

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Jenis dan Desain Penelitian**

Jenis Penelitian adalah eksperimental dengan menggunakan desain penelitian Rancangan acak Lengkap (RAL). Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak daun rambutan (*Nepheleium lappaceum L*) dengan konsentrasi 40%,50%,60%,70%,80%,90% Sedangkan variabel terikat dalam penelitian ini adalah pertumbuhan jamur *Candida albicans* sebagai kontrol negatif adalah aquadest dan sebagai kontrol positifnya ketokonazol. Metode pemeriksaan yang di gunakan adalah difusi cakram *Kirby Bauer* dengan mengukur zona hambat yang terbentuk. Pengulangan dilakukan sebanyak 5 kali yang didapat dari perhitungan menggunakan Freederer yaitu  $(t-1)(r-1) \geq 15$ .

#### **B. Lokasi dan waktu penelitian**

##### 1. Lokasi penelitian

Tempat penelitian dapat dilakukan di laboratorium Mikologi jurusan Laboratorium Teknologi Laboratorium Medis Politeknik Kesehatan Tanjungkarang proses determinasi tumbuhan dilakukan di laboratorium Botani Fakultas MIPA Universitas Lampung dan ekstraksi dilaksanakan dilaboratorium Kimia Organik Fakultas MIPA Universitas Lampung pada bulan Februari sampai Mei 2023.

#### **C. Subyek Penelitian**

Subyek penelitian berupa daun rambutan (*Nepheleium lappaceum L*) dalam keadaan segar, dengan kriteria daun rambutan hijau berukuran 15-25 cm, bewarna hijau muda, permukaan halus dan kasap diambil di bawah daun muda  $\pm 1$  m. Kadar zat aktif yang terkandung dalam daun rambutan lebih tinggi dari daun rambutan muda (Felicia dkk, 2016). Subyek didapat dari kel Rajabasa Kec. Raja basa Kota Bandar Lampung. Kemudian dijadikan ekstrak lalu dibuat perlakuan atau konsentrasi ekstrak dengan pelarut etanol 96% dan dilakukan pengenceran dengan konsentrasi 40%,50%,60%,70%,80%,dan 90% Jamur yang digunakan *Candida albicans* yang didapat dari Balai Laboratorium Kesehatan Lampung.

## D. Variabel dan Defisi Oprasional Penelitian

Tabel 3.1 definisi Operasional

No	Variabel	Definisi	Cara Ukur	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala
1.	<b>Variabel Bebas</b> Ekstrak Daun Rambutan ( <i>Nephelium lappaceum</i> L)	Daun rambutan yang sudah di ekstraksi menggunakan metode maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 96% kemudian dilakukan pengenceran dengan konsentrasi 40%,50%, 60%,70%, 80%,90%	Pengeceran dengan rumus: $V1 \times X\% 1$ $V2 \times X\% 2$	Pipet Ukur Dan labu ukur	Ekstrak rambutan konsentrasi 40%, 50%, 60%, 70%, 80%,90%	Interval
	<b>Variabel Terikat</b> Pertumbuhan jamur <i>Candida albicans</i>	Hambatan pertumbuhan jamur <i>Candida albicans</i> oleh ekstrak daun rambutan ( <i>Nephelium lappaceum</i> L)	Mengukur diameter zona hambat dengan metode Difusi Kirby Bauer	Jangka sorong	Diameter zona hambat dalam kategori: 1. < 10 mm 2. 10-15 mm 3. 16-20 mm 4. > 20 mm	Ordinal

(Sumber: Puthera et al, 2015).

## E. Pengumpulan Data

### 1. Prosedur Pemeriksaan

- a) Determinasi daun rambutan
- b) Pembuatan Simplisia daun rambutan
- c) Peremajaan jamur *Candida albicans*
- d) Identifikasi jamur *Candida albicans*
- e) Pembuatan larutan uji
- f) Pengujian ekstrak daun rambutan terhadap pertumbuhan jamur *Candida albicans* Pengukuran Zona hambat.

### 2. Metode Pemeriksaan

Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan metode maserasi yang kemudian dilakukan evaporasi. Pada penelitian ini metode pemeriksaan uji daya hambat yang digunakan yaitu metode difusi agar dengan cara Kirby Bauer.

### 3. Alat dan Bahan

#### a) Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu, neraca analitik, autoclave, gunting, kapas, beaker glass 100 ml, wadah sampel, tabung reaksi, pipet ukur, lidi kapas steril, disc blank, pinset, plate, kertas kopi, oven, corong gelas, vortex mixer, hotplate, erlenmeyer 250 ml, lampu spirtus, korek api, pisau, kain kasa steril, jangka sorong, handscoon, masker, dan inkubator.

#### b) Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu larutan ekstrak daun rambutan dengan konsentrasi 40%-90% aquades steril, NaCl (0,85%), stok jamur *Candida albicans*, standar McFarland 0.5, kloramfenikol, ketokonazol, media Saboraand Detoxtrose Agar (Soemarno,2000).

### 4. Cara Kerja

#### a. Persiapan dan Determinasi Daun Rambutan

Daun Rambutan diperoleh dari sekitaran rumah yang berada di daerah Rajabasa Kec Rajabasa RT/RW 005/10, BandarLampung. Kemudian daun rambutan di determinasi di Laboratorium Botani Jurusan Biologi Fakultas

MIPA Universitas Lampung untuk memastikan kebenaran dari tanaman yang digunakan. Dengan cara mencocokkan morfologi yang ada pada daun rambutan terhadap kepustakaan dan dibuktikan dibidang Botani Lampung Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Lampung.

b. Pembuatan Simplisia

- 1) Daun Rambutan diambil sebanyak  $\pm 2$  kg dalam kondisi yang masih segar, bewarna hijau
- 2) Daun Rambutan dicuci di air mengalir lalu kemudian dipotong kecil-kecil.
- 3) Bahan yang telah di potong di keringkan dibawah sinar matahari, selama pengeringan dengan kain hitam.
- 4) Daun rambutan yang telah kering kemudian dibelender dan diayak dengan ayakan nomor 40 agar mendapatkan serbuk yang benar-benar halus.
5. Serbuk daun rambutan disimpan dalam wadah kering dan tertutup rapat.

a. Proses Pembuatan Ekstrak dengan menggunakan metode maserasi

- 1) Ditimbang serbuk kering daun rambutan (*Nephelium lappaceum L*) masing masing sebanyak 250 gram dimasukkan ke dalam wadah maserasi.
- 2) Kemudian ditambahkan 1000 ml etanol 96% dengan perbandingan sampai semua serbuk daun rambutan (*Nephelium lappaceum L*) terendam larutan tersebut dan diamkan selama 72 jam dan diaduk setiap 24 jam.
- 3) Hasil maserasi disaring untuk memisahkan cairan etanol dengan ampasnya dan dihasilkan ekstrak cair.
- 4) Ekstrak daun rambutan (*Nephelium lappaceum L*) diuapkan menggunakan rotatory evaporator untuk memperoleh ekstrak kental (Marjoni, 2016).

6. Sterilisasi Alat

Alat-alat gelas yang digunakan dalam penelitian ini dibersihkan dan dikeringkan terlebih dahulu kemudian dibungkus dengan menggunakan kertas kopi. Disterilkan dengan menggunakan oven pada suhu  $160^{\circ}\text{C}$  selama 60 menit (Soemarno, 2000).

a. Pembuatan Kloromfenikol

Pembuatan Larutan Kloramfenikol Setiap 1000 ml Sabouraud Dextrose Agar (SDA) memerlukan 400 mg kloramfenikol, setiap 250 mg kloramfenikol dilarutkan dalam 10 ml NaCl 0,85%, dengan perhitungan  $400 \text{ mg} : 250 \text{ mg} \times 10 \text{ ml} = 16 \text{ ml}$ .  $\frac{400 \text{ mg}}{250 \text{ mg}} \times 10 \text{ ml} = 16 \text{ ml}$ . Maka untuk 400 mg Kloramfenikol diperlukan NaCl 0,85% sebanyak 16 ml (Soemarno, 2000).

b. Pembuatan media agar dari *Sabouraud Dextrose Agar*

Ditimbang bubuk 65 gram ditambahkan 1000 ml dengan aquades dan dikalikan dengan volume yang dibutuhkan. Kemudian ditimbang, diaduk selanjutnya dipanaskan di atas hotplate sampai larut sempurna. Setelah larut sempurna, ditambahkan larutan kloramfenikol (untuk mencegah tumbuhnya kuman kontaminasi), lalu media disterilkan di autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit pada tekanan 1 atm. Setelah disterilkan media dituang kedalam cawan petri yang telah disterilkan dengan ketebalan +4 mm dan dibiarkan dingin (Soemarno, 2000).

c. Uji sterilisasi media

Media yang sudah selesai dibuat, diambil beberapa plate kemudian diinkubasi 37°C selama 2x24 jam. Apabila ada pertumbuhan 2 koloni plate, maka dianggap tidak steril (Soemarno, 2000).

d. Pembuatan Larutan standar Mac Farland 0,5

Dicampurnya 9,95 ml larutan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1% dengan 0,05 ml larutan BaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 1% sehingga volume menjadi 10 ml dengan perkiraan jumlah mikroba yaitu  $1,5 \times 10^8$  kemudian dikocok hingga homogen. Larutan harus dikocok setiap akan digunakan untuk membandingkan suspensi jamur (Soemarno, 2000).

e. Pembuatan NaCl 0,85 %

Ditimbang 0,85 gram NaCl dilarutkan dalam 100 ml aquadest steril dalam erlenmeyer, dihomogenkan. Larutan NaCl 0,85% lalu ditutup dengan sumbat kapas yang dibungkus aluminium foil, kemudian disterilkan dengan autoclave suhu 121 °C tekanan 1 atm selama 15 menit (Soemarno, 2000).

f. Pembuatan Larutan Ketokonazol

Dihaluskan 200 gram ketokonazol, kemudian ditambahkan dengan 10 ml alkohol 96% dan dihomogenkan (Alifiah,2015).

g. Identifikasi *Candida albicans*

a) Pemeriksaan Makroskopis

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

Interpretasi hasil: *Candida albicans* pada pewarnaan gram didapatkan hasil, bentuk Blastospora yaitu bulat, lonjong berwarna ungu dan bersifat gram positif (Siregar,2005).

6. Pemeriksaan Mikroskopis

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

2) Diletakkan objek glass pada rak pengecatan, selanjutnya dilakukan pengecatan gram. Ditetaskan gram A didiamkan selama 1 menit, lalu dibilas dengan air mengalir. Ditetaskan gram B didiamkan selama 1 menit, lalu dibilas dengan air mengalir. Ditetaskan gram C didiamkan selama 30 detik, lalu dibilas dengan air mengalir. Ditetaskan gram D didiamkan selama 30 detik, lalu dibilas dengan air mengalir.

3) Dikeringkan kemudian diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran awal 10x, kemudian lanjut perbesaran 40 x dan 100x (menggunakan minyak anisol).

4) Interpretasi hasil: *Candida albicans* pada pewarnaan gram didapatkan hasil bentuk Blastospora yaitu bulat, lonjong berwarna ungu dan bersifat gram positif (Siregar,2005).

7. Pembuatan suspensi *Candida albicans*

Diambil koloni *Candida albicans* I ujung ose dan disuspensikan ke dalam larutan NaCl 0,85% yang telah dibagi ke dalam beberapa tabung reaksi, kemudian dihomogenkan dengan alat mixer vortex hingga kekeruhannya sama dengan standar Mc Farland 0,5. Koloni jamur yang

sudah dibuat suspensi dibandingkan dengan tabung reaksi yang berisi kekeruhan Mc Farland 0,5 dengan latar belakang putih atau gelap. Apabila kurang keruh, tambahkan koloni *Candida albicans*, sedangkan apabila lebih keruh, maka ditambahkan NaCl 0,85% (Soemarno, 2000).

8. Pembuatan larutan uji ekstrak daun rambutan
  - a. Identifikasi bahan uji daun rambutan (*Nephelium lappaceum L*)
  - b. Laboratorium Botani Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Lampung.
  - c. Pembuatan simplisia daun rambutan (*Nephelium lappaceum L*) Diambil +4 kg, kemudian dicuci dengan air mengalir dan ditiriskan. Daun rambutan dikeringkan dengan cara ditutup kain hitam di bawah sinar matahari secara tidak langsung, selain itu dapat juga menggunakan oven dengan suhu 35°C selama 2 x 24 jam sebagai alternatif lain selain sinar matahari (Dharma, 2020). Simplisia yang telah kering dihaluskan dengan cara tumbuk, kemudian diayak agar didapatkan simplisia yang halus, dan disimpan dalam wadah yang kering.
  - d. Pembuatan ekstrak daun rambutan (*Nephelium lappaceum L*) dengan metode maserasi simplisia daun rambutan dijadikan ekstrak dengan pelarut etanol 96%, kemudian dibuat konsentrasi 40%,50%,60%,70%,80% dan 90% yang digunakan sebagai larutan uji dalam menghambat pertumbuhan *Candida albicans*. Simplisia yang telah halus dimasukkan ke dalam botol berwarna gelap dengan 500 gram sebanyak 75 bagian dan dituang etanol 96% kemudian dimasukkan ke dalam botol gelap dan ditutup menggunakan aluminium foil, selanjutnya diamkan selama 5 hari ditempat yang terlindung cahaya dengan pengadukan 2-3 kali setiap harinya. Setelah 5 hari, filtrat dan presifitat dipisahkan menggunakan kertas saring (maserat 1). Kemudian presifitat yang telah dipisahkan direndam kembali dengan etanol 96% sebanyak 35 bagian dan didiamkan selama 2 hari kemudian disaring menggunakan kertas saring (maserat II). Maserat I dan II dicampur kemudian diuapkan di atas rotary evaporator pada suhu 40°C hingga diperoleh ekstrak kental, ekstrak diuapkan kembali di atas hotplate pada suhu 60°C.

Selanjutnya dilakukan pengulangan untuk memastikan bahwa ekstrak sudah tidak mengandung pelarut lagi (ekstrak 100%). Kemudian simpan ekstrak pada wadah berbahan gelas berwarna gelap dan steril, bersih dan kering. Selanjutnya dilakukan pengenceran ekstrak dengan konsentrasi 40%,50%,60%,70%,80%,90% Pengenceran dengan menggunakan rumus berikut:

$$V1 \times \%1 = V2 \times \%2$$

Keterangan:

V1=Volume larutan uji yang dipipet (ml)

%1=konsentrasi larutan uji (100%)

V2=volume larutan uji yang diinginkan (ml)

%2=konsentrasi yang akan dibuat (%)

#### 9. Pelaksanaan Uji Daya Hambat

- a) Disiapkan media SDA yang telah mengeras.
- b) Dichelupkan lidi kapas steril ke dalam suspensi *Candida albicans* yang telah dibandingkan kekeruhannya dengan standar Mac Farland 0.5, kemudian ditunggu sebentar supaya suspensi *Candida albicans* meresap ke dalam kapas, kemudian lidi kapas diangkat dan diperas di dalam dinding tabung dengan cara menekannya sambil diputar (Pollack, 2014).
- c) Dipulaskan lidi kapas pada permukaan media SDA sampai seluruh permukaan tertutup rapat dengan pulasan, dilakukan 3x pulasan pada permukaan media dengan membolak balik lidi kapas steril pada setiap pulasan, dari pulasan ke I ke pulasan II, kemudian plate diputar 90°C sedangkan dari pulasan II ke pulasan ke III plate diputar 45°C (Pollack, 2014).
- d) Dibiarkan media SDA tersebut di atas meja selama 5-15 menit supaya suspensi jamur meresap ke dalam media.
- e) Disk kosong direndam dengan ekstrak daun rambutan, kontrol positif dan kontrol negatif masing-masing 15 menit.
- f) Dilakukan penempelan disc obat, dengan cara meletakkan disc obat di permukaan media dengan pinset, dengan cara sedikit ditekan sehingga

cakram menempel pada media SDA dengan masing-masing media berisi 2 cakram dengan jarak antar cakram yaitu  $\pm 15$  mm.

- g) Lempeng agar diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama  $2 \times 24$  jam (Soemarno, 2000).
- h) Zona bening yang terbentuk di sekitar disc obat diukur diameternya dengan menggunakan jangka sorong sebagai diameter daya hambat daun rambutan (*Nephelium lappaceum L*) terhadap pertumbuhan *Candida albicans* (Soemarno, 2000).

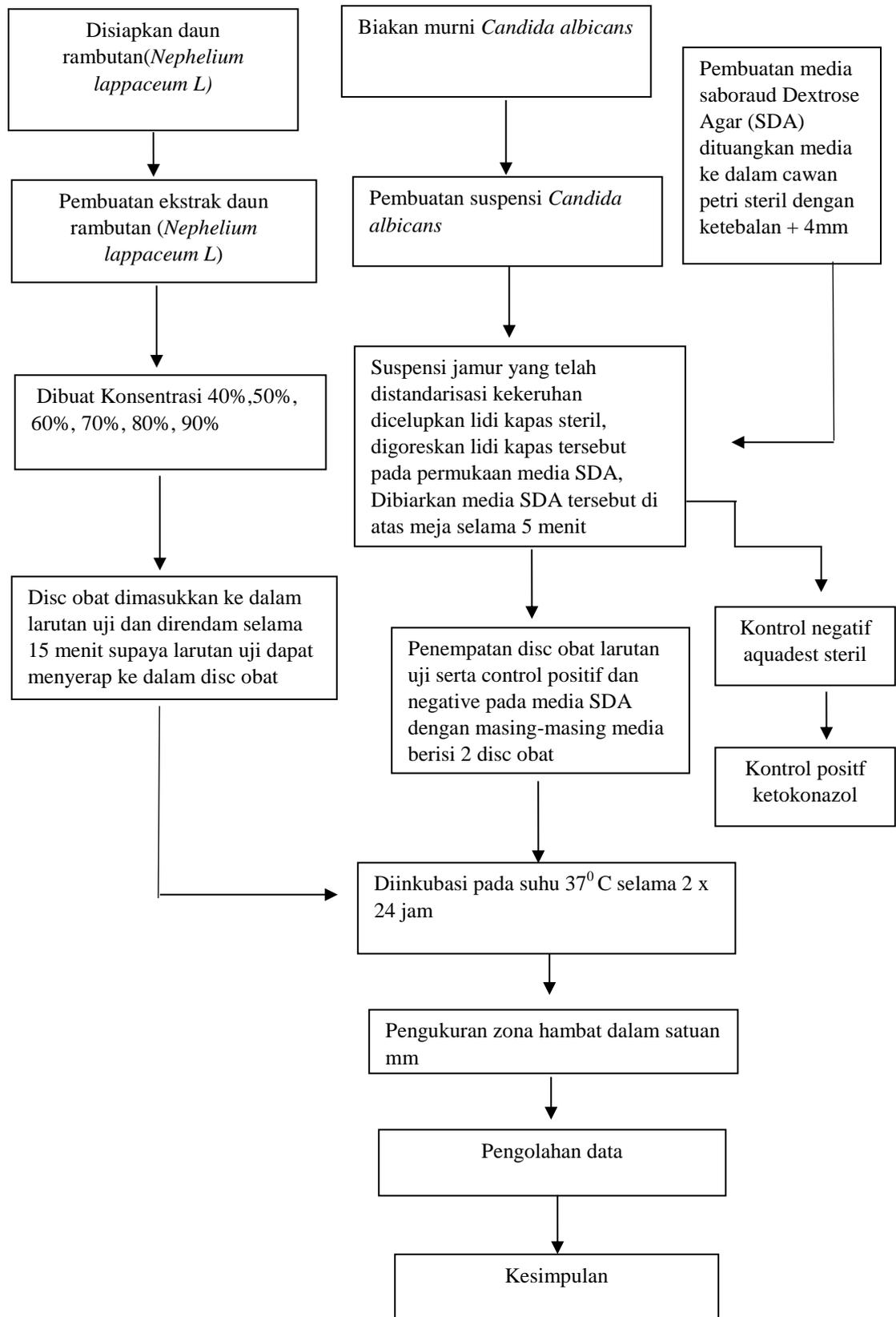
#### Interpretasi Hasil:

Tabel 3.2 Klasifikasi respon hambatan pertumbuhan jamur

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

(Alifah, 2015).

### 3. Skema Kerja



(Sumber Dhiyar 2021, Akfa, 2017).

## F. Analisis Data

### 1. Pengolahan data

- a. Dilakukan pengujian daya hambat ekstrak daun rambutan (*Nephelium lappaceum L*) dengan konsentrasi 40%,50%,60%,70%,80%, dan 90% terhadap pertumbuhan *Candida albicans*
- b. Dilakukan pengukuran zona hambat dari masing-masing konsentrasi pada tiap pengulangan menggunakan alat ukur dalam satuan mm.
- c. Data zona hambat yang diperoleh disajikan dalam bentuk tabel.

### 2. Analisis Data

Data yang diperoleh berupa diameter zona hambat pada masing-masing konsentrasi ekstrak etanol daun rambutan yang di analisis dengan uji *One Way Anova*. Apabila ada signifikansi zona hambat antar perlakuan, maka dilanjutkan dengan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) dengan taraf kesalahan 5%.

## G. Ethical Clearance

Penelitian yang dilakukan atas izin etik dengan no surat 142/KEPK-TJK/II/2023 dan etik berlaku selama kurun waktu tanggal 21 Februari 2023 sampai dengan 21 Februari 2024. Penelitian ini tidak menimbulkan bahaya bagi lingkungan, limbah yang dihasilkan dan proses penelitian ini akan dikumpulkan dan dimusnahkan dalam penanganan limbah. Limbah larutan uji ekstrak daun rambutan (*Nephelium lappaceum L*) ditangani dengan cara langsung dibuang pada saluran pembuangan, dikarenakan limbah larutan tidak membahayakan lingkungan. Limbah media serta limbah suspensi *Candida albicans* pada tabung dimusnahkan dengan cara perebusan pada suhu 100°C selama 30 menit, air bekas rebusan limbah media dan suspensi *Candida albicans* dibuang pada saluran pembuangan, lalu setelah penelitian plate dan tabung direbus kembali dengan penambahan deterjen, setelah itu air bekas rebusan dibuang pada saluran pembuangan, plate dan tabung dicuci menggunakan deterjen pada air mengalir.