pembuatan Larutan Standar *Mc Farland* 0,5

Campurkan 9,95 ml larutan H_2SO_4 1% dengan 0,05 ml larutan $BaCl_2 \cdot 2H_2O$ 1% hingga volumenya menjadi 10 ml, kocok hingga homogen. Larutan harus dikocok setiap kali digunakan untuk membandingkan suspensi jamur (Soemarno, 2000).

4) Pembuatan NaCl 0,85%

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

5) Pembuatan Media Agar Dari *Saboraud Dextrose Agar* (SDA)

Pembuatan media dilakukan sesuai dengan petunjuk pembuatan pada botol media yaitu 65 gram serbuk media *Saboraud Dextrose Agar* (SDA) dikalikan dengan volume yang dibutuhkan dalam 1000 ml. Kemudian timbang, aduk, dan panaskan di atas hotplate sampai benar-benar larut. Media kemudian disterilisasi dalam autoklaf pada suhu $121^\circ C$ dengan tekanan 1 atm selama 15 menit. Kemudian dinginkan hingga suhu $50^\circ C$ dan tambahkan larutan kloramfenikol. Setelah itu, tuangkan media kedalam cawan petri steril dengan ketebalan ± 4 mm, biarkan mengeras (Soemarno, 2000).

6) Uji Sterilisasi Media

Setelah media dibuat, keluarkan plate dan inkubasi pada suhu $35-37^\circ C$ selama 2 hari. Jika setiap plate tumbuh 2 koloni, itu dianggap tidak steril (Soemarno, 2000).

7) Identifikasi Jamur *Malassezia furfur*

a) Pemeriksaan Makroskopis

Jamur *Malassezia furfur* ditanam pada media SDA kemudian diinkubasi pada suhu $37^\circ C$ selama 5x24 jam dan amati pertumbuhan koloni jamur *Malassezia furfur* berwarna krem atau coklat.

b) Pemeriksaan Mikroskopis

- (1) Diambil koloni biakan jamur pada media SDA, diletakkan di atas permukaan objek glass.
- (2) Diletakkan objek glass pada rak cat, kemudian dilakukan pengecatan pewarnaan dengan meneteskan LCB (Lactofenol Cotton Blue).
- (3) Dimati dibawah mikroskop dengan perbesaran 10x dan dilanjutkan perbesaran 40x (Prayitno, 2015).

8) Pembuatan Suspensi Jamur *Malassezia furfur*

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

9) Pembuatan Larutan Kontrol Positif

Haluskan 200 mg ketokonazol, lalu tambahkan 10 ml aquades steril dan homogenkan. Kemudian rendam disk kosong dalam larutan tersebut selama 15 menit (Alfiah, 2015).

10) Pembuatan Larutan Uji Ekstrak Daun Jeruk Purut

a) Identifikasi bahan uji daun jeruk purut (*Citrus hystrix Dc*) di Laboratorium Botani Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Lampung.

b) Pembuatan Simplisia

Sampel daun jeruk purut diambil sebanyak ± 3 kg dalam kondisi segar, kemudian cuci dengan air mengalir lalu tiriskan. Daun jeruk purut dikeringkan secara tidak langsung dengan menutupinya dengan kain hitam di bawah sinar matahari. Simplisia yang telah dikeringkan, kemudian dihaluskan dengan blender dan simpan dalam wadah kering.

c) Pembuatan Ekstrak Daun Jeruk Purut

Masukan simplisia yang telah dihaluskan dengan blender kemudian dimasukkan kedalam wadah, tambahkan 1000 mL etanol 70%, aduk dengan batang pengaduk dan diamkan selama 3 hari. Saring ekstrak dengan penyaring. Diperoleh filtrat I tampung dalam botol dan ampas I ditambahkan 1000 mL etanol 70%, aduk dengan batang pengaduk dan diamkan selama tiga malam.

Ekstrak kemudian disaring dengan kertas saring sehingga diperoleh filtrat II. Selanjutnya proses yang sama dilakukan hingga diperoleh filtrat III. Seluruh filtrat yang diperoleh dari proses maserasi I, II, III digabung, disaring dan dipekatkan dengan *Vacum Rotary Evaporator* pada suhu 40°C sampai diperoleh ekstrak kental, Kemudian dilakukan pengenceran ekstrak dengan aquadest steril konsentrasi 10%, 20%, 40%, 60%, 80%, 100% dari larutan induk menggunakan rumus pengenceran (Manu, 2013).

Pengenceran sesuai 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 (%)

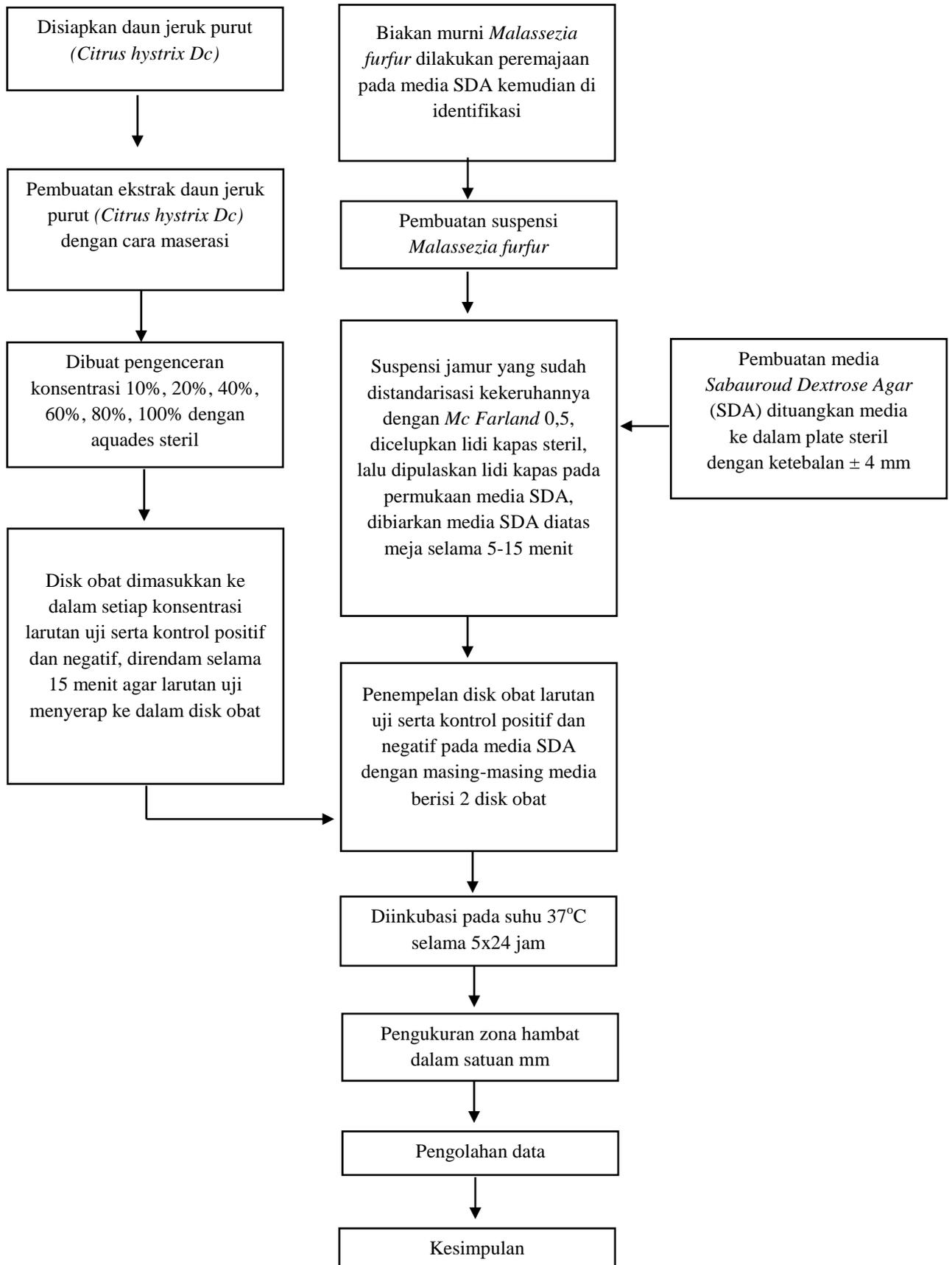
- 11) Pelaksanaan Uji Daya Hambat
 - a) Disiapkan media *Saboraud Dextrose Agar* (SDA) yang telah mengeras
 - b) Rendam lidi kapas steril dalam suspensi jamur *Malassezia furfur* yang kekeruhannya telah dibandingkan dengan standar *Mc Farland* 0,5 dan tunggu beberapa saat hingga suspensi jamur *Malassezia furfur* meresap ke dalam kapas, lalu angkat lidi kapas dan ditekan pada dinding tabung sambil diputar.
 - c) Lidi kapas dipulaskan diatas permukaan media SDA (*Saboraud Dextrose Agar*) hingga seluruh permukaan tertutup rapat dengan pulasan.
 - d) Media SDA (*Saboraud Dextrose Agar*) dibiarkan diatas meja selama 15 menit agar suspensi jamur *Malassezia furfur* meresap ke dalam media.
 - e) Disk blank direndam dalam ekstrak daun jeruk purut konsentrasi 10%, 20%, 40%, 60%, 80%, 100%, kontrol positif dan negatif, masing-masing selama 15 menit.
 - f) Tempelkan disk ke permukaan media SDA dengan pinset dengan cara menekan perlahan agar disk menempel pada media. Setiap media berisi 2 disk dengan jarak sekitar 15 mm antar disk.
 - g) Inkubasi cawan agar pada suhu 37°C selama 5x24 jam (Jawetz, 2014).

- h) Diameter zona bening yang terbentuk di sekitar disk obat diukur menggunakan jangka sorong melalui bagian tengah disk sebagai diameter daya hambat ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix Dc*) terhadap pertumbuhan jamur *Malassezia furfur*. Potensi antijamur diukur dengan mengukur zona radikal. Prosedur ini dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali (Soemarno, 2000).
- i) Interpretasi Hasil pengukuran diameter zona hambat di lihat pada tabel

Tabel 3.1. Kategori Diameter Zona Hambat (Puthera dkk dalam Alfiah dkk, 2015).

Diameter Zona Hambat	Kategori Zona Hambat
< 10 mm	Lemah
10-15 mm	Sedang
16 -20 mm	Kuat
>20 mm	Sangat Kuat

5. Skema Kerja Pemeriksaan



F. Pengolahan dan Analisa Data

1. Pengolahan Data

Data diperoleh dengan cara:

- a. Melakukan pengujian daya hambat ekstrak daun jeruk purut konsentrasi 10%, 20%, 40%, 60%, 80%, 100% terhadap pertumbuhan jamur *Malassezia furfur*.
- b. Melakukan pengukuran zona hambat dari masing-masing konsentrasi menggunakan alat ukur jangka sorong dengan satuan mm.
- c. Data zona hambat yang diperoleh disajikan dalam bentuk tabel.

2. Analisis Data

Analisis data yang digunakan adalah Analisis data univariat dan bivariat. Analisa data univariat adalah data terhadap variabel dari hasil penelitian dengan masing-masing konsentrasi yang diukur zona hambatnya dilakukan pengulangan 3 kali kemudian dihitung rata-ratanya. Tidak dilakukan analisis data bivariat karena hasil penelitian uji daya hambat ekstrak daun jeruk purut terhadap jamur *Malassezia furfur* tidak ada yang positif yaitu hasilnya 0, sehingga tidak ada data yang diolah.

G. Ethical Clearance (Persetujuan Etik)

Penelitian yang dilakukan ini atas izin komisi etik, penelitian ini tidak menimbulkan bahaya bagi lingkungan karena limbah yang dihasilkan selama proses penelitian dikumpulkan dan dimusnahkan selama proses pengolahan limbah. Limbah ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix Dc*) diolah dengan cara dibuang langsung ke saluran pembuangan, karena limbah larutannya tidak berbahaya bagi lingkungan. Limbah media *Saboraud Dextrose Agar (SDA)* Plate dan limbah suspensi jamur *Malassezia furfur* dalam tabung dimusnahkan dengan cara direbus pada suhu 100°C selama 30 menit, air rebusan dibuang ke saluran pembuangan. Kemudian tabung dan plate direbus kembali dengan penambahan deterjen, lalu air rebusan dibuang ke saluran pembuangan, Setelah itu tabung dan plate yang sudah digunakan dicuci dengan detergen dan dibilas dengan air mengalir