

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 berupa ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura* L.) dengan konsentrasi 20%, 35%, 50%, 65%, 80% serta variabel dependent/terikat adalah pertumbuhan jamur *Candida albicans*. Pemeriksaan ini menggunakan metode difusi cakram cara *Kirby Bauer* dengan melihat zona hambat yang terbentuk. Kontrol positif yang digunakan dalam pengujian ini yaitu ketokonazol dan kontrol negatif yang digunakan yaitu aquadest steril. Pengulangan dilakukan sebanyak 5 kali yang didapat dari perhitungan menggunakan rumus Frederer yaitu $(t-1)(n-1) \geq 15$.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikologi Jurusan Analis Kesehatan Poltekkes Tanjungkarang pada bulan April sampai dengan Juni 2021.

C. Subjek Penelitian

Subjek penelitian ini adalah daun kersen (*Muntingia calabura* L.) yang diambil di Kecamatan Kedaton Kota Bandar Lampung. Daun pada ranting diambil dengan karakteristik segar dan berwarna hijau (Kosasih dkk, 2013). Daun kersen (*Muntingia calabura* L.) dijadikan ekstrak dengan pelarut etanol 96%, kemudian diencerkan dengan konsentrasi 20%, 35%, 50%, 65%, 80% 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 daun kersen (<i>Muntingia calabura</i> L.)	Daun kersen (<i>Muntingia calabura</i> L.) yang diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96% lalu ekstrak hasil maserasi diencerkan 20%, 35%, 50%, 65%, 80%	Ekstrak diencerkan dengan rumus $V_1 \times \%_1 = V_2 \times \%_2$	Pipet ukur	Ekstrak daun kersen (<i>Muntingia calabura</i> L.) konsentrasi 20%, 35%, 50%, 65%, 80%	Interval
2.	Variabel terikat: Pertumbuhan jamur <i>Candida albicans</i>	Pertumbuhan jamur <i>Candida albicans</i> yang dihambat oleh ekstrak daun kersen (<i>Muntingia calabura</i> L.)	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

- Pengajuan Permohonan izin dari jurusan Analis Kesehatan Poltekkes Tanjungkarang untuk dilakukan determinasi dan pembuatan ekstrak daun kersen di Laboratorium Fakultas MIPA Universitas Lampung dan pemesanan strain jamur ke Laboratorium Parasitologi Klinik Universitas Indonesia
- Pengumpulan bahan-bahan pemeriksaan seperti strain jamur *Candida albicans*, media SDA, disk kosong dan daun kersen (*Muntingia calabura* L.)
- Determinasi bahan uji daun kersen di Laboratorium Botani Fakultas MIPA Universitas Lampung
- Pembuatan simplisia daun kersen

- e. Ekstraksi simplisia daun kersen di Laboratorium Kimia Organik Fakultas MIPA Universitas Lampung
- f. Pengenceran larutan uji menjadi konsentrasi 20%, 35%, 50%, 65%, 80%
- g. Pembuatan suspensi jamur *Candida albicans*
- h. Pengujian ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura* L.) terhadap pertumbuhan jamur *Candida albicans* 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 agar cakram dengan cara *Kirby Bauer*.

3. Prinsip Pemeriksaan

Cakram kertas yang mengandung sejumlah obat tertentu ditempatkan di atas permukaan medium padat yang telah diinokulasi pada permukaan dengan organisme uji. Setelah diinkubasi, diameter zona hambat di 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, Disk cakram steril, Pinset, Neraca analitik, Gelas ukur, Inkubator, Erlenmeyer, Autoklaf, Karet penghisap, Pipet ukur, Lidi kapas steril, Kapas, Botol gelap, Kain hitam, Kertas kopi, Alumunium foil, Jangka sorong, Hotplate, Gelas objek, Mixer vortex, Thermometer, Korek api, Waterbath, Oven, Evaporator, Corong gelas, Tabung reaksi, Rak tabung reaksi, Ose dan Lampu spiritus.
 - 2) Bahan: Aquades steril, Nacl 0,85%, standar Mc. Farland 0.5, kloramfenikol, ketokonazol, media Sabouroud Dextrose Agar (SDA), Daun Kersen (*Muntingia calabura* L.) dan strain murni *Candida albicans*.
- b. Identifikasi bahan uji daun kersen (*Muntingia calabura* L.) di Laboratorium Botani Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Lampung.

c. Pengujian ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura* L.) 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 dengan kertas pembungkus (kertas kopi). Kemudian disterilkan menggunakan oven pada suhu 160°C selama 60 menit. Seluruh media, lidi kapas disterilisasi 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 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 H₂SO₄ 1% dengan 0,05 ml larutan BaCl₂·2H₂O 1% sehingga volume menjadi 10 ml. dikocok hingga homogen (Soemarno, 2000).

4) Pembuatan NaCl 0,85%

Ditimbang 0,85 gram NaCl kemudian 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. Kemudian ditimbang, diaduk, lalu dipanaskan di atas 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 ± 4 mm dan biarkan mengeras (Soemarno, 2000).

6) Uji Sterilisasi Media

Media yang sudah 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 di inkubasi 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, 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 Daun Kersen

a) Identifikasi bahan uji daun kersen (*Muntingia calabura* L.) di Laboratorium Botani Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Lampung.

b) Pembuatan Simplisia

Sampel Daun Kersen sebanyak 3kg diambil dalam kondisi yang segar dan tidak berjamur, kemudian dicuci dengan air mengalir dan ditiriskan. Daun kersen dikeringkan (pengeringan dilakukan secara tidak langsung menggunakan wadah yang ditutup dengan kain hitam). 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 Daun Kersen

Simplisia yang telah dihaluskan dimasukan kedalam wadah lalu ditambahkan etanol 96% sebanyak 1000 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% 1000 mL lagi, diaduk dengan batang pengaduk lalu di amkan 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 20%, 35%, 50%, 65%, 80% dari larutan induk menggunakan rumus pengenceran (Manu, 2013).

11) Pelaksanaan Uji Daya Hambat

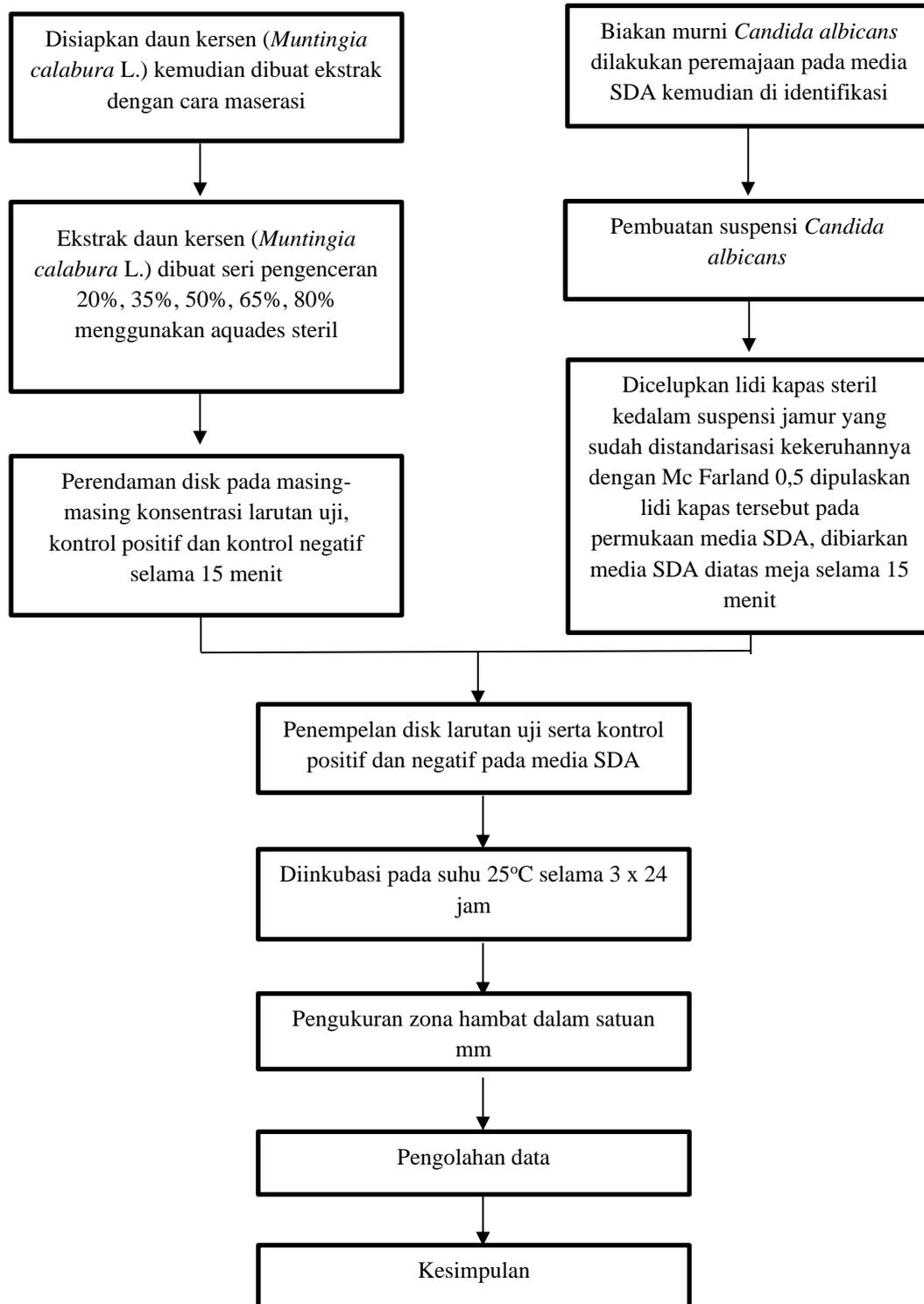
a) Disiapkan media agar SDA (Saboraud Dextrose Agar) yang telah mengeras

- 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 daun kersen, 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 15mm.
- 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 daun kersen (*Muntingia calabura* L.) 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

1. Pengolahan Data

Data diperoleh dengan cara:

- a. Dilakukan pengujian ekstrak daun kersen konsentrasi 20%, 35%, 50%, 65%, 80% terhadap pertumbuhan jamur *Candida albicans*.
- b. Dilakukan pengukuran zona hambat dari masing-masing konsentrasi menggunakan alat ukur dan satuan mm.
- c. Data zona hambat yang diperoleh disajikan dalam bentuk tabel.

2. Analisis Data

Data berupa diameter zona hambat pada masing-masing konsentrasi ekstrak daun kersen dianalisis menggunakan uji ANOVA (*Analysis Of Variances*) jika 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 menimbulkan bahaya bagi lingkungan, karena limbah yang dihasilkan dari proses penelitian ini dikumpulkan dan dimusnahkan dalam penanganan limbah. Limbah ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura* L.) ditangani dengan cara langsung dibuang pada saluran pembuangan, karena limbah larutan tidak berbahaya bagi lingkungan. Limbah suspensi jamur *Candida albicans* pada tabung dan limbah media Sabouraud Dextrose Agar Plate dimusnahkan dengan cara perebusan pada suhu 100°C selama 30 menit, air bekas rebusan dibuang pada saluran pembuangan, Kemudian tabung dan plate direbus kembali dengan penambahan detergen, Setelah itu air bekas rebusan dibuang pada saluran pembuangan, Setelah itu tabung dan plate yang telah digunakan dicuci menggunakan detergen dan dibilas dengan air mengalir. Surat pernyataan layak etik terdapat pada lampiran 11.