

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Metode yang dilakukan dalam penelitian ini adalah eksperimental (*true experimental*) dengan rancangan *Posttest-Only with Control Group Design*. Kelompok perlakuan yang diujikan adalah sediaan rebusan daun buas-buas pada konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100% untuk pengujian aktivitas antijamur. Ketokonazol sebagai kontrol positif dan aquadest steril sebagai kontrol negatif. Parameter yang diamati adalah zona hambat yang terukur dari uji aktivitas antijamur *Candida albicans* pada media *Saboraud Dextrose Agar* (SDA) setelah mendapat perlakuan uji. Jumlah pengulangan untuk setiap kelompok diperoleh dari hasil perhitungan menggunakan rumus *Federer*.

$$(t-1)(n-1) \geq 15$$

$$(7-1)(n-1) \geq 15$$

$$6(n-1) \geq 15$$

$$6n - 6 \geq 15$$

$$6n \geq 15+6$$

$$6n \geq 21$$

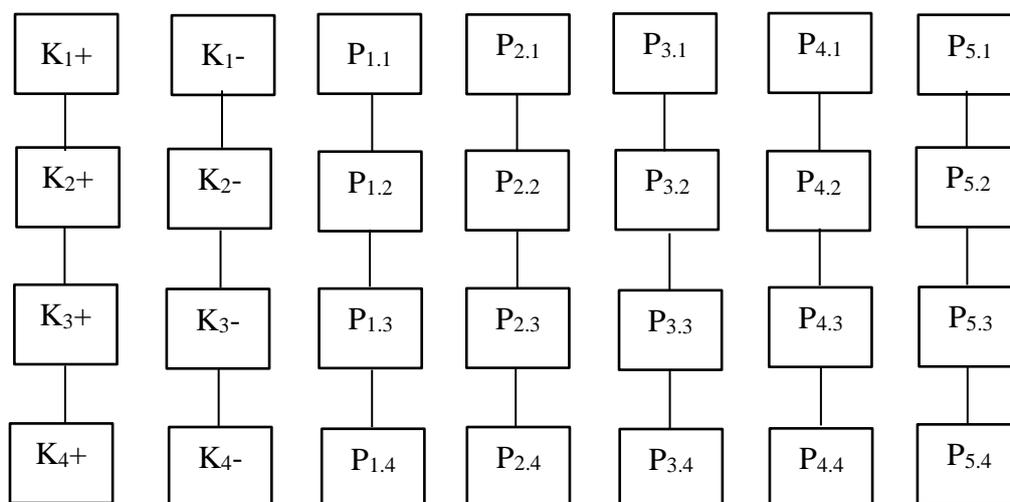
$$n \geq 4$$

Keterangan:

t = banyak perlakuan yang dilakukan

n= banyak pengulangan

Berdasarkan perhitungan rumus Federer tersebut, maka diketahui jumlah perlakuan adalah minimal 3 kali pengulangan.



Gambar 12. Skema Penelitian

Keterangan:

K₊ : Kontrol positif (Ketokenazol)

K₁₋ : Kontrol negatif (Aquadest)

P₁ : Perlakuan 1 dengan konsentrasi rebusan daun buah-buas 20%

P₂ : Perlakuan 2 dengan konsentrasi rebusan daun buah-buas 40%

P₃ : Perlakuan 3 dengan konsentrasi rebusan daun buah-buas 60%

P₄ : Perlakuan 4 dengan konsentrasi rebusan daun buah-buas 80%

P₅ : Perlakuan 5 dengan konsentrasi rebusan daun buah-buas 100%

3.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

3.2.1 Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia dan Mikrobiologi Akademi Analis Kesehatan Borneo Lestari.

3.2.2 Waktu Penelitian

Waktu penelitian dilakukan pada bulan Maret sampai Agustus 2022.

3.3 Populasi dan Sampel

Sampel penelitian ini adalah sediaan rebusan daun buah-buahan pada beberapa konsentrasi uji. Subjek penelitian ini adalah isolat jamur *Candida albicans*, yang berasal dari Laboratorium Kesehatan Daerah Provinsi Kalimantan Selatan.

3.4 Variabel Penelitian

3.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi rebusan daun buah-buahan (*Premna cordifolia Linn*).

3.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah aktivitas antijamur terhadap *Candida albicans* secara in vitro pada rebusan daun buah-buahan (*Premna cordifolia Linn*).

3.4.3 Variabel Terkendali

Variabel terkendali pada penelitian ini adalah waktu dan suhu.

3.5 Definisi Operasional

Tabel 3. Definisi Operasional Aktivitas Antijamur terhadap *Candida albicans* Secara In Vitro Pada Rebusan Daun Buas-Buas (*Premna cordifolia* Linn).

Variabel	Definisi Operasional	Parameter	Alat Ukur	Kategori	Skala Data
Efektivitas rebusan daun buas-buas (<i>Premna cordifolia</i> Linn) dengan konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80% dan 100%	Kemampuan zat yang terkandung dalam rebusan rebusan daun buas-buas (<i>Premna serratifolia</i> L.) dengan konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80% dan 100%	Uji aktivitas	Jangka sorong	(+) zona bening	Nominal
Aktivitas jamur <i>Candida albicans</i>	Daerah bening di sekitar cakram kertas pada permukaan media agar yang menandakan adanya aktivitas antijamur	Uji akt	Observasi laboratorium (mm)	1. Resisten 2. Intermediate 3. Susceptible	Ordinal

3.6 Alat dan Bahan Penelitian

3.6.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah korek api, kompor, panci, kapas, lidi steril, osse steril, pinset, pipet tetes, pipet ukur, kain flanel, spatula, sendok porselen, jangka sorong, corong, tabung reaksi (*Pyrex Brand*®), meja *laminary air flow* (*Holten Maxisafe*®), cawan petri, *aluminium foil vernier caliper*, gelas

Erlenmeyer (IWAKI®), gelas beker, lampu spiritus, *autoclave* (All American®), inkubator aerob (*Carbolite*®), dan lemari asam.

3.6.2 Bahan Penelitian

Bahan penelitian yang digunakan adalah daun buah-buas yang diambil secara langsung di Amuntai Hulu Sungai Utara. Bahan Isolat *Candida albicans* yang tumbuh pada media *Saboraud Dekstrosa Agar* (SDA), larutan NaCl, aquadest steril, obat antijamur ketokonazol 200 mg, Larutan Barium Clorida (BaCl_2), *colony counter* dan larutan standar *Mc Farland I* (setara jumlah bakteri sebesar 3×10^8 CFU/mL).

Bahan-bahan yang digunakan untuk uji fitokimia pada penelitian ini adalah aquadest, daun buah-buas (*Premna cordifolia* Linn), serbuk Mg, HCl pekat, H_2SO_4 pekat, larutan pereaksi Mayer, larutan pereaksi Dragendorff, larutan pereaksi wagner, HCl 2 N, larutan FeCl_3 10%, FeCl_3 1%, larutan NaCl, gelatin 1%, kloroform, asam asetat anhidrat, dan pereaksi Lieberman Burchard.

3.7 Prosedur Penelitian

3.7.1 Spesifikasi dan Determinasi Tumbuhan

Daun buah-buas diambil dan dikumpulkan sebanyak 1 kg, daun yang tua, tidak rusak, tidak busuk, dan tidak layu, secara langsung memetik dari tempat tumbuhnya di Amuntai Hulu Sungai Utara, Kalimantan Selatan. Spesifikasi taksonomi dan determinasi

spesies tanaman buah-buahan akan di Laboratorium Dasar FMIPA ULM.

3.7.2 Persiapan Peralatan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini dilakukan pencucian terlebih dahulu dengan air mengalir sampai bersih dan selanjutnya dikeringkan. Setelah itu dilakukan sterilisasi dalam *autoclave* pada suhu 121°C pada tekanan 2 atm selama 15 menit, dan dibungkus dengan *aluminium foil*.

3.7.3 Pembuatan Sediaan Rebusan Daun Buah-Buahan

Daun buah-buahan ditimbang sebanyak 100 g, kemudian daun buah-buahan dibersihkan dari kotoran yang menempel dan dicuci sampai bersih dengan air mengalir. Selanjutnya daun buah-buahan dirajang menjadi potongan yang lebih kecil. Selanjutnya, daun buah-buahan direbus dengan menambahkan aquadest sebanyak 100 ml dengan suhu 100°C (konsentrasi 100%) sampai mendidih dan tersisa sebanyak 100 ml selama ±10 menit (Fatmalia & Dewi, 2018). Setelah itu, didinginkan dan dilakukan penyaringan menggunakan kertas saring sampai larutan terpisah dan memperoleh larutan uji. Kemudian larutan uji dimasukkan ke dalam beaker glass steril dan menutupi dengan kapas. Selanjutnya dilakukan pembuatan konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80% dan 100% dalam 10 ml volume/volume (v/v) sebagai berikut (Kurniawan, 2015; Mardiana *et al.*, 2019):

- a. Konsentrasi 20% = 2 mL air rebusan daun buah-buas dipipet + 8 mL aquades steril pada tabung reaksi dan ditutupi dengan kapas.
- b. Konsentrasi 40% = 4 mL air rebusan daun buah-buas dipipet + 6 mL aquades steril pada tabung reaksi dan ditutupi dengan kapas.
- c. Konsentrasi 60% = 6 mL air rebusan daun buah-buas dipipet + 4 mL aquades steril pada tabung reaksi dan ditutupi dengan kapas.
- d. Konsentrasi 80% = 8 mL air rebusan daun buah-buas dipipet + 2 mL aquades steril pada tabung reaksi dan ditutupi dengan kapas.
- e. Konsentrasi 100% = 10 mL air rebusan daun buah-buas pada tabung reaksi dan menutupi dengan kapas.

3.7.4 Pembuatan Larutan Ketokonazol

Larutan kontrol positif yang digunakan yaitu ketokonazol dengan konsentrasi 50 µg/50 mL. Larutan ini dibuat dengan cara tablet ketokonazol digerus dan ditimbang sehingga diperoleh serbuk ketokonazol setara dengan 50 mg ketokonazol. Kemudian serbuk ketokonazol dicampurkan dan dilarutkan dalam 50 mL Na CMC 1%. Selanjutnya larutan diambil menggunakan mikropipet sebanyak 25 µl dan dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL, kemudian larutan ditambahkan Na CMC sampai tanda batas.

3.7.5 Uji Skrinning Fitokimia Daun Buas-Buas

Skrining fitokimia dilakukan untuk mengetahui senyawa-senyawa yang terkandung dalam rebusan daun buas-buas. Skrining fitokimia pada rebusan daun buas-buas meliputi identifikasi alkaloid, fenol, triterpenoid, steroid, flavonoid, tanin dan saponin secara kualitatif.

a. Uji Flavonoid

Pengujian flavonoid dengan cara 2 mL rebusan daun buas-buas dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Selanjutnya ditambahkan 2 mg serbuk Mg dan 1 mL HCl pekat. Flavonoid positif menunjukkan dengan adanya perubahan warna merah, kuning, atau jingga (Khairiah *et al.*, 2018; Ramadhan *et al.*, 2020; Fajerin, 2021).

b. Uji Alkaloid

Pengujian alkaloid dengan cara 2 mL rebusan daun buas-buas dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 3-5 tetes H_2SO_4 pekat, kemudian dikocok hingga terbentuk dua lapisan. Larutan untuk uji alkaloid terbagi menjadi 3 reagen yaitu filtrat 1 dengan ditambahkan 2-3 tetes larutan pereaksi Mayer. Terbentuk endapan warna putih menunjukkan terdapat alkaloid. Filtrat 2 dengan ditambahkan 2-3 tetes larutan pereaksi Dragendorff. Terbentuk endapan merah jingga menunjukkan terdapat

alkaloid. Filtrat 3 dengan ditambahkan 2-3 tetes larutan pereaksi wagner. Terbentuk endapan coklat menunjukkan terdapat alkaloid (Ainia, 2017; Fajerin, 2021; Ramadhan *et al.*, 2020).

c. Uji Saponin

Pengujian saponin dengan cara 2 mL rebusan daun buas-buas dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 10 mL aquadest, kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 detik dan selanjutnya dibiarkan selama 10 menit. Setelah itu ditambahkan 1 mL HCl 2 N ke dalam tabung reaksi yang berisi sampel. Sampel dinyatakan positif apabila buih yang terbentuk stabil setelah penambahan HCl selama 1 menit (Ainia, 2017; Ramadhan *et al.*, 2020; Fajerin, 2021)

d. Uji Fenol

Pengujian fenol dengan cara 2 mL rebusan daun buas-buas dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Selanjutnya ditambahkan 2 tetes larutan FeCl_3 10%, kemudian diamati hingga terjadi perubahan warna, jika berubah menjadi warna hijau, merah, ungu, biru atau hitam, berarti adanya senyawa fenol (Leonardy *et al.*, 2017; Ramadhan *et al.*, 2020; Fajerin, 2021).

e. Uji Tanin

Pengujian tanin dengan cara 2 mL rebusan daun buas-buas dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Selanjutnya ditambahkan larutan FeCl_3 . Hasil positif menunjukkan adanya endapan berwarna hitam kehijauan (Ainia, 2017; Leonardy *et al.*, 2017; Khairiah *et al.*, 2018; Fajerin, 2021).

f. Uji Terpenoid dan Steroid

Pengujian terpenoid dan steroid dengan cara 2 mL rebusan daun buas-buas ditambahkan 2 mL kloroform dan 10 tetes asam asetat anhidrat serta 2-3 tetes H_2SO_4 pekat (pereaksi *Lieberman Burchard*) melalui dinding tabung. Terbentuk warna biru sampai hijau menunjukkan adanya steroid sedangkan terbentuk cincin kecoklatan menandakan adanya terpenoid, sedangkan terbentuknya warna merah atau ungu menandakan mengandung triterpenoid (Ainia, 2017; Ramadhan *et al.*, 2020; Fajerin, 2021).

3.7.6 Pembuatan Media *Saboraud Dekstrosa Agar* (SDA)

Saboraud Dekstrosa Agar (SDA) ditimbang sebanyak 30 gram, lalu dilarutkan dalam 1 Liter air destilasi sampai diperoleh suspensi yang homogen dan dipanaskan selama 1 menit. Kemudian suspensi disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C , tekanan 2 atm selama 15 menit. Kemudian media tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Munawwaroh, 2016; Lilianny, 2018).

3.7.7 Uji Aktivitas Antifungi *Candida albicans* terhadap Rebusan Daun Buas-Buas

a. Pembuatan Stok Kultur Jamur *Candida albicans*

Pembuatan stok kultur jamur *Candida albicans* dengan cara diambil satu ose koloni jamur *Candida albicans* menggunakan jarum ose steril, selanjutnya dilakukan penanaman pada media *Saboraud Dekstrosa Agar* (SDA) miring dengan cara digores, lalu diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 48 jam.

b. Pembuatan Larutan Standar *McFarland* No. 0,5

Larutan standar *McFarland* dibuat dengan 0,5 mL larutan BaCl₂ 0,048 M dicampurkan 99,5 mL larutan H₂SO₄ 0,18 M dalam tabung reaksi steril, selanjutnya dikocok sampai menjadi homogen kemudian ditutup. Apabila kekeruhan hasil suspensi mikroba sama dengan kekeruhan larutan standar *McFarland*, berarti hal ini menunjukkan konsentrasi mikroba 10⁸ CFU/ml (*McFarland*, 2010).

c. Pembuatan Inokulum Jamur

Pengambilan koloni jamur dari stok kultur jamur dengan jarum ose steril lalu disuspensi ke dalam tabung reaksi yang berisi 10 mL larutan media cair SDB. Koloni jamur tersebut akan dilakukan suspensi ke dalam tabung yang berisi 10 mL larutan SDB hingga mendapat kekeruhan yang sama dengan standar 0,5 *Mc. Farland*.

d. Pengujian Aktivitas Antifungi

Uji aktivitas antifungi dengan menggunakan metode dilusi padat. Menyiapkan alat dan bahan yang sudah disterilisasi. Sebanyak 5 cawan petri dan diberi label sesuai konsentrasi (cawan petri 1 konsentrasi 20%, cawan petri 2 konsentrasi 40%, cawan petri 3 konsentrasi 60%, cawan petri 4 konsentrasi 80% dan cawan petri 5 konsentrasi 100%), kontrol positif dan kontrol negatif.

- 1) Cawan petri 1: air rebusan daun buah-buahan konsentrasi 20% dipipet sebanyak 1ml + 1ml suspensi jamur *Candida albicans* dan ditambah media SDA yang telah diencerkan kemudian dihomogenkan dan biarkan membeku.
- 2) Cawan petri 2: air rebusan daun buah-buahan konsentrasi 40% dipipet sebanyak 1ml + 1ml suspensi jamur *Candida albicans* dan ditambah media SDA yang telah diencerkan kemudian dihomogenkan dan biarkan membeku.
- 3) Cawan petri 3: air rebusan daun buah-buahan konsentrasi 60% dipipet sebanyak 1ml + 1ml suspensi jamur *Candida albicans* dan ditambah media SDA yang telah diencerkan kemudian dihomogenkan dan biarkan membeku.
- 4) Cawan petri 4: air rebusan daun buah-buahan konsentrasi 80% dipipet sebanyak 1ml + 1ml suspensi jamur *Candida*

albicans dan ditambah media SDA yang telah diencerkan kemudian dihomogenkan dan biarkan membeku.

- 5) Cawan petri 5: air rebusan daun buah-buahan konsentrasi 100% dipipet sebanyak 1ml + 1ml suspensi jamur *Candida albicans* dan ditambah media SDA yang telah diencerkan kemudian dihomogenkan dan biarkan membeku.

Larutan kontrol positif menggunakan kentokonazol dan kontrol negatif menggunakan aquadest. Pelakuan terhadap larutan kontrol positif dan kontrol negatif sama dengan perlakuan konsentrasi larutan uji rebusan daun buah-buahan. Setelah itu, masukan semua cawan petri ke dalam inkubator pada suhu 37⁰C selama 2 hari dan diamati pertumbuhan koloni menggunakan *colony counter*, serta didokumentasikan.

3.8 Pengumpulan Data dan Pengolahan Data

Data dalam penelitian ini berupa hasil perhitungan zona hambat pertumbuhan *Candida albicans* pada 7 perlakuan masing-masing data dicatat dalam tabel dan tiap perlakuan untuk uji aktivitas antifungi. Kemudian dilakukan pengolahan dengan analisis statistik.

3.9 Penyajian Data

Data disajikan dalam bentuk tabel dan diagram dari hasil menghitung pertumbuhan koloni jamur.

3.10 Analisa Data

Analisis data yaitu besaran diameter zona hambat dilakukan menggunakan uji statistik SPSS. Hasil dari perhitungan jumlah pertumbuhan koloni *Candida albicans* dari 7 perlakuan, dilakukan tabulasi. Untuk mengetahui kenormalan distribusi data dan homogenitas data dilakukan uji distribusi normal. Uji *Shapiro-Wilk*, menggunakan uji *Shapiro-Wilk* karena jumlah sampel yang diuji kecil (<50) dan diuji homogenitas varians menggunakan uji *Levene's test*. Hasil uji normalitas data diperoleh 2 nilai sig yaitu ($<0,05$) dan ($>0,05$) yang berarti tidak berdistribusi normal. Uji homogenitas data diperoleh nilai sig ($>0,05$) yang berarti data bersifat homogen, sehingga analisis nonparametrik menggunakan uji *Kruskal-Wallis* pada tingkat kepercayaan 95% dan hasilnya berbeda bermakna maka dilakukan uji lanjut menggunakan uji *Mann Whitney*.