

BAB III METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

Jenis dan desain penelitian ini eksperimen menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Terdapat dua variabel yang digunakan yaitu variabel independent/bebas yaitu ekstrak rumput laut *Sargassum sp.* dengan konsentrasi 15%, 30%, 45%, 60%, 75% dan variabel dependent/terikat yaitu pertumbuhan jamur *Candida albicans*.

Pemeriksaan ini menggunakan metode difusi cakram *Kirby Bauer* dengan melihat zona hambat yang terbentuk. Kontrol positif yang digunakan dalam penelitian ini adalah ketokonazol dan untuk kontrol negatif menggunakan aquadest steril. Pengulangan dilakukan sebanyak 5 kali yang didapat dari perhitungan menggunakan rumus Freederer yaitu $(t-1)(n-1) > 15$.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

Proses ekstraksi rumput laut *Sargassum sp.* dilakukan di Laboratorium Terpadu Fakultas MIPA Universitas Lampung, pembuatan media Saboraud Dextrose Agar (SDA) dilakukan di Laboratorium Bakteriologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Tanjungkarang dan pemeriksaan uji daya hambat ekstrak rumput laut *Sargassum sp.* terhadap jamur *Candida albicans* dilakukan di Laboratorium Mikologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Tanjungkarang pada bulan Februari sampai dengan April 2022.

C. Subjek Penelitian

Subjek penelitian ini adalah rumput laut *Sargassum sp.* yang diambil di Pantai Desa Merak Belantung Kecamatan Kalianda Lampung Selatan. Rumput laut *Sargassum sp.* yang diambil dengan karakteristik segar dan berwarna coklat. *Sargassum sp.* dijadikan ekstrak dengan pelarut etanol 96%, kemudian diencerkan dengan konsentrasi 15%, 30%, 45%, 60%, 75% 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.	Variabel bebas : Ekstrak rumput laut <i>Sargassum sp.</i>	Rumput laut <i>Sargassum sp.</i> yang di ekstraksi menggunakan pelarut etanol 96% lalu ekstrak hasil maserasi diencerkan 15%, 30%, 45%, 60%, 75%. (Sumber : Triasti dkk, 2015).	Ekstrak diencerkan dengan rumus $V_1 \times \%_1 = V_2 \times \%_2$	Pipet ukur	Ekstark rumput laut <i>Sargassum sp.</i> konsnetrasi 15%, 30%, 45%, 60%, 75%	Interval
2.	Variabel terikat : Pertumbuhan jamur <i>Candida albicans</i>	Pertumbuhan jamur <i>Candida albicans</i> yang dihambat oleh ekstrak rumput laut <i>Sargassum sp.</i>	Mengukur diameter zona hambat yang terbentuk dengan metode difusi 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 daya hambat sangat kuat. (Ardiansyah, 2005).	Ordinal

E. Pengumpulan Data

1. Prosedur Penelitian
 - a) Pengajuan permohonan izin dari Direktur Poltekkes Tanjungkarang untuk dilakukan determinasi dan pembuatan ekstrak rumput laut *Sargassum sp.* di Laboratorium Fakultas MIPA Universitas Lampung dan pemesanan strain jamur ke Laboratorium Klinik Universitas Indonesia.
 - b) Pengumpulan bahan-bahan pemeriksaan seperti strain jamur *Candida albicans*, media SDA, disk kosong dan rumput laut *Sargassum sp.*
 - c) Determinasi bahan uji rumput laut *Sargassum sp.* di Laboratorium Terpadu Fakultas MIPA Universitas Lampung.
 - d) Pembuatan simplisia rumput laut *Sargassum sp.*
 - e) Ekstraksi simplisia rumput laut *Sargassum sp.* di Laboratorium Terpadu Fakultas MIPA Universitas Lampung.

- f) Pengenceran larutan uji menjadi konsentrasi 15%, 30%, 45%, 60%, 75% dilakukan di Laboratorium Mikologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Tanjungkarang.
 - g) Pembuatan suspensi jamur *Candida albicans*.
 - h) Pengujian ekstrak rumput laut *Sargassum sp.* terhadap pertumbuhan jamur *Candida albicans* dan pengamatan zona hambat yang terbentuk pada masing-masing konsentrasi dan diukur dengan jangka sorong dalam satuan mm dilakukan di Laboratorium Mikologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Tanjungkarang.
2. Metode Pemeriksaan
- Difusi cakram dengan cara *Kirby Bauer*.
3. Prinsip Pemeriksaan
- Cakram kertas yang mengandung sejumlah obat tertentu diletakkan diatas permukaan media padat yang telah diinokulasikan pada permukaan organisme uji. Setelah diinkubasi, diameter zona hambat sekitar cakram diukur sebagai ukuran kekuatan daya hambat obat melawan organisme uji tertentu (Jawetz dkk, 2008).
4. Prosedur Kerja
- a. Persiapan alat dan bahan pemeriksaan
 - 1) Alat : cawan petri, gelas ukur 100 ml, Erlenmeyer 100 ml, neraca analitik, incubator, autoklaf, pipet ukur 5ml, 10 ml, 25 ml, 50ml, karet penghisap, disk cakram steril, pinset, lidi kapas steril, kapas, botol gelap, kertas kopi, aluminium foil, hotplate, gelas objek, mixer vortex, thermometer, waterbath, korek api, oven, evaporator, corong gelas, tabung reaksi, lampu spiritus, ose dan jangka sorong.
 - 2) Bahan : aqudest steril, NaCl 0,85%, standar Mc. Farland 0,5, kloramfenikol, ketokonazol, rumput laut *Sargassum sp.*, media Sabouraud Dextrose Agar (SDA), dan strain jamur *Candida albicans*.
 - b. Identifikasi bahan uji rumput laut *Sargassum sp.* di Laboratorium Botani Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Lampung.
 - c. Pengujian ekstrak rumput laut *Sargassum sp.* terhadap pertumbuhan jamur *Candida albicans* dengan prosedur kerja sebagai berikut :

1) Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat gelas yang digunakan dalam penelitian ini dibersihkan dan dikeringkan terlebih dahulu, kemudian dibungkus menggunakan kertas kopi. Lalu disterilkan menggunakan oven pada suhu 160°C selama 60 menit. Seluruh media, lidi kapas disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm (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%, dengan perhitungan $\frac{400\text{ mg}}{250\text{ mg}} \times 10\text{ ml} = 16\text{ ml}$. maka untuk melarutkan 400 mg kloramfenikol diperlukan NaCl 0,85% sebanyak 16 ml (Soemarno, 2000).

3) Pembuatan Larutan Standar Mc. Farland 0,5

Dicampurkan 9,95 ml larutan H_2SO_4 1% dengan 0,05 ml larutan $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1% sehingga menjadi 10 ml, dikocok hingga homogen (Soemarno, 2000).

4) Pembuatan NaCl 0,85%

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

5) Pembuatan Media Agar dari Saboraud Dextrose Agar (SDA)

Pembuatan media dilakukan berdasarkan petunjuk pembuatan pada botol media yaitu 65 gram serbuk media Saboraud Dextrose Agar dalam 1000 ml aquadest dikalikan dengan volume yang dibutuhkan. Lalu ditimbang, diaduk dan dipanaskan diatas hotplate sampai larut sempurna. Kemudian, media disterilisasi di autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm. Kemudian didinginkan sampai mencapai suhu 50°C , ditambahkan larutan kloramfenikol. Setelah itu media dituang kedalam cawan petri yang telah disterilisasi dengan ketebalan $\pm 4\text{ mm}$ dan biarkan mengeras (Soemarno, 2000).

6) Uji Sterilisasi Media

Media yang telah dibuat, diambil beberapa plate kemudian diinkubasi pada suhu 35-37°C selama 2 hari. Apabila terdapat pertumbuhan 2 koloni per plate, maka dianggap tidak steril (Soemarno, 2000).

7) Identifikasi Jamur *Candida albicans*

a) Pemeriksaan Makroskopis

Ditanam jamur *Candida albicans* pada media SDA, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 2x24 jam lalu diamati koloni jamur *Candida albicans* yang tumbuh.

Interpretasi hasil :

Candida albicans pada media SDA didapatkan koloni berwarna putih dengan permukaan licin, menonjol disertai bau khas ragi (Siregar, 2004).

b) Pemeriksaan Mikroskopis

(1) Diambil koloni jamur biakan media SDA yang telah ditanam sebelumnya, kemudian diletakkan pada permukaan objek glass, dibuat preparat dan ditambah NaCl 0,85%, lalu dihomogenkan dan difiksasi.

(2) Diletakkan objek glass pada rak cat, kemudian dilakukan pengecatan gram. Diteteskan Gram A didiamkan selama 1 menit, lalu dibilas dengan air mengalir. Diteteskan Gram B didiamkan selama 1 menit, lalu dibilas dengan air mengalir. Diteteskan Gram C didiamkan selama 30 detik, lalu dibilas dengan air mengalir. Diteteskan Gram D didiamkan selama 1 menit, lalu dibilas dengan air mengalir.

(3) Keringkan dan diamati dengan mikroskop perbesaran 40x dan 100x (Yusmaniar dkk, 2017).

Interpretasi Hasil:

Candida albicans pada pewarnaan gram menyerap warna ungu bersifat Gram positif dan memiliki bentuk bulat lonjong (Siregar, 2004).

8) Pembuatan Suspensi Jamur *Candida albicans*

Koloni jamur *Candida albicans* diambil 1 ujung ose dan disuspensikan ke dalam larutan NaCl 0,85% pada tabung reaksi, kemudian dihomogenkan dengan alat mixer vortex hingga kekeruhannya sama dengan standar Mc.

Farland 0,5. Koloni jamur yang telah dibuat suspensi dibandingkan dengan tabung reaksi yang berisi kekeruhan Mc. Farland 0,5 (Carter dkk, 1990).

9) Pembuatan Larutan Kontrol Positif

Dihaluskan 200 mg obat ketokonazol lalu ditambahkan dengan 10 ml alkohol 96% dan dihomogenkan (Alfiah, 2015).

10) Pembuatan Larutan Uji Ekstrak Rumput Laut *Sargassum sp.*

a) Identifikasi bahan uji rumput laut *Sargassum sp.* di Laboratorium Botani Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Lampung.

b) Pembuatan Simplisia

Sampel rumput laut *Sargassum sp.* sebanyak 6 kg diambil dalam kondisi yang segar dan berwarna cokelat, kemudian dicuci dengan air mengalir dan ditiriskan. Rumpu laut *Sargassum sp.* dipotong kecil-kecil dan dikeringkan (pengeringan dilakukan secara tidak langsung menggunakan wadah yang ditutup dengan kain hitam atau gelap) hal ini dilakukan karena sinar ultra violet dari matahari dapat menimbulkan kerusakan pada kandungan kimia bahan yang dikeringkan (Katno, 2008). Simplisia yang telah kering dihaluskan dengan cara diblender, kemudian diayak agar didapatkan simplisia yang halus, lalu ditimbang 600 gram dan disimpan dalam wadah yang kering.

c) Pembuatan Ekstrak Rumput Laut *Sargassum sp.*

Simplisia yang telah dihaluskan dimasukkan kedalam wadah lalu ditambahkan etanol 96% sebanyak 2000 ml dan diaduk menggunakan batang pengaduk lalu didiamkan selama 3 hari. Ekstrak disaring dengan penyaring. Diperoleh filtrat I, ditampung dalam botol dan ampas I ditambah etanol 96% 2000 mL lagi, diaduk dengan batang pengaduk lalu diamkan selama tiga malam. Kemudian ekstrak 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 hingga diperoleh ekstrak kental, Kemudian dilakukan pengenceran ekstrak dengan konsentrasi 15%, 30%, 45%, 60%, 75% dari larutan induk menggunakan rumus pengenceran (Manu, 2013).

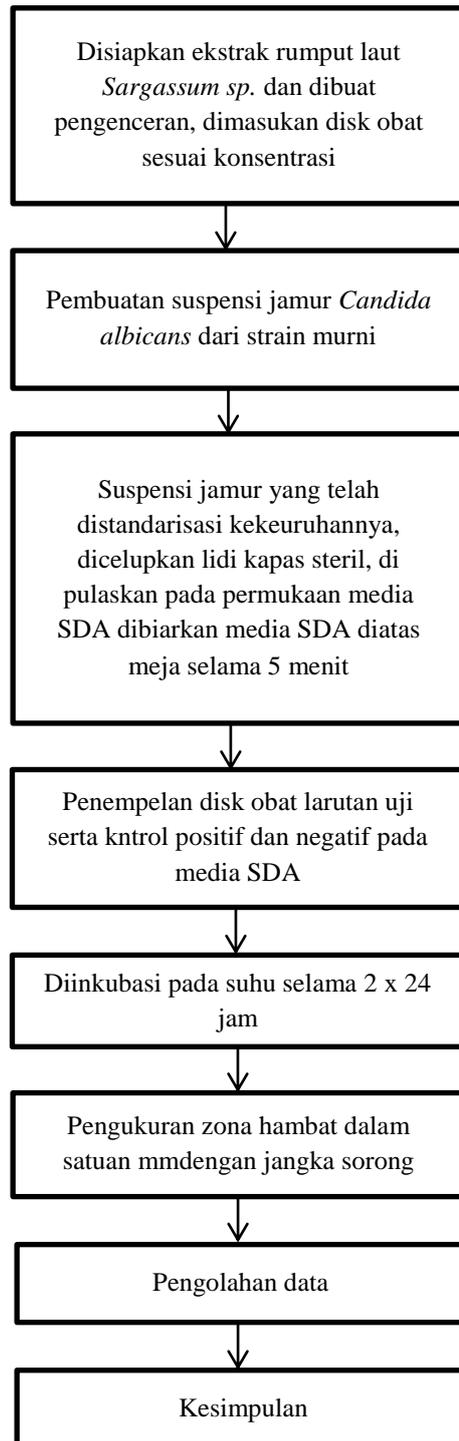
11) Pelaksanaan Uji Daya Hambat

- a) Disiapkan media agar SDA (Saboraud Dextrose Agar) yang telah mengeras.
- b) Dichelupkan lidi kapas steril kedalam suspensi jamur *Candida albicans* yang telah dibandingkan kekeruhannya dengan standar Mc Farland 0,5, ditunggu sebentar agar suspensi jamur *Candida albicans* meresap ke dalam kapas, kemudian lidi kapas diangkat dan diperas di dalam dinding tabung dengan cara menekannya sambil diputar.
- c) Dipulaskan lidi kapas pada permukaan media SDA (Saboraud Dextrose Agar) sampai seluruh permukaan tertutup rapat dengan pulasan.
- d) Dibiarkan media SDA (Saboraud Dextrose Agar) diatas meja selama 15 menit agar suspensi jamur *Candida albicans* meresap ke dalam media.
- e) Disk kosong direndam ekstrak rumput laut *Sargassum sp.*, kontrol positif dan kontrol negatif masing-masing 15 menit.
- f) Dilakukan penempelan disk diatas permukaan media SDA menggunakan pinset dengan cara sedikit ditekan sehingga cakram menempel pada media dengan masing-masing media berisi 2 cakram dengan jarak antar cakram adalah kurang lebih 15 mm.
- g) Lempeng agar diinkubasi pada suhu 25° C selama 3x24 jam (Jawetz dkk, 2008).
- h) Zona jernih yang terbentuk di sekitar disk diukur menggunakan jangka sorong sebagai diameter daya hambat ekstrak rumput laut *Sargassum sp.* terhadap pertumbuhan jamur *Candida albicans*.
- i) Interpretasi Hasil pengukuran diameter zona hambat dapat di lihat Tabel 3.2 (Alfiah dkk, 2015).

Tabel 3.2. Kategori Diameter Zona Hambat (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 Analisis Data

A. Pengolahan Data

Data yang berupa hasil zona hambat diperoleh dengan cara :

- a. Melakukan pengujian ekstrak rumput laut *Sargassum sp.* dengan konsentrasi 15%, 30%, 45%, 60%, 75% terhadap pertumbuhan jamur *Candida albicans*.
- b. Data berupa hasil zona hambat yang diperoleh disajikan dalam bentuk tabel dan diolah menggunakan uji ANOVA (*Analysis Of Varienece*).

3. Analisis Data

Data yang berupa hasil zona hamabat dianalisis menggunakan uji ANOVA (*Analysis Of Varience*) jika terdapat signifikasi (nilai $p=0,000$ (0,05) maka dilanjutkan ke uji BNT (Beda Nyata Terkecil).

G. Ethical Clearance (Persetujuan Etik)

Penelitian yang dilakukan atas izin komisi etik Poltekkes Tanjungkarang. Penelitian ini tidak akan menimbulkan bahaya bagi lingkungan, karena limbah yang dihasilkan dari proses penelitian akan dikumpulkan dan dimusnahkan dalam penanganan limbah. Limbah media plate serta limbah suspense jamur pada tabung dimusnahkan dengan Autoclave suhu 120°C dalam waktu 60 menit dengan tekanan 1 atm. Kemudian plate dan tabung dicuci menggunakan detergen pada air mengalir. Limbah larutan uji ditangani dengan cara langsung dibuang pada saluran pembuangan, dikarenakan limbah larutan uji tidak membahayakan lingkungan.