

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### A. Jenis dan Desain Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan bersifat eksperimental dengan desain penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Terdapat dua variabel yaitu variabel bebas berupa ekstrak bunga telang (*Clitoria ternatea*) dengan konsentrasi yang digunakan 10-100% serta variabel terikat berupa daya hambat jamur *Candida albicans*. Pemeriksaan dilakukan menggunakan metode difusi cakram (*Kirby Bauer*) dengan mengamati zona hambat yang terbentuk. Ketokonazol digunakan sebagai kontrol positifnya sedangkan aquades digunakan sebagai kontrol negatifnya. Pengulangan yang dilakukan sebanyak 3 kali yang di dapat dari perhitungan menggunakan rumus Federer sebagai berikut :

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

Keterangan :

t = jumlah kelompok perlakuan

n = jumlah pengulangan

#### B. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Botani Jurusan Biologi FMIPA Unila, Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia FMIPA Unila, Laboratorium Penelitian Terpadu Politeknik Kesehatan Tanjung Karang, dan Laboratorium Parasitologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Politeknik Kesehatan Tanjung Karang dilaksanakan pada bulan April sampai dengan bulan Juni 2023.

#### C. Subyek Penelitian

Bunga telang (*Clitoria ternatea*) yang digunakan yaitu bunga telang yang masih segar, mekar sempurna dengan diameter 3cm, berwarna biru keunguan, dan dipetik pada waktu pagi hari. Bunga telang (*Clitoria ternatea*) kemudian dijadikan ekstrak lalu dibuat variasi konsentrasi 10-100% yang digunakan sebagai larutan uji dalam menghambat pertumbuhan jamur *Candida albicans*.

## D. Variabel dan Definisi Operasional Penelitian

Tabel 3.1 Variabel dan Definisi Operasional Penelitian

No	Variabel	Definisi	Cara Ukur	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala
1.	<b>Variabel bebas:</b>	Bunga telang ( <i>Clitoria ternatea</i> ) yang diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96% lalu ekstrak hasil maserasi dibuat konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%.				
	a. Ekstrak bunga telang ( <i>Clitoria ternatea</i> )		Pengenceran	Pipet Ukur	Persen (%)	Rasio
	b. Obat Ketokonazol	Ketokonazol diencerkan dengan aquadest steril menjadi konsentrasi 2%.	Penimbangan	Neraca analitik	Persen (%)	Rasio
2.	<b>Variabel terikat:</b>	Pertumbuhan jamur <i>Candida albicans</i> yang dihambat oleh ekstrak bunga telang ( <i>Clitoria ternatea</i> ) dan obat ketokonazol (kontrol positif)				
	Daya hambat jamur <i>Candida albicans</i> .		Pengukuran zona hambat	Jangka sorong	Diameter (mm)	Rasio

## E. Pengumpulan Data

### 1. Prosedur Penelitian

- a. Pembuatan surat izin penelitian dan pemesanan strain jamur
- b. Pengumpulan bahan-bahan pemeriksaan seperti strain jamur *Candida albicans*, media SDA, disk kosong, dan bunga telang (*Clitoria ternatea*)
- c. Identifikasi sampel
 

Determinasi bahan uji bunga telang di Laboratorium Botani Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Lampung, sedangkan pemesanan strain murni jamur *Candida albicans* didapatkan dari Laboratorium Parasitologi Universitas Indonesia.

Pengenceran larutan uji menjadi konsentrasi 10-100%.
- d. Pengujian ekstrak bunga telang (*Clitoria ternatea*) terhadap pertumbuhan jamur *Candida albicans* dengan dilakukan pengamatan zona hambat yang terbentuk pada tiap variasi konsentrasi dan diukur dengan menggunakan alat ukur jangka sorong dalam satuan (mm).

## 2. Metode Pemeriksaan

Difusi agar cakram dengan cara *Kirby Bauer*.

## 3. Prinsip Pemeriksaan

Cakram kertas yang mengandung bahan antimikroba ditempatkan diatas medium padat yang telah diinokulasikan. Setelah diinkubasi, jika organisme rentan terhadap antimikroba zona bening akan muncul disekitar cakram. Ukuran zona hambat tergantung pada sensitivitas organisme terhadap agen antimikroba (Leboffe & Pierce, 2011).

## 4. Prosedur Kerja Pemeriksaan

### a. Persiapan Alat dan Bahan.

1) Alat : Neraca analitik elektrik, Cawan petri, Tabung reaksi, Disk cakram steril, Pinset steril, Gelas ukur, Autoclave, Inkubator, Oven, Evaporator, Vacum pump, Lampu spirtus, Pipet Ukur, Ose, Kapas, Lidi kapas steril, Botol gelap, Kain hitam, Kertas kopi, Alumunium foil, Jangka sorong, Hotplate, Mixer vortex, Corong gelas, Blender, Gelas objek dan Rak tabung.

2) Bahan : Aquadest steril, NaCl 0,85%, Standar Mac Farland 0,5, Media *Sabouround Dextrose Agar* (SDA), Bunga telang (*Clitoria ternatea*), Etanol 96%, Larutan kloramfenikol, ketokonazol, dan Strain murni *Candida albicans*.

b. Determinasi bahan uji tumbuhan bunga telang (*Clitoria ternatea*) dilakukan untuk memastikan tumbuhan yang akan digunakan jelas. Bahan uji bunga telang (*Clitoria ternatea*) di determinasi di Laboratorium Botani Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Lampung.

c. Pembuatan Simplisia di Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia FMIPA Unila

Diambil sampel bunga telang sebanyak 3kg dalam kondisi mekar, kemudian sampel disortasi untuk memilah kondisi bunga yang baik dan kondisi bunga yang kurang baik, kemudian dicuci dengan air mengalir dan ditiriskan. Bunga telang dikeringkan dengan cara ditutup dengan kain hitam dibawah sinar matahari secara langsung pada waktu pagi dari jam 08.00 s.d 12.00 selama 2 sampai 3 hari. Simplisia yang sudah selesai dikeringkan lalu

dihaluskan dengan menggunakan blender dan disimpan dalam wadah yang kering dan tertutup (Kunti Mulangsri, 2019).

d. Pembuatan Ekstrak Bunga Telang di Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia FMIPA Unila

1. Masukkan simplisia yang sudah dihaluskan ke dalam botol gelap kemudian tambahkan 1000 ml etanol 96% dan diamkan selama 3 hari di tempat yang terlindung dari cahaya, kemudian aduk 2-3 kali sehari. Kemudian lakukan pemisahan antara filtrat dengan presipitat menggunakan kertas saring (maserat 1)
2. Presipitat kembali direndam dengan etanol 96% sebanyak 1000 ml, diaduk kembali lalu didiamkan selama 3 malam. Kemudian dipisahkan kembali antara filtrat dengan presipitat menggunakan kertas saring. Presipitat direndam kembali dalam 1000 ml etanol 96%, kemudian aduk kembali dan diamkan selama 3 malam. Setelah itu pisahkan kembali antara filtrat dan presipitat dengan kertas saring (maserat 2).
3. Presipitat dari maserat ke-2 dilakukan hal yang sama seperti sebelumnya (maserat 3).
4. Maserat 1, 2, 3 dicampurkan dan diuapkan dengan alat evaporator sampai diperoleh ekstrak kental, ekstrak diuapkan kembali di atas hotplate pada suhu 60°C. Setelah itu lakukan pengulangan untuk memastikan bahwa ekstrak sudah tidak mengandung pelarut lagi (ekstrak 100%). Ekstrak kemudian disimpan dalam wadah yang berbahan gelas yang steril, bersih, dan kering.

e. Pelaksanaan Uji Bebas Etanol di Laboratorium Penelitian Terpadu Politeknik Kesehatan Tanjung Karang

Uji Bebas Etanol dilakukan untuk memastikan tidak ada lagi pelarut yang terkandung pada ekstrak, maka dilanjutkan dengan pemeriksaan Uji Bebas Etanol menurut (Harbone, 1987) :

Ekstrak bunga telang yang telah di pekatkan, di uji bebas etanol 96% dengan menggunakan uji kualitatif dengan cara ekstrak ditambahkan 2 tetes  $H_2SO_4$  pekat dan 1 ml larutan  $K_2Cr_2O_7$ , jika masih terdapat kandungan etanol di

dalam ekstrak ditandai dengan terjadinya perubahan warna dari warna jingga menjadi hijau kebiruan.

f. Pelaksanaan Uji Skrining Fitokimia di Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia FMIPA Unila

Skrining fitokimia dilakukan untuk melihat secara kualitatif kandungan senyawa metabolit pada bunga telang seperti alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, steroid, dan terpenoid.

1) Senyawa alkaloid

Dipipet 0,5 ml sampel, tambahkan 5 tetes kloroform, ditambahkan 5 tetes pereaksi mayer (larutkan 1 gr KI dalam aquades 20 ml, tambahkan 0,271 gr  $\text{HgCl}_2$  hingga larut). Bila hasil pemeriksaan berwarna putih kecoklatan menunjukkan hasil positif.

2) Senyawa flavonoid

Dipipet 0,5 ml sampel, ditambahkan 0,5 gr bubuk Magnesium (Mg), lalu tambahkan 5 ml HCl pekat (tetes demi setetes). Bila hasil berwarna merah atau kuning dan terdapat busa menunjukkan hasil positif.

3) Senyawa tanin

Dipipet 1 ml sampel, ditambahkan 3 tetes larutan  $\text{FeCl}_3$  10%. Bila larutan berwarna hitam kebiruan menunjukkan hasil positif.

4) Senyawa saponin

Dipipet 0,5 ml sampel, ditambahkan 5 ml aquades, lalu dikocok selama 30 detik, dan amati hasil yang terbentuk. Bila terdapat busa menunjukkan hasil positif.

5) Senyawa steroid

Dipipet 0,5 ml sampel, ditambahkan 0,5 ml asam asetat glasial, lalu tambahkan 0,5 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Bila warna pada sampel berubah menjadi biru atau ungu menunjukkan hasil positif.

6) Senyawa terpenoid

Dipipet 0,5 ml sampel, tambahkan 0,5 ml asam asetat glasial, lalu tambahkan 0,5 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Bila warna pada sampel berubah menjadi merah atau kuning menunjukkan hasil positif.

(Tasmin dkk, 2014)

g. Pengujian Ekstrak Bunga Telang (*Clitoria ternatea*) terhadap Pertumbuhan Jamur *Candida albicans* dilakukan di Laboratorium Parasitologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Politeknik Kesehatan Tanjung Karang 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. Kemudian disterilkan menggunakan oven pada suhu 160°C selama 60 menit (Soemarno, 2000).

2) Pembuatan NaCl 0,85%

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

3) Pembuatan Larutan Kloramfenikol

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

4) Pembuatan Media Agar dari *Saboraud Dextrose Agar*

*Saboraud Dextrose Agar* merupakan media yang digunakan untuk isolasi, kultur, dan pemeliharaan jamur. SDA juga direkomendasikan untuk isolasi, kultur ragi, dan dermatofit dari sampel yang terkontaminasi. Adanya kloramfenikol menghambat sebagian besar kontaminan terhadap bakteri. Prosedur pembuatan SDA:

Sebanyak 65 gram medium disuspensikan ke dalam 1 liter aquadest, kemudian diaduk dan dipanaskan sampai mendidih selama 1 menit agar tercampur sempurna. Setelah larut sempurna, ditambahkan larutan kloramfenikol (tujuannya untuk mencegah tumbuhnya kuman kontaminan), Kemudian media dilakukan sterilisasi di dalam autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm. Setelah itu, tunggu hingga tidak terlalu panas, sekitar suhu 40-45°C. Setelah itu media dimasukkan ke dalam cawan petri yang telah disterilisasi sebanyak 25 ml dan dihomogenkan. Selanjutnya, inokulasikan mikroorganisme ke

dalam cawan petri dan inkubasi pada suhu 30°C selama 3-7 hari (Safitri & Novel, 2021).

5) Uji Sterilitas Media

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

6) Pembuatan Larutan Standar Mac Farland 0,5

Dicampurkan sebanyak 9,95 ml larutan asam sulfat ( $H_2SO_4$ ) 1% dengan 0,05 ml larutan Barium chloride dihydrate ( $BaCl_2 \cdot 2H_2O$ ) 1% sehingga total volume menjadi 10 ml, dikocok agar homogen. Larutan harus dikocok tiap akan digunakan untuk membandingkan dengan suspensi jamur (Soemarno, 2000).

7) Identifikasi Mikroskopis Jamur *Candida albicans*

(Pewarnaan Gram)

- a) Jamur *Candida albicans* ditanam pada media SDA, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 2x24 jam lalu diamati koloni jamur *Candida albicans* yang tumbuh pada media SDA.
- b) Setelah itu koloni jamur yang terpisah pada media SDA diambil, kemudian diletakkan pada permukaan objek glass, lalu dilakukan difiksasi diatas lampu spirtus.
- c) Lakukan pewarnaan gram pada koloni yang telah dilakukan fiksasi pada permukaan objek glass tersebut.
- d) Selanjutnya, diamati morfologi jamur dibawah mikroskop dengan perbesaran 10x kemudian dilanjutkan dengan perbesaran 40x.

(Uji Germ Tube)

- a) Masukkan 1 ml putih telur kedalam tabung reaksi.
- b) Koloni *Candida albicans* pada media SDA diambil sedikit menggunakan ose steril, kemudian masukkan kedalam tabung reaksi yang berisi putih telur.
- c) Tutup tabung dengan kapas, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama  $\pm 2$  jam.

- d) Setelah diinkubasi, suspensi putih telur yang mengandung *Candida albicans* diambil dengan ose bulat lalu diletakkan diatas permukaan objek glass kemudian ditutup dengan cover glass.
- e) Selanjutnya, diperiksa dibawah mikroskop dengan perbesaran 10x kemudian dilanjutkan dengan perbesaran 40x.

Interpretasi :

Hasil dinyatakan positif bila ditemukan pertumbuhan hifa seperti kecambah yang berbentuk raket (Mulyati dkk, 2019).

#### 8) Pembuatan Suspensi Jamur *Candida albicans*

Biakan murni jamur *Candida albicans* dibuat suspensi dengan mengambil 1 ujung ose koloni jamur dan ditambahkan larutan NaCl 0,85%, kemudian dihomogenkan dengan alat mixer vortex sampai didapatkan kekeruhan yang di sesuaikan dengan larutan standar 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).

#### 9) Pembuatan Larutan Kontrol

Kontrol positif yang digunakan yaitu ketokonazol 2% dibuat dengan menimbang 0,02 gram ketokonazol lalu dilarutkan dalam 10 ml aquadest steril. Kontrol negatif yang digunakan yaitu aquadest steril tanpa ekstrak.

#### 10) Pengenceran Ekstrak Bunga Telang

Ekstrak yang telah dilakukan uji bebas etanol dan skrining fitokimia kemudian diencerkan menggunakan aquades hingga didapatkan ekstrak dengan konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% dan 100%.

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 yang akan dibuat (%)

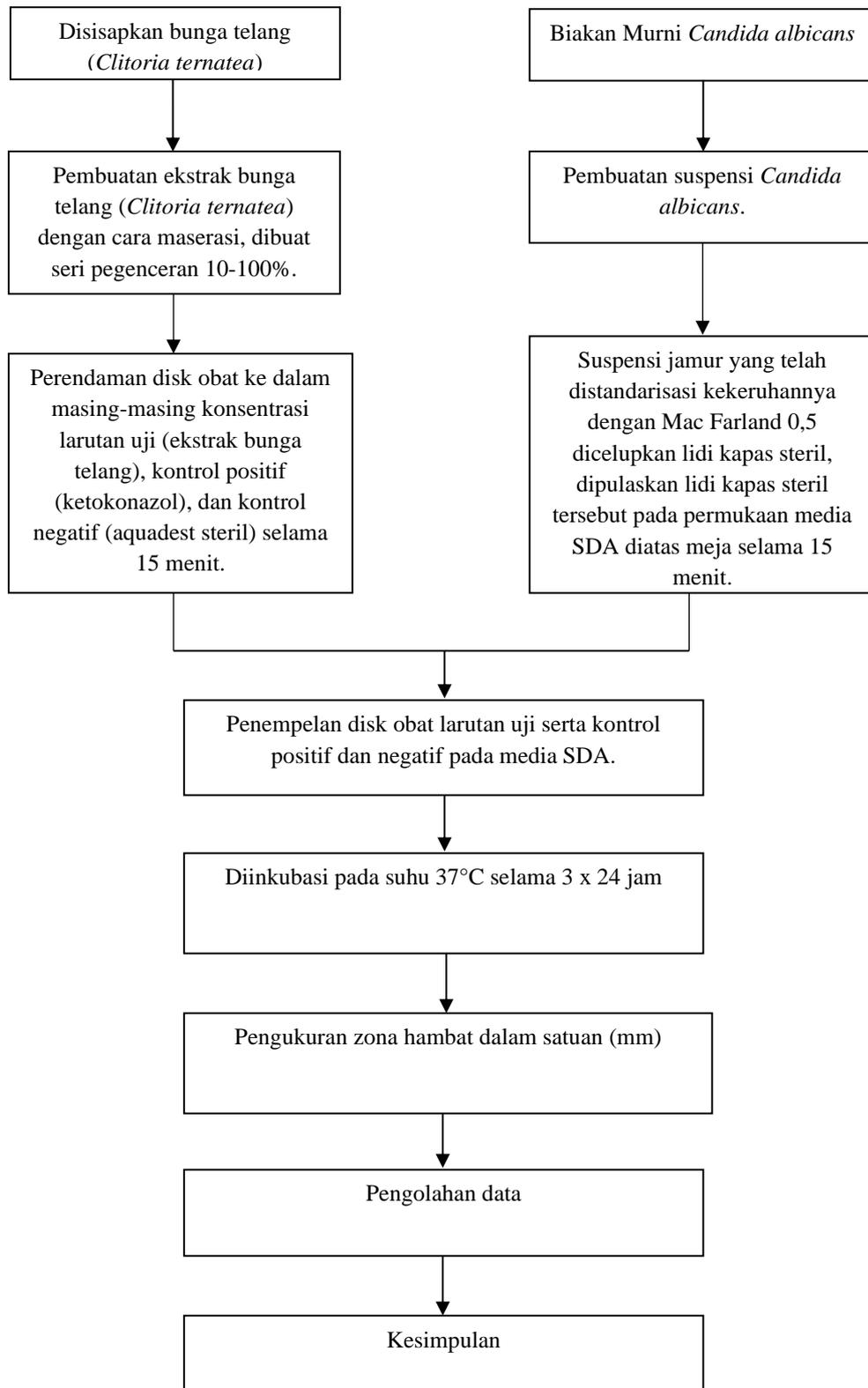
## 11) Pelaksanaan Uji Daya Hambat

- a) Dikeluarkan medium agar *Saboraud Dextrose Agar* (SDA) yang sudah mengeras dari dalam kulkas.
- b) Celupkan lidi kapas yang telah steril ke dalam suspensi jamur *Candida albicans* yang kekeruhannya dibandingkan dengan larutan standar Mc Farland 0,5, tunggu beberapa saat hingga suspensi jamur *Candida albicans* meresap ke dalam kapas, lalu angkat swab dan ditekan sambil memutar dinding bagian dalam tabung.
- c) Dioleskan lidi kapas tadi pada permukaan substrat SDA terlebih dahulu hingga permukaan tertutup rapat dengan pulasan suspensi.
- d) Biarkan medium *Saboraud Dextrose Agar* (SDA) diatas meja dengan waktu 5 menit, dengan tujuan agar suspensi jamur meresap ke dalam media.
- e) Pada disk kosong dilakukan perendaman pada larutan uji ekstrak bunga telang, kontrol positif, dan kontrol negatif dengan waktu masing-masing 15 menit.
- f) Dengan menggunakan pinset yang telah steril, letakkan disk obat yang sudah direndam larutan uji ekstrak bunga telang diatas permukaan medium SDA, tekan dengan perlahan agar cakram obat menempel pada medium SDA dengan jarak  $\pm 15$  mm antar cakram obat.
- g) Inkubasi media SDA tersebut pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama  $3 \times 24$  jam dalam (Jawetz dkk, 2008).
- h) Diamati zona bening yang terbentuk di sekitar cakram obat, zona bening diukur dengan menggunakan jangka sorong.
- i) Interpretasi hasil pengukuran diameter zona hambat dapat dilihat pada Tabel 3.2 dibawah ini.

Tabel 3.2 Kategori Diameter Zona Hambat (Davis and Stout, 1971)

<b>Diameter Zona Hambat</b>	<b>Kategori Zona Hambat</b>
<5 mm	Lemah
5-10 mm	Sedang
10-20 mm	Kuat
>20 mm	Sangat Kuat

## 5. Skema Kerja Pemeriksaan



## **F. Pengolahan dan Analisa Data**

### **1. Pengolahan Data**

Data diperoleh dengan cara :

- a. Dilakukan pengujian efektivitas ekstrak bunga telang (*Clitoria ternatea*) dengan variasi konsentrasi 10-100% terhadap pertumbuhan jamur *Candida albicans*.
- b. Dilakukan pengukuran zona hambat dari masing-masing variasi konsentrasi dengan menggunakan alat ukur jangka sorong dalam satuan (mm).
- c. Data zona hambat yang diperoleh ditampilkan dalam bentuk tabel.

### **2. Analisa Data**

Data yang diperoleh berupa diameter zona hambat pada masing-masing variasi konsentrasi ekstrak bunga telang yang berbeda dianalisis menggunakan uji *One Way ANOVA*. Jika didapatkan hasil p-value <0,05 dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) dengan taraf kepercayaan 95% dan taraf kesalahan 5%.

## **G. Ethical Clearance (Persetujuan Etik)**

Penelitian ini dilakukan atas izin komisi etik melalui tahapan kaji etik oleh Komite Etik Poltekkes Tanjung Karang dengan keterangan layak etik nomor : No.097/KEPK-TJK/II/2023, pada tanggal : 9 Februari 2023.