

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 daun sirsak (*Annona muricata L*) dengan konsentrasi yang digunakan 10%, 30%, 50%, 70%, 90%, dan 100% dan variabel terikat berupa daya hambat pertumbuhan jamur *Candida albicans*. Pemeriksaan ini menggunakan metode difusi cakram (*Kirby Bauer*) dengan mengamati zona hambat yang terbentuk. Ketokonazol digunakan sebagai kontrol positif sedangkan aquades steril digunakan sebagai kontrol negatif. 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 perlakuan

n = jumlah pengulangan.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

Proses ekstraksi daun sirsak (*Annona muricata L*) dilakukan di Laboratorium Botani Jurusan Biologi FMIPA Universitas Lampung. Pembuatan media Sabourad Dextrose Agar (SDA) dan pemeriksaan uji daya hambat daun sirsak (*Annona muricata L*) terhadap jamur *Candida albicans* dilakukan di Laboratorium Parasitologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang. Penelitian dilaksanakan pada bulan Mei 2024.

C. Subyek Penelitian

Daun sirsak (*Annona muricata L*) yang digunakan yaitu daun sirsak muda yang masih segar dan berwarna hijau yang diambil pada usia panen tersebut zat-zat metabolit dalam daun masih optimal (Wahyuningsih dan Wiryosoendjoyo, 2019). Daun sirsak (*Annona muricata L*) kemudian dijadikan ekstrak lalu dibuat variasi konsentrasi 10%, 30%, 50%, 70%, 90%, dan 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

Variabel	Definisi	Cara Ukur	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
Variabel bebas: Ekstrak daun sirsak (<i>Annona muricata L</i>)	Daun sirsak (<i>Annona muricata L</i>) yang diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96% lalu ekstrak hasil maserasi diencerkan konsentrasi 10%, 30%, 50%, 70%, 90%, 100%.	Ekstrak diencerkan dengan rumus $V_1X\%_1=V_2X\%_2$	Pipet Ukur	Persen (%)	Interval
Variabel terikat: Daya hambat jamur <i>Candida albicans</i> .	Pertumbuhan jamur <i>Candida albicans</i> yang dihambat oleh ekstrak daun sirsak (<i>Annona muricata L</i>)	Pengukuran zona hambat	Jangka sorong	Diameter zona hambat dalam katagori: 1. <5 mm daya hambat lemah 2. 5-10 mm daya hambat sedang 3. 10-20 mm daya hambat kuat 4. >20 mm daya hambat sangat kuat (Davis & Stout, 1971).	Ordinal

E. Pengumpulan Data

1. Prosedur Penelitian

- a. Pembuatan surat izin pada Direktur Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang untuk melakukan uji determinasi, pembuatan ekstrak daun sirsak (*Annona muricata L*) pada Laboratorium Botani Jurusan Biologi FMIPA Universitas Lampung dan pemesanan strain jamur ke UPTD Balai Laboratorium Kesehatan Bandar Lampung.
- b. Pengumpulan bahan-bahan pemeriksaan seperti strain jamur *Candida albicans*, media SDA, disk kosong, dan daun sirsak (*Annona muricata L*).
- c. Identifikasi sampel determinasi bahan uji daun sirsak di Laboratorium Botani Jurusan Biologi FMIPA Universitas Lampung.
- d. pembuatan simplisia daun sirsak (*Annona muricata L*).
- e. Ekstraksi simplisia daun sirsak (*Annona muricata L*) di Laboratorium Botani Jurusan Biologi FMIPA Universitas Lampung.
- f. Pengenceran larutan uji menjadi konsentrasi 10%, 30%, 50%, 70%, 90%, 100% dilakukan di Laboratorium Parasitologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang.
- g. Pembuatan suspensi jamur *Candida albicans*.
- h. Pengujian ekstrak daun sirsak (*Annona muricata L*) 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 (Japar dkk, 2022).

3. Prinsip pemeriksaan

Cakram kertas yang mengandung bahan antimikroba diletakkan diatas permukaan media padat yang telah diinokulasikan pada permukaan organisme uji. Setelah diinkubasi, ukuran zona hambat sekitar cakram tergantung pada sensitivitas organisme terhadap agen antimikroba (Jawetz dkk, 2008).

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, Vacuum pump, Lampu spiritus, Pipet Ukur, Ose, Kapas, Lidi kapas steril, Botol gelap, Kertas kopi, Aluminium 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), Daun sirsak (*Annona muricata L*), Etanol 96%, Larutan kloramfenikol, ketokonazol, dan Strain jamur *Candida albicans*.
- b. Determinasi bahan uji tumbuhan daun sirsak (*Annona muricata L*) dilakukan untuk memastikan tumbuhan yang akan digunakan jelas. Bahan uji daun sirsak (*Annona muricata L*) dideterminasi di Laboratorium Botani Jurusan Biologi FMIPA Universitas Lampung.
- c. Pembuatan Simplisia di Laboratorium Botani Jurusan Biologi FMIPA Universitas Lampung
- Diambil daun sirsak sebanyak 3 kg kemudian sampel dipilih dengan kondisi daun yang baik yaitu daun muda yang berwarna hijau dan segar, kemudian dicuci dengan air mengalir dan ditiriskan. Daun sirsak dikeringkan dengan cara ditutup dengan kain hitam di bawah sinar matahari secara langsung sampai daun mengering. Simplisia yang sudah selesai dikeringkan lalu dihaluskan dengan menggunakan blender dan disimpan dalam wadah yang kering dan tertutup (Indriyati & Rosalina 2020).
- d. Pembuatan Ekstrak daun sirsak di Laboratorium Botani Jurusan Biologi FMIPA Universitas Lampung
- 1) Dimasukkan simplisia yang sudah dihaluskan ke dalam botol gelap kemudian tambahkan 2000 ml etanol 96% dan diamkan selama 3 hari di tempat yang tidak terkena cahaya secara langsung, kemudian aduk 2-3 kali sehari. Kemudian lakukan pemisahan antara filtrat dengan presipitat menggunakan kertas saring.
 - 2) Presipitat kembali direndam dalam 2000 ml etanol 96%, diaduk kembali lalu didiamkan selama 3 malam. Kemudian dipisahkan kembali antara filtrat dengan presipitat menggunakan kertas saring.

- 3) Presipitat dari ke-2 dilakukan hal yang sama seperti sebelumnya.
- 4) Kemudian presipitat 1,2,3 dicampurkan dan diuapkan dengan alat evaporator sampai di dapat ekstrak kental, ekstrak diuapkan kembali di atas hotplate. Setelah itu lakukan pengulangan untuk memastikan bahwa ekstrak sudah tidak mengandung pelarut lagi. Ekstrak kemudian disimpan dalam wadah yang berbahan gelas yang bersih, kering, dan steril. Kemudian lakukan pengenceran dengan konsentrasi 10%, 30%, 50%, 70%, 90%, dan 100% (Indrayati & Rosalina, 2020). 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 (%)

- e. Pengujian Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata L*) terhadap Pertumbuhan Jamur *Candida albicans* dilakukan di Laboratorium Parasitologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang dengan prosedur kerja sebagai berikut :

- 1) Sterilisasi Alat

Alat-alat gelas yang digunakan dalam dibersihkan dan dikeringkan terlebih dahulu, kemudian dibungkus dengan kertas kopi. Kemudian disterilkan menggunakan oven pada suhu 160°C selama 60 menit.

- 2) Pembuatan NaCl 0,85% (Soemarno, 2000).

Ditimbang 0,85 gram NaCl, kemudian dilarutkan dalam 100 ml aquadest steril lalu dihomogenkan (Soemarno, 2000).

- 3) Pembuatan Larutan Kloramfenikol

Setiap 1000 ml Saboraud Dextrose Agar (SDA) memerlukan 400 mg kloramfenikol, setiap 250 mg kloramfenikol dilarutkan dalam 10 ml NaCl 0,85%, dengan perhitungan $\frac{400 \square\square}{250 \square\square} \times 10 \text{ ml} = 16 \text{ ml}$ (Soemarno, 2000)

- 4) Pembuatan Media Agar dari Saboraud Dextrose Agar (SDA)

Saboraud Dextrose Agar (SDA) merupakan media yang digunakan untuk

isolasi, kultur, dan pemeliharaan jamur. Adanya kloramfenikol menghambat sebagian besar kontaminan terhadap bakteri. Prosedur pembuatan SDA: Sebanyak 20 gram medium disuspensikan ke dalam 300 ml aquadest, kemudian diaduk dan dipanaskan sampai mendidih selama 1 menit agar tercampur. Setelah larut, ditambahkan larutan kloramfenikol, 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 20 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 (H₂SO₄) 1% dengan 0,05 ml larutan Barium chloride dihydrate (BaCl 2.2H₂O) 1% sehingga total volume menjadi 10 ml, dikocok sampai 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) Kemudian itu koloni jamur yang terpisah pada media SDA diambil, lalu diletakkan pada permukaan objek glass, setelah itu 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 di bawah mikroskop dengan

perbesaran 10x kemudian dilanjutkan dengan perbesaran 40x (Soemarno, 2000).

(Uji Germ Tube)

- a) Dimasukkan 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 ± 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%, lalu homogenkan dengan alat mixer vortex sampai didapatkan kekeruhan yang sesuai 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% (Ornay dkk, 2017).

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.

10) Pelaksanaan Uji Daya Hambat

- a) Disiapkan medium agar Sabouraud Dextrose Agar (SDA) yang sudah mengeras dari dalam kulkas.
- b) Celupkan lidi kapas yang telah steril ke dalam suspensi jamur *Candida*

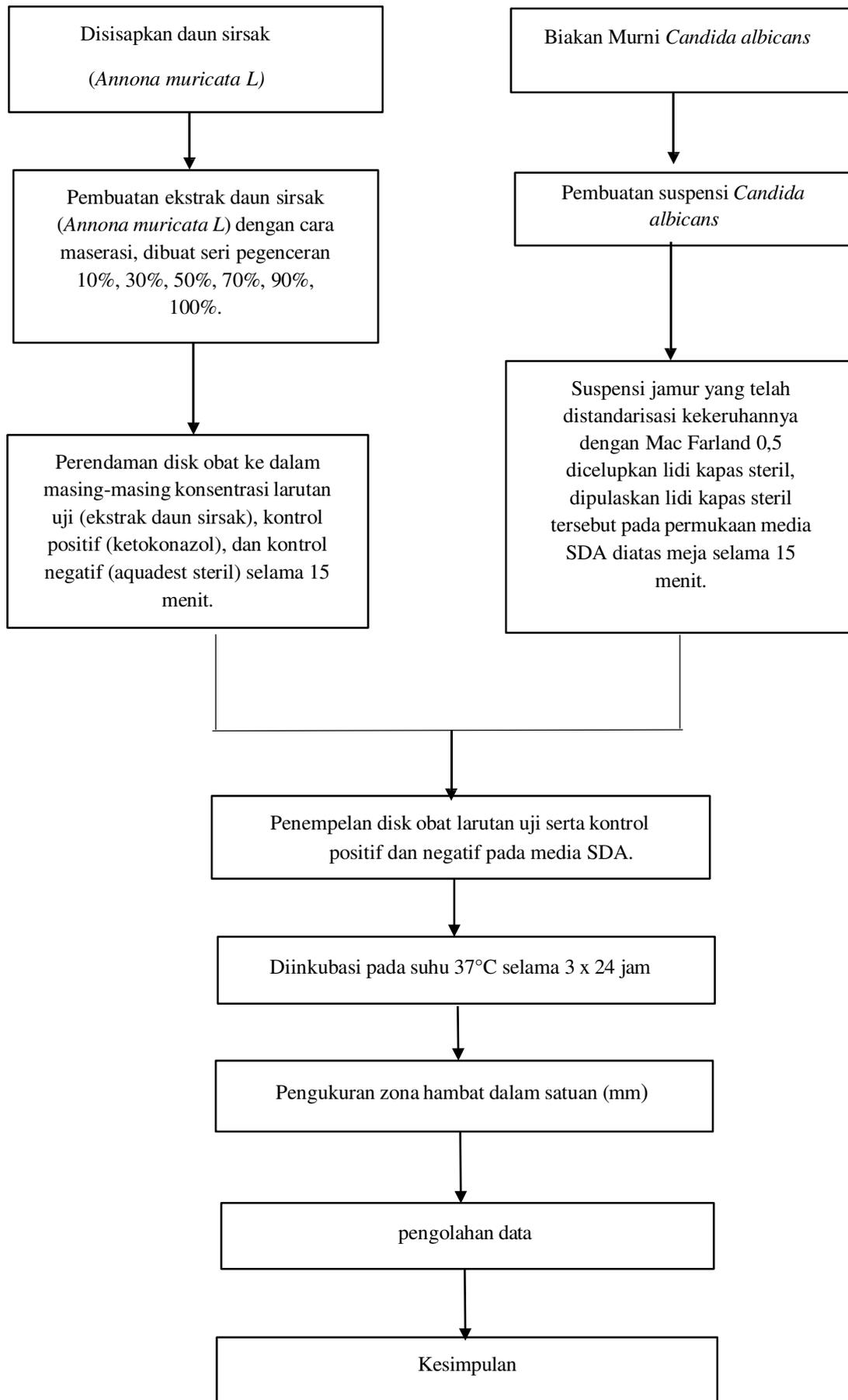
albicans yang kekeruhannya sudah dibandingkan dengan larutan standar Mc Farland 0,5, tunggu beberapa saat hingga suspensi jamur *Candida albicans* meresap ke dalam kapas, lalu angkat swab dan ditekan sambil memutar dinding bagian dalam tabung.

- c) Dioleskan lidi kapas tadi pada permukaan substrat SDA terlebih dahulu hingga permukaan tertutup rapat dengan pulasan suspensi.
- d) Dibiarkan 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 daun sirsak, kontrol positif, dan kontrol negatif dengan waktu masing-masing 15 menit.
- f) Dengan menggunakan pinset yang telah steril, diletakkan disk obat yang sudah direndam larutan uji ekstrak daun sirsak diatas permukaan medium SDA, tekan dengan perlahan agar cakram obat menempel pada medium SDA dengan jarak ± 15 mm antar cakram obat.
- g) Inkubasi media SDA tersebut pada suhu 37°C selama 3×24 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 seperti pada Tabel 3.2 dibawah ini.

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

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

5. Alur Penelitian



F. Pengolahan dan Analisis Data

1. Pengolahan Data

Data diperoleh dengan cara :

- a. Dilakukan pengujian uji daya hambat ekstrak daun sirsak (*Annona muricata L*) dengan variasi konsentrasi 10%, 30%, 50%, 70%, 90%, 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. Analisis Data

Data yang diperoleh berupa diameter zona hambat pada masing- masing variasi konsentrasi ekstrak daun sirsak yang berbeda dianalisis menggunakan uji One Way Anova. Jika didapatkan hasil p-value = 0,000 (<0,05) dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) dengan taraf kepercayaan 95% dan taraf kesalahan 5%.

G. Ethical Clearance

Penelitian ini dilaksanakan berdasarkan atas izin etik, Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang No.341/KEPK-TJK/III/2024, pada tanggal : 19 Maret 2024. penelitian tidak akan memicu gangguan terhadap lingkungan, pada kegiatan penelitian limbah yang diperoleh akan disatukan lalu diolah dengan penanganan limbah. Pada penanganan limbah media plate serta suspensi jamur *Candida albicans* dalam tabung dibersihkan dengan melakukan perebusan dengan suhu 100°C waktu 30 menit, kemudian plate serta tabung dibersihkan dengan menggunakan sabun pada air mengalir dan limbah larutan uji ekstrak daun sirsak yang telah dilakukan pemeriksaan dibuang ke dalam saluran pembuangan, pada limbah tersebut tidak membahayakan lingkungan.