

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 etanol kulit nanas (*Ananas comosus (L.) merr*) dengan konsentrasi 20%, 40%, 60%, dan 80% dan variabel dependent/terikat yaitu pertumbuhan jamur *Trichophyton rubrum*.

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 4 kali yang didapat dari perhitungan menggunakan rumus *Freederer* yaitu $(t-1)(n-1) \geq 15$.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Parasitologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Tanjungkarang. Proses Determinasi tumbuhan dilakukan di Laboratorium Botani Fakultas MIPA Universitas Lampung dan ekstraksi kulit nanas (*Ananas comosus (L.) merr*) di Laboratorium Kimia Fakultas MIPA Universitas Lampung. Penelitian ini dilakukan pada bulan Maret-Juni 2023.

C. Subjek Penelitian

Subjek penelitian ini adalah kulit nanas batu varietas *queen* dengan kriteria segar, tidak busuk, berwarna hijau kekuningan dan terpisah dari daging buahnya. Kulit nanas kemudian dijadikan ekstrak lalu dibuat konsentrasi 20%, 40%, 60%, dan 80% yang digunakan sebagai larutan uji dalam menghambat jamur *Trichophyton rubrum*. Jamur *Trichophyton rubrum* didapatkan dari Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

D. Variabel dan Definisi Operasional Penelitian

Table 3.1 Variabel dan Definisi Operasional Penelitian

Variabel	Definisi	Cara Ukur	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala
Variabel bebas: Ekstrak etanol kulit nanas (<i>Ananas comosus (L.) merr</i>)	Kulit nanas (<i>Ananas comosus (L.) merr</i>) yang diekstraksi menggunakan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%, lalu diencerkan.	Ekstrak diencerkan dengan rumus $V_1 \times \%_1 = V_2 \times \%_2$	Pipet ukur	Ekstrak kulit nanas (<i>Ananas comosus (L.) merr</i>) konsentrasi 20%, 40%, 60%, dan 80%.	Interval
Kontrol positif ketokonazol	Obat antijamur dengan ketokonazol dosis 200 mg	Mengukur diameter zona hambat dengan metode difusi Kirby Bauer	Jangka sorong	mm	Rasio
Variabel terikat: Zona hambat pertumbuhan jamur <i>Trichophyton rubrum</i>	Diameter zona hambat pertumbuhan jamur <i>Trichophyton rubrum</i> yang dihambat oleh ekstrak etanol kulit nanas (<i>Ananas comosus (L.) merr</i>).	Mengukur diameter zona hambat 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 mm daya hambat sangat kuat (Alfiah dkk, 2015)	Ordinal

E. Pengumpulan Data

1. Prosedur Penelitian

- a. Pengajuan permohonan izin dari Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Tanjungkarang untuk dilakukan determinasi dan pembuatan ekstrak kulit nanas (*Ananas comosus (L.) merr*) di Laboratorium Fakultas MIPA Universitas Lampung dan pemesanan strain jamur *Trichophyton*

rubrum di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

- b. Pengumpulan bahan-bahan pemeriksaan seperti strain jamur, media SDA, disk kosong, dan kulit nanas (*Ananas comosus (L.) merr*).
- c. Determinasi bahan uji kulit nanas (*Ananas comosus (L.) merr*) di Laboratorium Botani Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Lampung.
- d. Pembuatan simplisia kulit nanas (*Ananas comosus (L.) merr*).
- e. Ekstraksi simplisia kulit nanas (*Ananas comosus (L.) merr*) di Laboratorium Kimia Fakultas MIPA Universitas Lampung.
- f. Pengenceran larutan uji menjadi konsentrasi 20%, 40%, 60%, dan 80%.
- g. Pembuatan suspensi jamur *Trichophyton rubrum*.
- h. Pengujian ekstrak kulit nanas (*Ananas comosus (L.) merr*) terhadap pertumbuhan jamur *Trichophyton rubrum* dengan metode difusi cakram *Kirby Bauer* dan pengamatan zona hambat yang terbentuk pada masing-masing konsentrasi dan diukur menggunakan alat ukur jangka sorong dalam satuan mm.

2. Metode Pemeriksaan

Difusi cakram dengan cara *Kirby Bauer*.

3. Prinsip Pemeriksaan

Kertas cakram yang mengandung sejumlah obat tertentu diletakkan di atas permukaan media padat yang telah diinokulasi dengan mikroorganisme uji. Setelah diinkubasi, diameter zona hambat di sekitar cakram diukur sebagai hasil kemampuan obat dalam menghambat organisme uji tertentu (Jawetz et al, 2016).

4. Prosedur Kerja

a. Persiapan alat dan bahan pemeriksaan

Alat yang digunakan adalah cawan petri, gelas ukur, erlenmayer, neraca analitik, autoclave, pipet ukur, vacuum pump, inkubator, oven, lampu spritus, kertas disk steril, pinset, lidi kapas steril, ose, botol gelap, kertas kopi, kain hitam, hotplate, aluminium foil, objek glass, mixer

vortex, thermometer, waterbath, evaporator, korek api, corong glass, tabung reaksi, jangka sorong dan mikroskop.

Bahan yang digunakan adalah aquadest steril, etanol 96%, NaCl 0,85%, standar Mc Farland 0,5, klorofenikol, ketokonazol, media Sabouroud Dextrose Agar (SDA), kulit nanas (*Ananas comosus (L.) merr*), dan strain murni *Trichophyton rubrum*.

- b. Identifikasi bahan uji kulit nanas (*Ananas comosus (L.) merr*) di Laboratorium Botani Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Lampung.
- c. Pengujian ekstrak kulit nanas (*Ananas comosus (L.) merr*) terhadap jamur *Trichophyton rubrum* dengan prosedur kerja sebagai berikut :

- 1) Sterilisasi Alat

Alat-alat gelas yang akan 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 (Soemarno, 2000).

- 2) Pembuatan Larutan Klorofenikol

Setiap 1000 ml media *Saboraud Dextrose Agar* (SDA) memerlukan 400 mg klorofenikol. Setiap 250 mg klorofenikol dilarutkan didalam 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 klorofenikol diperlukan NaCl 0,85% sebanyak 16 ml (Soemarno, 2000).

- 3) Pembuatan Larutan Standar Mc. Farland 0,5

Dicampurkan 9,95 ml larutan H₂SO₄ 1% dengan 0,05 ml larutan BaCl₂·2H₂O 1% sehingga volume menjadi 10 ml, dikocok hingga homogen. Larutan harus dikocok setiap kali akan digunakan untuk membandingkan suspensi jamur (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 sesuai dengan petunjuk pembuatan pada botol media yaitu 65 gram serbuk media *Saboraud Dextrose Agar* (SDA) dalam 1000 ml aquadest dikalikan dengan volume yang dibutuhkan. Kemudian timbang, aduk, dan dipanaskan diatas hotplate sampai larut sempurna. Kemudian media distrerilisasi di autoklaf pada suhu 121° C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm. Kemudian dinginkan hingga mencapai suhu 50° C, lalu tambahkan larutan klorofenikol (untuk mencegah tumbuhnya kuman kontaminan). Setelah itu media dituang ke dalam cawan petri yang telah steril dengan ketebalan ± 4mm dan di biarkan hingga mengeras (Soemarno, 2000).

6) Uji Sterilisasi Media

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

7) Identifikasi Jamur *Trichophyton rubrum*

a) Pemeriksaan Makroskopis

Ditanam jamur *Trichopyton rubrum* pada media SDA, kemudian diinkubasi pada suhu 37° C selama 7 x 24 jam lalu diamati koloni jamur *Trichophyton rubrum* yang tumbuh. Pada media SDA koloni tipikal *Trichophyton rubrum* mempunyai permukaan seperti kapas yang berwarna putih dan mempunyai pigmen tidak dapat berdifusi berwarna merah pekat bila dilihat dari sisi koloni sebaliknya (Jawetz et al, 2016).

b) Pemeriksaan Mikroskopis

Identifikasi jamur *Trichophyton rubrum* secara mikroskopis dengan cara pengecatan *Lactophenol Catton Blue* (LPCB)

- (1) Diambil koloni jamur dari biakan media SDA yang telah ditanam sebelumnya, kemudian diletakkan pada permukaan objek glass.
- (2) Dilakukan pewarnaan dengan meneteskan *Lactofenol Catton Blue* (LPCB) pada koloni yang telah diletakkan di atas objek glass, kemudian tutup dengan deck glass.
- (3) Diamati dengan mikroskop dengan perbesaran 40x (Soemarno, 2000).

Interpretasi Hasil :

Ciri *Trichophyton rubrum* pada mikroskop banyak bentuk mikrokonidia berbentuk khas bulat, piriform (*teardrop-shaped*) sepanjang hifa dan makrokonidia berbentuk silindris (Irianto, 2013).

8) Pembuatan Suspensi Jamur *Trichophyton rubrum*

Diambil 1 ujung ose koloni jamur *Trichophyton rubrum* dan disuspensikan ke dalam larutan NaCl 0,85% pada tabung reaksi, kemudian dihomogenkan menggunakan mixer vortex. Kemudian dibandingkan sampai kekeruhannya sama dengan standar Mc. Farland 0,5. Jika kurang keruh, maka dapat ditambahkan koloni jamur *Trichophyton rubrum*. Sedangkan jika lebih keruh, maka dapat ditambahkan NaCl 0,85% (Soemarno, 2000).

9) Pembuatan Larutan Kontrol Positif

Dihaluskan 200 mg ketokonazol, lalu tambahkan 10 ml aquadest steril dan dihomogenkan. Kemudian rendam disk kosong dalam larutan tersebut selama 15 menit (Alfiah dkk, 2015).

10) Pembuatan Larutan Uji Ekstrak Kulit Nanas (*Ananas comosus (L.) merr*)

a) Identifikasi bahan uji kulit nanas (*Ananas comosus (L.) merr*) di Laboratorium Botani Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Lampung.

b) Pembuatan Simplasia

Sampel kulit nanas (*Ananas comosus (L.) merr*) sebanyak \pm 6 kg yang segar, tidak busuk berwarna hijau kekuningan, dan yang terpisah dari daging buahnya. Kemudian kulit nanas dicuci dengan air mengalir dan ditiriskan. Kulit nanas selanjutnya dipotong kecil-kecil dan dikeringkan (pengeringan dilakukan secara tidak langsung menggunakan wadah yang ditutup kain hitam) hal ini dilakukan karena sinar ultra violet dari matahari dapat merusak kandungan kimia pada bahan yang dikeringkan (Yusuf dkk, 2020). Kulit nanas yang telah kering kemudian dihaluskan dengan cara diblender, lalu diayak agar didapatkan simplasia yang halus kemudian disimpan dalam wadah yang kering.

c) Pembuatan Ekstrak Kulit Nanas (*Ananas comosus (L.) merr*) Metode Maserasi

Simplisia yang diperoleh ditimbang dan kemudian direndam dengan larutan etanol 96% dengan perbandingan 1:3 (b/v). Metode ekstraksi dilakukan dengan cara merendam simplisia dalam pelarut selama 3 hari pada temperatur kamar dan terlindung dari cahaya dengan pengadukan 2-3 kali setiap hari, kemudian dipisahkan antara filtrat dengan presipitat menggunakan kertas saring (maserat I). Presipitat yang telah dipisahkan kemudian direndam kembali dengan pelarut etanol 96% lalu disaring menggunakan kertas saring hingga mendapatkan maserat II. Selanjutnya proses yang sama dilakukan hingga diperoleh filtrat III. Seluruh filtrat yang diperoleh dari proses maserasi I, II, III digabung menjadi satu dan saring dengan kertas saring, filtrat kemudian dipekatkan dengan diuapkan menggunakan *Rotary Evaporator* pada suhu 40°C hingga diperoleh ekstrak kental. Kemudian dilakukan pengenceran ekstrak dengan konsentrasi 20%, 40%, 60%, dan 80% dari larutan induk menggunakan rumus pengenceran

Pengenceran sesuai 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 uji yang akan dibuat (%)

11) Pelaksanaan Uji Daya Hambat

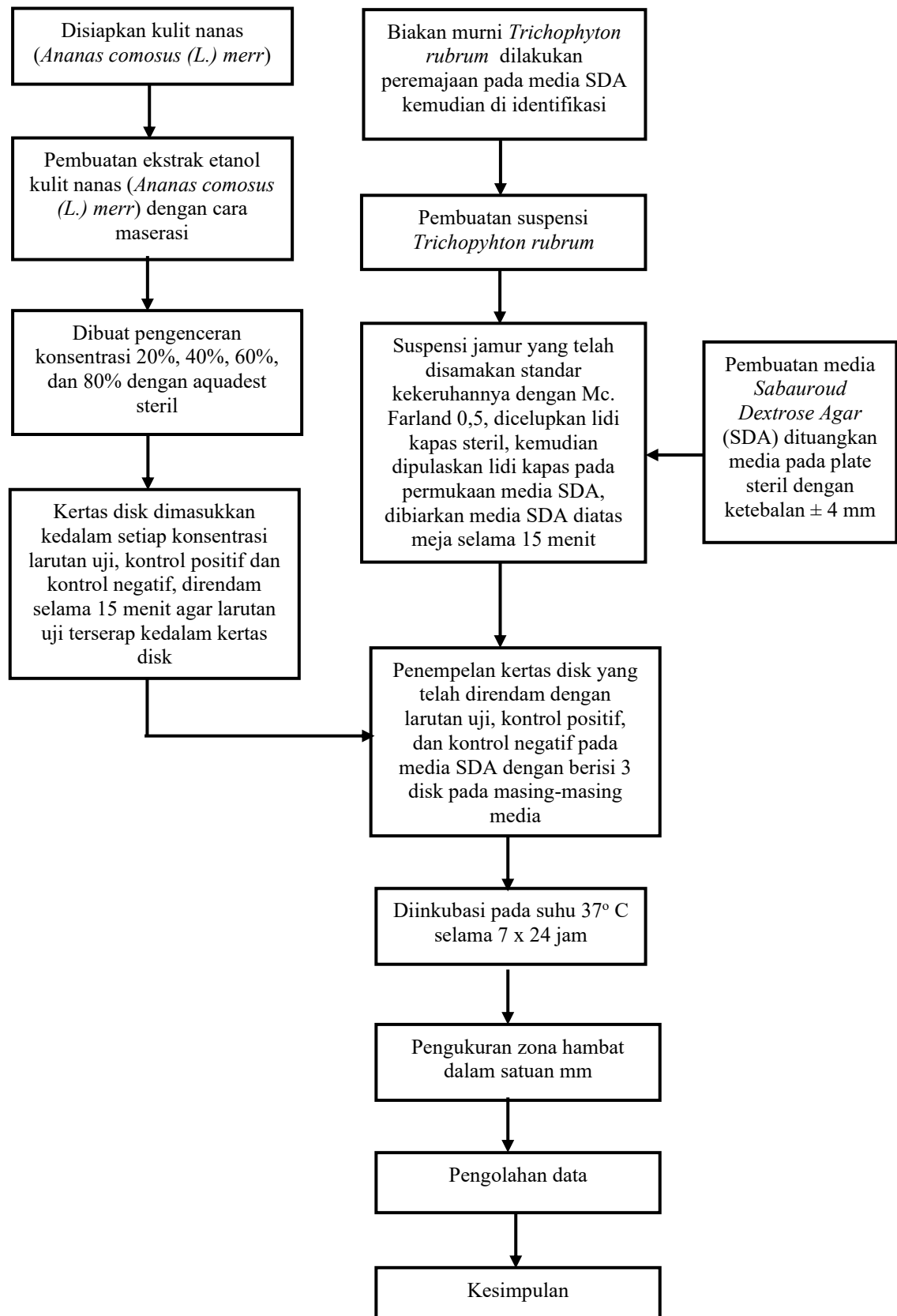
- a) Disiapkan media agar SDA (*Saboraud Dextrose Agar*) yang telah mengeras.
- b) Ke dalam suspensi jamur yang sudah distadarisasi kekeruhannya, celupkan lidi kapas steril dan tunggu agar suspense meresap ke dalam kapas, kemudian lidi kapas diangkat dan diperas dengan cara menekannya pada dinding tabung bagian dalam sambil diputar-putar (Pollack *et al*, 2014)

- c) Pulaskan lidi kapas tersebut pada permukaan media SDA sampai seluruh permukaan tertutup rapat dengan pulasan, dilakukan 3 x pulasan pada permukaan media dengan membolak-balikan lidi kapas pada setiap pulasan, dari pulasan I ke pulasan II plate diputar 90° sedangkan dari pulasan II ke III palte diputar 45° (Pollack *et al*, 2014)
- d) Dibiarkan media SDA (*Saboraud Dextrose Agar*) diatas meja selama 5-15 menit agar suspensi jamur meresap ke dalam media, kemudian dilakukan penempelan disk obat yang telah direndam dalam ekstrak etanol kulit nanas (*Ananas comosus (L.) merr*) selama 15 menit pada permukaan media SDA dengan masing-masing media berisi 2 disk obat, dengan cara menaruhkan disk di permukaan media dengan pinset lalu ditekan sedikit sehingga disk obat menempel pada media SDA dengan jarak antar disk obat lebih kurang 15mm.
- e) Lempeng agar diinkubasi pada suhu 37° C selama 7 x 24 jam (Irianto, 2013)
- f) Zona jernih yang terbentuk disekitar disk diukur menggunakan jangka sorong untuk mengetahui diameter zona hambat ekstrak etanol kulit nanas (*Ananas comosus (L.) merr*) dalam menghambat pertumbuhan jamur *Trichopyton rubrum* .
- g) 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

1. Pengolahan Data

- a. Melakukan pengujian daya hambat ekstrak etanol kulit nanas (*Ananas comosus (L.) merr*) dengan konsentrasi 20%, 40%, 60%, dan 80% terhadap jamur *Trichophyton rubrum*.
- b. Melakukan pengukuran diameter zona hambat pada masing-masing konsentrasi dari tiap pengulangan menggunakan alat ukur jangka sorong dengan satuan mm.
- c. Data diameter zona hambat yang diperoleh disajikan dalam bentuk tabel.

2. Analisis Data

Data yang diperoleh berupa diameter zona hambat pada tiap-tiap konsentrasi ekstrak etanol kulit nanas (*Ananas comosus (L.) merr*) yang disajikan dalam bentuk tabel. Data yang terkumpul kemudian dianalisis dengan uji *One Way Anova* jika terdapat signifikansi ($P\text{-value} < 0,05$) maka dilanjutkan ke uji BNT (Beda Nyata Terkecil) dengan taraf kesalahan 5%.

G. Ethical Clearance

Penelitian ini dilakukan dengan izin dari Komite Etik Politeknik Kesehatan Tanjung Karang No.123/KEPK-TJK/II/2023. Penelitian ini tidak menimbulkan bahaya bagi lingkungan karena limbah yang dihasilkan selama proses penelitian dikumpulkan dan dimusnahkan di tempat pembuangan limbah. Limbah ekstraksi etanol kulit nanas (*Ananas comosus (L.) merr*) diolah dengan cara pembuangan langsung ke sistem pembuangan limbah karena tidak berbahaya bagi lingkungan. Limbah media lempeng Saboreau dextrose agar (SDA) dan limbah suspensi jamur *Trichopyton rubrum* dalam tabung dimusnahkan dengan cara direbus pada suhu 100°C selama 30 menit dan air rebusannya ditiriskan. Tabung dan piring kemudian direbus kembali dengan menambahkan deterjen dan air mendidih dialirkan ke saluran pembuangan, kemudian tabung dan piring bekas harus dicuci dengan deterjen dan dibilas dengan air mengalir.