

BAB III METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

Jenis dan desain penelitian ini eksperimen dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Variabel independen/bebas yaitu ekstrak daun pepaya (*Carica papaya L.*) dengan konsentrasi 20%, 40%, 60%, dan 80% dan kontrol positif ketokonazol. Variabel dependen/terikat yaitu pertumbuhan jamur *Candida albicans*. Kontrol negatif yang digunakan dalam penelitian ini yaitu aquadest steril dan kontrol positif menggunakan ketokonazol. Pada penelitian ini menggunakan metode difusi *Kirby-Bauer* dengan melihat zona hambat yang terbentuk. Pengulangan yang dilakukan sebanyak 4 kali, yang didapat dari perhitungan menggunakan rumus Federer yaitu $(t-1)(n-1) \geq 15$, perhitungan terdapat pada lampiran 1.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

Lokasi penelitian dilakukan di Laboratorium Parasitologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Politeknik Kesehatan Tanjungkarang. Proses determinasi tumbuhan dilakukan di Laboratorium Botani Fakultas MIPA Universitas Lampung, dan ekstraksi dilaksanakan di Laboratorium Kimia Fakultas MIPA Universitas Lampung pada bulan Maret-Mei 2023.

C. Subyek Penelitian

Subyek penelitian ini adalah daun pepaya tua dengan kondisi segar berwarna hijau. Daun pepaya tua kemudian dijadikan ekstrak lalu dibuat konsentrasi 20%, 40%, 60%, dan 80% yang digunakan sebagai larutan uji dalam menghambat 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 Ukur
1.	Variabel Bebas : Ekstrak daun pepaya (<i>Carica papaya L.</i>)	Daun pepaya (<i>Carica papaya L.</i>) dibuat simplisia setelah itu dibuat ekstraksi dengan etanol 96% dan dilakukan pengenceran 20%, 40%, 60%, dan 80%.	Ekstrak diencerkan dengan rumus $V_1 \times \%1 = V_2 \times \%2$	Pipet ukur	Ekstrak daun pepaya (<i>Carica papaya L.</i>) konsentrasi 20%, 40%, 60%, dan 80%.	Interval
2.	Variabel Bebas : Kontrol positif ketokonazole	Obat antijamur ketokonazol dengan dosis 200 mg	Mengukur diameter zona hambat dengan metode difusi cakram Kirby Bauer	Jangka sorong	Diameter zona hambat dalam (mm)	Rasio
3.	Variabel Terikat : Pertumbuhan jamur <i>Candida albicans</i>	Pertumbuhan jamur <i>Candida albicans</i> yang dihambat oleh ekstrak daun pepaya (<i>Carica papaya L.</i>)	Mengukur diameter zona hambat dengan metode difusi cakram 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 (Alfiah & Khotimah, 2015).	Ordinal

E. Pengumpulan Data

1. Prosedur Penelitian

- a. Pembuatan surat izin penelitian dari jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Tanjungkarang untuk dilakukan determinasi dan pembuatan ekstrak daun pepaya di Laboratorium Fakultas MIPA Universitas Lampung serta pemesanan strain jamur ke Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- b. Pengumpulan bahan-bahan yang dibutuhkan pada saat pemeriksaan yaitu strain jamur *Candida albicans*, media *Sabouroud Dextrose*

- Agar* (SDA), disk kosong, dan daun pepaya (*Carica papaya L.*) berasal dari Desa Tanjung Kemala Barat, Kecamatan Martapura.
- c. Determinasi bahan uji daun pepaya di Laboratorium Botani Fakultas MIPA Universitas Lampung.
 - d. Pembuatan simplisia daun pepaya.
 - e. Melakukan proses ekstraksi simplisia daun pepaya di Laboratorium Kimia Fakultas MIPA Universitas Lampung.
 - f. Pengenceran larutan uji menjadi konsentrasi 20%, 40%, 60%, dan 80%. Perhitungan pengenceran terdapat pada lampiran 2.
 - g. Pembuatan suspensi jamur *Candida albicans*.
 - h. Pengujian ekstrak daun pepaya (*Carica papaya L.*) sebagai antijamur terhadap pertumbuhan jamur *Candida albicans* menggunakan metode difusi agar cakram *Kirby Bauer*, mengamati zona hambat yang terbentuk pada masing-masing konsentrasi lalu diukur menggunakan jangka sorong dengan satuan mm.
2. Metode Pemeriksaan
- Difusi agar cakram dengan cara *Kirby Bauer*
3. Pinsip Pemeriksaan
- Disk yang mengandung antijamur ditempatkan di atas media yang sudah diberi organisme uji, kemudian diinkubasi. selanjutnya hasil dibaca berdasarkan kemampuan penghambatan organisme uji di sekitar kertas cakram. Terbentuknya zona jernih di sekitar cakram ialah indikasi penghambatan antijamur terhadap pertumbuhan organisme uji (Yusmaniar & Wardiah, 2017).
4. Prosedur Kerja
- a. Persiapan alat dan bahan pemeriksaan

Alat yang digunakan yaitu *autoclave*, neraca analitik elektrik, beaker glass 100 ml, lidi kapas steril, wadah sampel, pinset, pipet ukur, *vacump pump*, *disk blank*, tabung reaksi, rak tabung reaksi, erlenmeyer, lampu spirtus, pipet ukur, botol gelap, alumunium foil, jangka sorong, hot plate, corong glass, evaporator, objek glass, ose, latar belakang hitam, plate, kertas kopi, oven, *vortex mixer*, corong

gelas, inkubator dan *handscoon*.

Bahan yang digunakan yaitu NaCl 0,85%, ketokonazol aquadest steril, standar Mc Farland 0,5, media *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA), kloramfenikol, daun pepaya (*Carica papaya L.*) dan strain murni *Candida albicans*.

- b. Identifikasi bahan uji daun pepaya (*Carica papaya L.*) di Laboratorium Botani Fakultas MIPA Universitas Lampung.
- c. Pengujian ekstrak daun pepaya (*Carica papaya L.*) terhadap pertumbuhan jamur *Candida albicans* dengan cara kerja yaitu:

- 1) Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat-alat gelas disterilisasi dengan oven menggunakan suhu 160° selama 2 jam. Untuk sterilisasi media dan lidi kapas, sterilkan dengan *autoclave* tekanan 1 atm pada suhu 121°C dengan waktu 15 menit (Putri & Sukini, 2017).

- 2) Pembuatan Larutan Kloramfenikol

Kloramfenikol dengan dosis 400 mg dilarutkan dalam 1000 mL media *Saboraud Dextrose Agar* (SDA). Untuk dosis 250 mg, kloramfenikol dilarutkan dalam 10 ml NaCl 0,85%, menurut perhitungan, dibutuhkan 16 ml NaCl 0,85% untuk melarutkan 400 mg kloramfenikol (Soemarno, 2000).

- 3) Pembuatan Larutan Standar Mc Farland 0,5

Larutan H₂SO₄ 1% sebanyak 9,95 ml dicampurkan dengan 0,05 ml larutan BaCl₂ 1% sehingga volume menjadi 10 ml. Selanjutnya divortex hingga tercampur (Rosmania & Yanti, 2020).

- 4) Pembuatan NaCl 0,85%

NaCl sebanyak 0,85 gram ditimbang kemudian dilarutkan dalam aquadest steril sebanyak 100 ml kemudian dihomogenkan (Suhartati & Virgianti, 2015).

- 5) Pembuatan Media Agar *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA)

Berdasarkan petunjuk pembuatan yang tertera pada botol media, pembuatan media *Sabouraud Dextrose Agar* yaitu

65 gram serbuk dalam 1000 ml aquadest dikalikan dengan volume yang dibutuhkan. Setelah itu ditimbang dan dilarutkan diatas hotplate sampai larut sempurna. Lalu disterilisasi di *autoclave* selama 15 menit dengan tekanan 1 atm (121°C). Lalu didinginkan hingga suhu 50°C, kemudian ditambahkan dengan kloramfenikol. Sesudahnya media dituang ke dalam cawan petri steril dengan ketebalan kurang lebih 4 mm lalu biarkan mengeras (Soemarno, 2000).

6) Identifikasi Jamur *Candida albicans*

a) Pemeriksaan Makroskopis

Candida albicans diinokulasikan pada media *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA), setelah itu diinkubasi pada suhu 37°C dengan waktu 24 jam sampai dengan 72 jam. Kemudian koloni jamur *Candida albicans* yang tumbuh diamati.

Interpretasi hasil :

Koloni berwarna putih krim, bentuk koloni agak bulat rata dan berbau ragi (Putri & Sukini, 2017).

b) Pemeriksaan Mikroskopis (Pewarnaan Gram)

1) Diambil koloni jamur biakan media SDA yang sudah ditanam sebelumnya, lalu letakkan di kaca objek, kemudian dibuat preparat dan ditambah 1 tetes NaCl 0,85%, dihomogenkan kemudian difiksasi diatas lampu busen.

2) Diletakkan objek glass pada rak pengecatan, lalu lakukan pewarnaan gram. Ditetaskan gram A didiamkan selama 1 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir. Ditetaskan gram B lalu didiamkan selama 1 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir. Ditetaskan gram C lalu didiamkan selama 30 detik kemudian bilas dengan air mengalir. Tetaskan gram D lalu didiamkan

selama 1 menit, kemudian dibilas dengan air yang mengalir.

- 3) Dikeringkan lalu diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x dan 1000x (Putri & Sukini, 2017).

Interpretasi hasil :

Candida albicans pada perwarnaan gram menyerap warna ungu, gram positif, bentuknya oval, dan terdapat budding (Susanti, 2016).

c) Pemeriksaan Germ Tube

- 1) Koloni *Candida albicans* dimasukkan ke dalam tabung yang berisi 1 ml putih telur hangat. Kemudian dihomogenkan perlahan sehingga koloni *Candida* tercampur.
- 2) Kemudian tabung biakan ditutup dengan kapas lemak lalu inkubasi di suhu 37°C dengan waktu 2-3 jam.
- 3) Sesudah diinkubasi suspensi putih telur, diambil menggunakan ose bulat lalu diletakkan diatas kaca objek dan ditutup dengan cover glass.
- 4) Lalu diperiksa dimikroskop perbesaran 100x dan 400x (Mulyati & Jannah, 2019).

Interpretasi hasil :

Terlihat pertumbuhan hifa seperti kecambah yang berbentuk raket (Mulyati & Jannah, 2019).

7) Pembuatan Suspensi Jamur *Candida albicans*

Diambil 1 ujung ose jamur *Candida albicans* lalu dimasukkan ke tabung reaksi yang berisi larutan NaCl 0,85%, lalu homogen menggunakan *vortex mixer* sampai kekeruhannya sama dengan standar Mc Farland 0,5 (Soemarno, 2000).

8) Pembuatan Larutan Kontrol Positif

Dihaluskan bobot ketokonazol dengan dosis 200 mg kemudian ditambahkan dengan aquadest steril sebanyak 10 ml lalu dihomogenkan (Alfiah & Khotimah, 2015).

9) Pembuatan Larutan Uji Ekstrak Daun Pepaya (*Carica papaya L.*)

a) Identifikasi bahan uji daun pepaya (*Carica papaya L.*) di Laboratorium Botani Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Lampung.

b) Pembuatan Simplisia

Sampel daun pepaya sebanyak 5kg yang segar dan berwarna hijau tua di cuci bersih menggunakan air yang mengalir. Lalu daun pepaya dipotong-potong, Kemudian jemur secara tidak langsung di bawah sinar matahari dengan ditutup kain hitam hingga kering. Simplisia diblender sampai halus menjadi serbuk (Gunawan & Didik, 2004). Lalu diayak supaya didapati simplisia halus, kemudian ditimbang 600 gram lalu disimpan di tempat wadah yang kering.

c) Pembuatan Ekstrak Daun Pepaya

Simplisia yang sudah dihaluskan ditempatkan dalam wadah, tambahkan 1000 mL etanol 96%, dicampur dengan batang pengaduk dan diamkan selama 3 hari. Ekstrak disaring menggunakan penyaring. Filtrat I diperoleh lalu tampung ke botol dan ampas I ditambahkan 1000 mL lagi etanol 96%, kemudian dicampur menggunakan batang pengaduk kemudian dibiarkan hingga tiga malam. Setelah itu saring ekstrak menggunakan kertas saring sehingga filtrat II diperoleh. Kemudian dilakukan proses yang sama sampai filtrat III diperoleh. Semua filtrat yang didapatkan dari proses maserasi I, II, III digabung kemudian disaring serta dipekatkan menggunakan alat *Vacum Rotary Evaporator* dengan suhu 40°C sampai didapatkan ekstrak kental. Lalu dilakukan pengenceran ekstrak dengan konsentrasi 20%, 40%, 60%, dan

80% dari larutan induk dengan rumus pengenceran (Manu, 2013).

10) Pelaksanaan Uji Daya Hambat

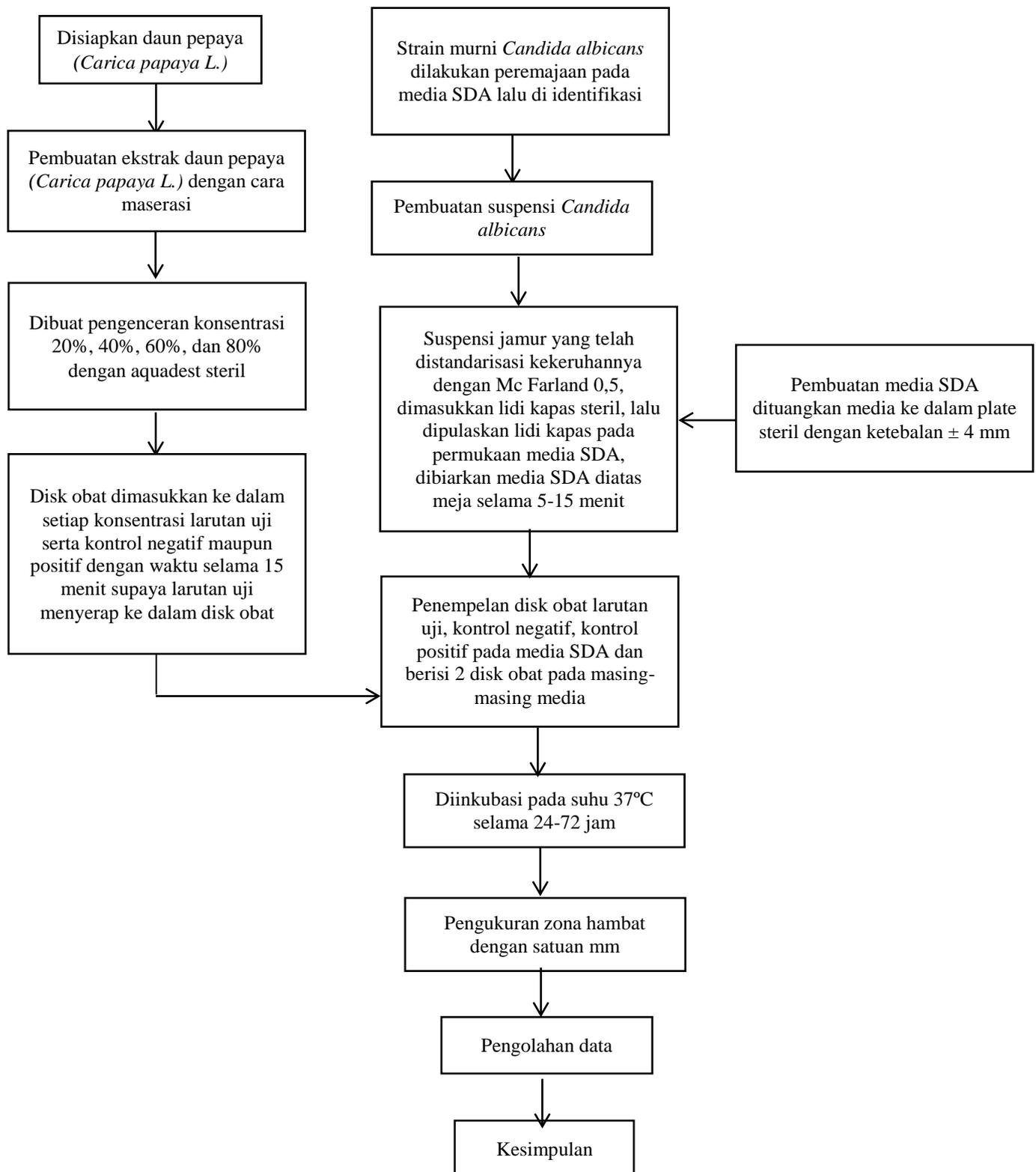
- a) Disiapkan media agar *Saboraud Dextrose Agar* (SDA) yang sudah mengeras.
- b) Dimasukkan lidi kapas steril kedalam suspensi jamur *Candida albicans* yang kekeruhannya sudah sebanding dengan standar Mc Farland 0,5, tunggu beberapa saat sehingga suspensi jamur *Candida albicans* meresap ke dalam kapas, lalu lidi kapas diangkat dan diperas ke dalam dinding tabung dengan cara menekannya sambil diputar.
- c) Dipulaskan lidi kapas secara merata ke permukaan media *Saboraud Dextrose Agar* (SDA) hingga semua permukaan tertutup rapat dengan pulasan.
- d) Dibiarkan media *Saboraud Dextrose Agar* (SDA) diatas meja dengan waktu 15 menit sehingga suspensi jamur *Candida albicans* terserap ke dalam media.
- e) Disk kosong yang steril direndam ekstrak daun pepaya, kontrol positif serta kontrol negatif masing-masing 15 menit.
- f) Dilakukan penempelan disk di atas permukaan media SDA dengan pinset dan sedikit tekan agar disk tertempel di media dan diletakkan 2 kertas cakram pada masing-masing media menggunakan jarak antar kertas cakram yaitu kurang lebih 15 mm.
- g) Inkubasi media pada suhu 37°C dengan waktu 24-72 jam (Jawetz & Melnick, 2016).
- h) Zona jernih yang terbentuk disekitar disk diukur menggunakan jangka sorong sebagai diameter daya hambat ekstrak daun pepaya (*Carica papaya L.*) terhadap pertumbuhan jamur *Candida albicans*. Pengukuran diameter zona hambat menggunakan alas atau latar belakang yang berwarna gelap (Soemarno, 2000).

i) Interpretasi hasil pengukuran diameter zona hambat yaitu :

Tabel 3.2 Kategori Diameter Zona Hambat (Alfiah & Khotimah, 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. Analisa Data

Data berupa diameter zona hambat pada masing-masing konsentrasi ekstrak daun pepaya (*Carica papaya L.*) dianalisis menggunakan uji ANOVA (Analysis Of Variance) apabila 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. Penelitian ini tidak akan menyebabkan bahaya untuk lingkungan, sebab limbah yang dihasilkan selama proses penelitian ini dikumpulkan dan dibuang di tempat pengolahan limbah. Limbah larutan uji ekstrak daun pepaya ditangani segera dengan cara dibuang ke saluran pembuangan, karena limbah tersebut aman dan tidak berbahaya bagi lingkungan. Limbah media plate beserta limbah suspensi jamur *Candida albicans* dihancurkan dengan cara direbus selama 30 menit dengan suhu 100°C , lalu air bekas rebusan dibuang dengan penambahan detergen di saluran pembuangan. Kemudian tabung beserta plate yang telah digunakan dicuci dengan menambahkan sabun serta dibilas menggunakan air mengalir.