

BAB III METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

Jenis dan desain penelitian ini adalah eksperimen menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Sebagai variabel bebas adalah ekstrak etanol biji mahoni (*Swietenia mahagoni* (L.) Jacq) pada konsentrasi 500 ppm, 1000 ppm, 1500 ppm dan 2000 ppm dan sebagai variabel terikat adalah pertumbuhan jamur *Candida albicans* secara *in-vitro* menggunakan metode difusi cakram *Kirby Bauer* dengan mengukur zona hambat yang terbentuk. Ketokonazol 2% digunakan sebagai kontrol positif dan (Dimetil dulfoksida) DMSO 2% digunakan sebagai kontrol negatif. Pengulangan dilakukan sebanyak 4 kali yang didapat dari perhitungan menggunakan rumus Freederer sebagai berikut:

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

Keterangan:

t = jumlah kelompok

n = jumlah sampel

$$(n-1)(6-1) \geq 15$$

$$5(n-1) \geq 15$$

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 15+5$$

$$n \geq 4$$

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi

Determinasi tanaman mahoni dilakukan di Laboratorium Botani Jurusan Biologi (FMIPA) Universitas Lampung, ekstraksi telah dilaksanakan di Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Lampung, sedangkan uji daya hambat sudah dilaksanakan di Unit Pelayanan Teknis Daerah (UPTD) Balai Laboratorium Kesehatan Provinsi Lampung.

2. Waktu

Penelitian telah dilaksanakan pada bulan Februari sampai dengan bulan April tahun 2022.

C. Populasi dan Sampel Penelitian

1. Populasi

Populasi pada penelitian ini adalah biji mahoni (*Swietenia mahagoni* (L.) Jacq). Biji mahoni (*Swietenia mahagoni* (L.) Jacq) berupa biji yang sudah keluar dari buah, biji dilengkapi dengan sayap, panjang, bentuk bulat, pipih, pangkal sayap biji membesar, didalamnya terdapat biji yang berwarna putih, pangkal sayap keras, berkerut, kasar ujung sayap tipis, halus tumpul atau membulat, sayap berongga warna coklat, tidak berbau rasa sangat pahit (Kemenkes RI, 2017).

2. Sampel

Sampel yang digunakan adalah ekstrak etanol biji mahoni (*Swietenia mahagoni* (L.) Jacq) dengan variasi konsentrasi 500 ppm, 1000 ppm, 1500 ppm dan 2000 ppm.

D. Variabel dan Definisi Operasional

Tabel 3.1. Variabel dan definisi operasional.

No.	Variabel	Definisi	Cara Ukur	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala
1.	Variabel bebas :					
	Ekstrak etanol biji mahoni (<i>Swietenia mahagoni</i> (L.) Jacq) konsentrasi 500 ppm, 1000 ppm, 1500 ppm dan 2000 ppm.	Biji mahoni (<i>Swietenia mahagoni</i> (L.) Jacq) yang diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96% kemudian dibuat seri konsentrasi 500 ppm, 1000 ppm, 1500 dan 2000 ppm.	Ditimbang 1000 mg ekstrak etanol kental kemudian dilarutkan dalam 100 ml DMSO 2%. Larutan baku 10000 ppm diencerkan menjadi 500 ppm, 1000 ppm dan 1500 ppm dan 2000 ppm dengan rumus $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$	Neraca analitik	Ekstrak etanol biji mahoni (<i>Swietenia mahagoni</i> (L.) Jacq) dengan seri konsentrasi 500 ppm, 1000 ppm, 1500 ppm dan 2000 ppm.	Rasio
	Kontrol positif ketokonazol 2%.	Ketokonazol diencerkan dengan akuades steril menjadi konsentrasi 2%.	Ditimbang 0,02 gram ketokonazol, dilarutkan dalam 1 ml akuades steril.	Neraca analitik	Larutan Ketokonazol 2% dalam akuades steril.	Rasio
	Variabel terikat:					
	Pertumbuhan jamur <i>Candida albicans</i> dengan perlakuan ekstrak etanol biji mahoni (<i>Swietenia mahagoni</i> (L.) Jacq)	Pertumbuhan jamur <i>Candida albicans</i> yang dihambat oleh ekstrak etanol biji mahoni (<i>swietenia mahagoni</i>) dengan konsentrasi 500 ppm, 1000 ppm, 1500 ppm dan 2000 ppm.	Mengukur diameter zona hambat dengan metode difusi Kirby-Bauer.	Jangka sorong/zone reader	Diameter zona hambat diukur dalam mm	Rasio

E. Teknik Pengumpulan Data

1. Prosedur Penelitian

- a. Pengajuan permohonan izin dari jurusan Teknologi Laboratorium Medik Poltekkes Tanjungkarang untuk dilakukan determinasi dan pembuatan ekstrak biji mahoni (*Swietenia mahagoni* (L.) Jacq) di Laboratorium Kimia Organik Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Lampung dan Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia (FMIPA) Universitas Lampung serta izin penelitian di UPTD Balai Laboratorium Kesehatan Daerah Provinsi Lampung untuk uji daya hambat.

- b. Pengumpulan biji mahoni (*Swietenia mahagoni* (L.) Jacq).
Biji yang dikumpulkan adalah biji mahoni (*Swietenia mahagoni* (L.) Jacq) yang sudah keluar dari buah, bentuk bulat pipih, didalamnya terdapat biji yang berwarna putih, tidak berbau dan rasa sangat pahit (Kemenkes, 2012). Biji dipisahkan dari kulit kemudian dibersihkan dan dicuci dengan air mengalir lalu dikering anginkan.
 - c. Determinasi bahan uji biji mahoni (*Swietenia mahagoni* (L.) Jacq) di Laboratorium Botani Jurusan Biologi FMIPA Universitas Lampung.
 - d. Pembuatan simplisia biji mahoni (*Swietenia mahogani* (L.) Jacq).
 - e. Ekstraksi simplisia biji mahoni (*Swietenia mahagoni* (L.) Jacq) di Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung.
 - f. Pembuatan larutan baku ekstrak 10000 ppm. Pengenceran larutan baku menjadi konsentrasi 500 ppm, 1000 ppm, 1500 ppm dan 2000 ppm.
 - g. Pembuatan suspensi jamur *Candida albicans* merupakan koleksi Laboratorium Mikrobiologi UPTD Balai Laboratorium Kesehatan Daerah Provinsi Lampung.
 - h. Pengujian ekstrak etanol biji mahoni (*Swietenia mahagoni* (L.) Jacq) terhadap pertumbuhan jamur *Candida albicans* 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 milimeter (mm).
2. Metode Pemeriksaan

Metode difusi cakram *Kirby-Baurer* merupakan metode standar yang direkomendasikan oleh Komite Nasional untuk Klinis Standar Laboratorium (NCCLS), digunakan untuk tes antimikroba (Sahgal *et al.*, 2009). Ekstrak biji mahoni (*Swietenia mahagoni* (L.) Jacq dilarutkan dalam larutan DMSO 2% dengan konsentrasi berbeda (Vigneshwaran and Lalitha, 2017). Cakram selulosa steril berdiameter 6 mm diresapi dengan ekstrak dalam DMSO 2% dengan konsentrasi yang berbeda (500 ppm, 1000 ppm, 1500 ppm dan 2000 ppm) selanjutnya ditempatkan di permukaan media SDA yang sudah diinokulasi dengan *Candida albicans*. Setelah 24 jam diinkubasi pada suhu 37°C, zona hambat pertumbuhan jamur sebanding dengan derajat hambat

yang dihasilkan. Setiap sampel diuji dalam empat kali pengulangan (Falcón-Piñeiro *et al.*, 2021).

3. Prinsip Pemeriksaan

Mengetahui kemampuan dari bahan antimikroba untuk menghambat pertumbuhan bakteri secara *in-vitro*. Mikroba ditumbuhkan dalam suatu media perbenihan dan diletakkan cakram yang mengandung bahan antimikroba. Kemampuan bahan antimikroba menghambat pertumbuhan mikroba dilihat dari lebarnya daya hambat disekeliling cakram (Vandepitte *et al.*, 2003).

4. Cara Kerja

a. Persiapan alat dan bahan

- 1) Alat : cawan petri, cakram steril, pinset, neraca analitik Mettler Toledo, gelas ukur, inkubator, erlenmeyer, autoklaf, karet penghisap, pipet ukur, lidi kapas steril, kapas, botol gelap, kain hitam, kertas kopi, alumunium foil, jangka sorong, *hotplate*, gelas objek, blender, vortex, termometer, korek api, *waterbath*, oven, evaporator, corong gelas, tabung reaksi, tak tabung reaksi, ose dan lampu spiritus.
- 2) Bahan : Akuades steril, Etanol 96% p.a Merck, DMSO \geq 99% Merck, Natrium Klorida (NaCl) kritical p.a Merck, Barium Klorida ($BaCl_2$) kristal p.a Merck, Asam sulfat (H_2SO_4) p.a Merck, standar MC. Farland 0.5, Ketokonazol tablet 200 mg, media *Sabouroud 4% Dextrose Agar* (SDA) Merck, biji mahoni (*Swietenia mahagoni* (L.) Jacq) dan strain murni *Candida albicans* ATCC 10231.

b. Determinasi tanaman

Untuk memvalidasi keaslian tanaman maka dilakukan determinasi di Laboratorium Botani Jurusan Biologi FMIPA, Universitas Lampung.

c. Pembuatan ekstrak biji mahoni (*Swietenia mahagoni* (L.) Jacq)

- 1) Biji yang telah dipisahkan dari kulitnya sebanyak 500 gram dicuci dengan air kran mengalir untuk menghilangkan kotoran sebelum proses pengeringan dicuci sampai bersih.
- 2) Ditiriskan dan diangin-anginkan hingga kering. Biji yang sudah kering kemudian dihaluskan dengan blender.

- 3) Dilakukan perendaman serbuk biji mahoni dengan pelarut etanol 96% perbandingan 1:4 dalam bejana tertutup pada suhu kamar selama 2 hari dengan pengadukan berkali-kali.
 - 4) Hasil maserasi disaring menggunakan kertas saring dan didapat maserat, kemudian dipekatkan dalam *rotary evaporator* pada suhu 40°C dengan kecepatan 50 rpm.
 - 5) Ekstrak pekat dikeringkan dalam oven pada suhu 40°C selama tiga hari untuk mendapatkan bentuk pasta (Endarini, 2016)
- d. Pengujian ekstrak biji mahoni (*Swietenia mahagoni* (L.) Jacq) terhadap pertumbuhan jamur *Candida albicans* dengan tahapan sebagai berikut :
- 1) Sterilisasi alat dan bahan

Alat gelas yang digunakan dalam penelitian ini dibersihkan dan dikeringkan terlebih dahulu, kemudian dibungkus dengan kertas pembungkus (kertas kopi). Kemudian disterilkan menggunakan oven pada suhu 160°C selama 60 menit. Seluruh media, lidi kapas disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm (Fitria dan Setiawati, 2020).
 - 2) Prosedur sterilisasi
 - a) Terlebih dahulu dibersihkan bagian dalam autoklaf.
 - b) Menyambungkan kabel dengan sumber listrik.
 - c) Membuka penutup autoklaf dengan memutar stir ke arah kiri, menutup saluran uap dan tempat keluarnya uap kemudian mengisi wadah air dengan 2 liter aquadest atau air kran biasa.
 - d) Memasukkan alat/bahan yang akan disterilisasi ke dalam keranjang kemudian meletakkan keranjang diatas wadah air, selanjutnya menutup penutup autoklaf dengan memutar stir ke arah kanan.
 - e) Menempelkan indikator sterilisasi pada alat/bahan yang akan disterilkan.
 - f) Memutar tombol temperatur pada suhu 121⁰C dan memutar pengatur waktu (*timer*) 15 menit. Menekan tombol *start* ke arah

kiri maka lampu hijau akan menyala. Satu menit menjelang berakhirnya proses sterilisasi alat akan berbunyi dan lampu hijau mati.

g) Menekan tombol *off* ke arah tegak lurus, membuka saluran uap sampai suhu dan tekanan yang ditunjukkan oleh jarum pada skala berada di titik 0 kemudian membuka penutup autoklaf. Pada kasus dimana air di dalam autoklaf kering/habis maka alat akan berbunyi diikuti oleh menyalnya lampu merah dan proses pemanasan otomatis berhenti. Penambahan air dilakukan jika suhu dan tekanan yang ditunjukkan oleh jarum pada skala berada di titik 0. Setelah air ditambahkan ulangi proses sterilisasi dari awal. Untuk mengeringkan alat/bahan yang telah disterilisasi, putar sedikit stur ke arah kiri sehingga penutup agak longgar, mengatur *timer* pada 20 menit kemudian menekan tombol *dry* ke arah kanan maka lampu kuning akan menyala. Setiap satu menit menjelang proses pengeringan alat akan berbunyi dan lampu kuning mati. Menekan tombol *off* arah tegak lurus, membuka saluran uap sampai suhu dan tekanan yang ditunjukkan oleh jarum jam pada skala berada di titik 0 kemudian membuka penutup autoklaf. Perhatikan warna yang ditunjukkan oleh indikator sterilisasi untuk memastikan proses sterilisasi berlangsung sempurna (Kemenkes RI, 2017).

3) Pembuatan larutan standar Mc Farland 0,5

Sebanyak 0,05 ml Barium Clorida 1% dalam akuades ditambahkan 9,95 ml Asam Sulfat 1%. Kemudian disimpan di tempat yang terhindar dari cahaya matahari langsung/botol coklat (Aviany dan Pujjianto, 2020).

4) Pembuatan NaCl 0,9% dari NaCl Kristal p.a

Ditimbang 0,9 gram dari NaCl kristal p.a kemudian dilarutkan dalam 100 ml akuades steril, dihomogenkan.

5) Pembuatan media *Saboraud Dextrose Agar* (SDA)

Sebanyak 6,5 gram SDA, dilarutkan dalam 100 ml aquadest dan disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Tiap cawan petri diisi dengan media sebanyak 20 ml, ditambahkan dan ditunggu media sampai mengeras (Murniana dkk., 2013).

6) Uji sterilitas media

Media SDA diinkubasi pada suhu 28°C selama 48 jam. Jika terdapat pertumbuhan koloni, hal ini menandakan bahwa media tersebut tidak steril dan tidak dapat digunakan untuk pembiakan jamur. Jika tidak terdapat pertumbuhan koloni maka media SDA yang dibuat layak digunakan untuk melakukan pembiakan jamur (Munarsih dan Rini, 2019).

7) Pembuatan suspensi jamur *Candida albicans*

Disiapkan standar kekeruhan Mc Farland 0,5. Sentuhkan ose pada puncak 1-2 koloni yang sama dan disuspensikan ke dalam tabung yang berisi NaCl 0,9% steril. Kekeruhan tabung suspensi dibandingkan dengan tabung standar kekeruhan menggunakan latar belakang surat kabar. Bila belum sama tambahkan koloni atau NaCl 0,9% steril (tabung inokulum dan tabung standar harus sama warna/jenisnya). Kekeruhan tabung inokulum harus sama dengan kekeruhan tabung standar Mc Farland 0,5 (Vandepitte *et al.*, 2003).

8) Pembuatan larutan kontrol

Kontrol positif menggunakan ketokonazol 2% dibuat dengan cara menimbang 0,02 g ketokonazol kemudian dilarutkan dengan akuades steril sebanyak 1 ml. Kontrol negatif menggunakan DMSO 2% tanpa ekstrak (Alfiah dkk., 2015).

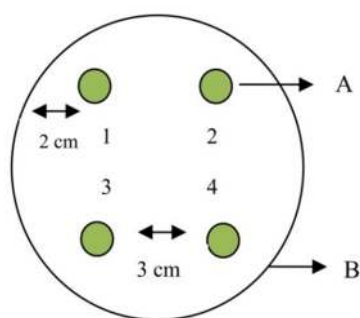
9) Uji Daya Hambat Metode *Kirby-Bauer*

a) Dichelupkan lidi kapas steril dalam suspensi kuman dan diputar beberapa kali, kemudian ditekankan pada dinding tabung untuk menghilangkan kelebihan inokulum.

b) Lidi kapas dihapuskan merata pada permukaan media yang dikehendaki sambil memutar cawan petri hingga 60° dengan 3

arah, terakhir kelilingkan kapas lidi dipinggir lingkaran cawan petri. Tutup cawan petri, diamkan selama 3-5 menit (tidak lebih dari 15 menit).

- c) Diletakkan cakram yang sudah direndam dengan larutan uji pada permukaan biakan dan ditekan dengan pinset steril agar melekat sempurna. Jarak antara pusat cakram tidak boleh kurang dari 24 mm jarak dari pinggir cawan petri minimal 15 mm. Cakram yang telah ditempelkan pada permukaan agar tidak boleh dipindahkan/ digeser. Biarkan selama 15 menit.



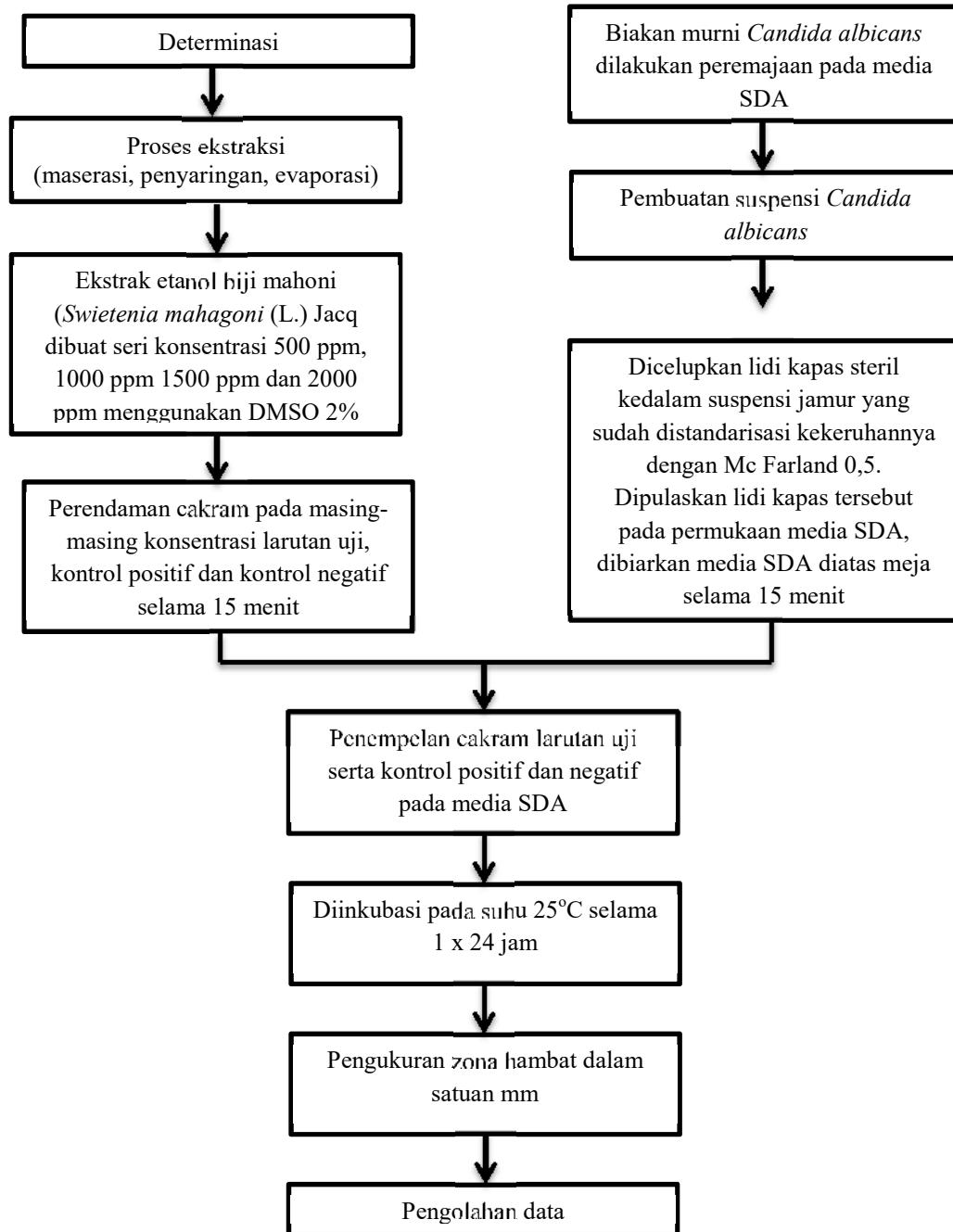
Gambar 3.1. Peletakan cakram pada media uji, (a) Disc cakram ; (b) Cawan petri (Alfiah dkk., 2015).

- d) Inkubasi selama 48 jam pada suhu 35-37°C dalam posisi cawan petri terbalik.
- e) Diamati zona hambat yang terbentuk dengan menggunakan jangka sorong dari arah bawah cawan petri tanpa membuka tutup cawan petri (Vandepitte *et al.*, 2003)
- f) Interpretasi hasil pengukuran diameter zona hambat dapat dilihat Tabel 2 (Alfiah dkk., 2015).

Tabel 3.2. Interpretasi hasil pengukuran zona hambat

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

10) Skema Kerja Pemeriksaan



Gambar 3.2. Skema kerja pemeriksaan

F. Analisa Data

Hasil pengukuran diameter zona hambat pada masing masing konsentrasi dianalisis ke dalam software dengan menggunakan program *Statistical Product Service Solution for Windows* (SPSS) versi 25. Data yang telah didapat dilakukan uji normalitas *Shapiro-Wilk*. Uji ini digunakan untuk melihat normalitas distribusi data, mengetahui apakah data yang diperoleh berdistribusi normal atau tidak. Data yang berdistribusi normal memiliki nilai $p > 0,05$, sedangkan data yang tidak berdistribusi normal memiliki nilai $p < 0,05$. Uji Homogenitas data menggunakan Uji Levene. Sedangkan untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan antara variabel-variabel pada seluruh kelompok dilakukan analisis varian satu arah (*One Way ANOVA*). Untuk menentukan perbedaan rata-rata di antara kelompok, jika didapatkan nilai $p = 0,000 (< 0.05)$ maka dilanjutkan ke uji BNT (Beda Nyata Terkecil).

G. *Ethical Clearance* (Persetujuan Etik)

Penelitian ini dilakukan atas izin komisi etik. Limbah yang dihasilkan dari penelitian ini dikumpulkan dan dimusnahkan dengan cara penanganan limbah, sehingga tidak menimbulkan bahaya bagi lingkungan. Limbah ekstrak etanol biji mahoni (*Swietenia mahagoni* (L.) Jacq) ditangani dengan cara langsung dibuang pada saluran pembuangan, karena limbah larutan tidak berbahaya bagi lingkungan. Pemusnahan limbah suspensi jamur *Candida albicans* pada tabung dan limbah media SDA *plate* dilakukan dengan cara direbus pada suhu 100°C selama 30 menit, air bekas rebusan dibuang pada saluran pembuangan. Selanjutnya tabung dan cawan petri direbus kembali dengan penambahan detergen. Setelah itu air bekas rebusan dibuang pada saluran pembuangan. Tabung dan cawan petri yang telah digunakan dicuci menggunakan detergen dan dibilas dengan air mengalir. Surat pernyataan layak etik terdapat pada lampiran 8.