

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah eksperimental dengan desain *post test only with control group design* dengan melakukan pemberian ekstrak daun rambutan (*Nephelium lappaceum* Linn) terhadap jamur *Candida albicans*, yaitu merupakan suatu metode untuk mengetahui pengaruh yang timbul sebagai akibat adanya perlakuan yang dilakukan pada objek penelitian di laboratorium, dimana dalam hal ini untuk mengetahui Pengaruh ekstrak daun rambutan (*Nephelium lappaceum* Linn) terhadap daya hambat jamur *Candida albicans* secara *in vitro*. Desain dan rancangan penelitian adalah sebagai berikut :

Sampel	Kelompok	Perlakuan	Post test
(R)	Kontrol	P (0)	O (0)
	Eksperimen	P (1)	O (1)
		P (2)	O (2)

Gambar 3.1 Rancangan Penelitian
(Sumber : Arifin, 2009)

Keterangan :

R : Random

P(0) : Pemberian cakram daun rambutan 0 %

P(1) : Pemberian ekstrak daun rambutan 50 %

P(2) : Pemberian ekstrak daun rambutan 100 %

O(0) : Observasi zona hambat *Candida albicans* setelah pemberian ekstrak daun rambutan 0%

O(1) : Observasi zona hambat *Candida albicans* setelah pemberian ekstrak daun rambutan 50%

O(2) : Observasi zona hambat *Candida albicans* setelah pemberian ekstrak daun rambutan 100%

3.2 Populasi dan Sampel penelitian

3.2.1 Populasi penelitian

Populasi dalam penelitian ini adalah jamur *Candida albicans* dalam media pertumbuhan. Jamur *Candida albicans* yang ditumbuhkan berasal dari biakan murni yang diperoleh dari Balai Besar Laboratorium Kesehatan (BBLK) surabaya.

3.2.2 Sampel penelitian

Sampel pada penelitian ini diambil secara acak atau random dengan cara membuat suspensi biakan murni jamur *Candida albicans* dan disamakan dengan standar Mac Farland 0,5 yang setara dengan $1,5 \times 10^8$ CFU/ml, dengan jumlah replikasi 12 yang ditentukan dengan rumus berikut :

$$(r - 1)(k - 1) \geq 15$$

$$(r - 1)(3 - 1) \geq 15$$

$$(r - 1)2 \geq 15$$

$$2r - 2 \geq 15$$

$$2r \geq 15 + 2$$

$$r \geq \frac{17}{2}$$

$$r \geq 8,5$$

$$r \geq 9$$

(Federer dalam Riki, 2014)

Keterangan :

r : Replikasi atau pengulangan

t : perlakuan

Dari rumus di atas diperoleh replikasi minimal adalah 9, untuk memperkecil taraf kesalahan jumlah replikasi di tambah menjadi 12 replikasi. Pada penelitian ini setiap plate dipipet 0,2 ml suspensi jamur yang sudah setara dengan standar Mac Farland 0,5 sehingga dalam setiap plate terdapat jamur *Candida albicans* sebanyak 3×10^7 CFU yang dibagi menjadi 3 perlakuan, sehingga setiap perlakuan membutuhkan 1×10^7 CFU. dalam penelitian ini menggunakan 3 perlakuan dan 12 replikasi, jadi keseluruhan jumlah koloni yang digunakan dalam penelitian ini sebanyak $1 \times 10^7 \times 3 \times 12 = 36 \times 10^7$ atau 360.000.000 koloni.

3.3 Lokasi dan waktu penelitian

3.3.1 Lokasi penelitian

Lokasi penelitian sampel dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Prodi D3 Analis Kesehatan Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Surabaya Jl Sutorejo 59 Surabaya.

3.3.2 Waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Desember 2016 sampai dengan Juli 2017. Sedangkan waktu pemeriksaan sampel dilakukan pada bulan April 2017.

3.4 Variabel penelitian dan definisi operasional

3.4.1 Variabel penelitian

1. Variabel bebas : Konsentrasi Ekstrak daun Rambutan (*Nephelium lappaceum* Linn)
2. Variabel terikat : Zona hambat Jamur *Candida albicans*.
3. Variabel kontrol :
 1. Jumlah koloni jamur *Candida albicans*
 2. Waktu inkubasi jamur *Candida albicans*
 3. Suhu inkubasi jamur *Candida albicans*
 4. Volume suspensi jamur *Candida albicans*
 5. Metode pengukuran daya hambat jamur *Candida albicans*.

3.4.2 Definisi operasional

1. Pemberian ekstrak daun Rambutan (*Nephelium lappaceum* Linn) dalam penelitian ini dikategorikan menjadi :
 1. Pemberian ekstrak daun Rambutan (*Nephelium lappaceum* Linn) dengan konsentrasi 0 % yaitu media pertumbuhan *Candida albicans* diberi cakram kertas yang tidak mengandung ekstrak daun rambutan (*Nephelium lappaceum* Linn).
 2. Pemberian ekstrak daun Rambutan (*Nephelium lappaceum* Linn) dengan konsentrasi 50 % yaitu media pertumbuhan *Candida albicans* diberi cakram kertas yang mengandung ekstrak daun Rambutan (*Nephelium lappaceum* Linn) 50 % dan 50 % aquadest.
 3. Pemberian ekstrak daun Rambutan (*Nephelium lappaceum* Linn) dengan konsentrasi 100 % yaitu media pertumbuhan *Candida albicans*

diberi cakram kertas yang mengandung ekstrak daun Rambutan (*Nephelium lappaceum* Linn) 100 %.

2. Zona hambat pertumbuhan *Candida albicans* adalah terbentuknya daerah hambatan atau adanya zona jernih yang ada di sekeliling cakram kertas berupa ukuran diameter jernih. Zona hambat pertumbuhan *Candida albicans* dalam penelitian ini berupa angka yang menunjukkan diameter zona hambat yang diukur dalam satuan milimeter menggunakan penggaris
3. Jumlah koloni jamur *Candida albicans* pada setiap plate adalah 3×10^7 CFU
4. Suhu inkubasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah 37°C
5. Waktu inkubasi jamur *Candida albicans* adalah 24 jam
6. Metode pengukuran yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode difusi cakram kertas (*paper disk diffusion method*)

3.5 Teknik pengumpulan data

3.5.1 Metode pengumpulan data

Data zona hambat diperoleh dari hasil uji Laboratorium yang menggunakan metode difusi cakram kertas (*paper disk diffusion method*), dengan mengamati area zona jernih di sekeliling cakram kertas.

3.5.2 Prinsip pemeriksaan

Cakram kertas yang mengandung ekstrak daun Rambutan (*Nephelium lappaceum* Linn) diletakkan diatas media *Sadaroud Dektose Agar* (SDA) yang telah ditanami *Candida albicans*, kemudian diinkubasi dengan suhu 37°C selama 24 jam. Selanjutnya diamati area zona jernih disekeliling cakram kertas dan

mengukur diameter zona jernih, zona jernih menunjukkan tidak adanya pertumbuhan *Candida albicans*.

3.5.3 Alat penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah plate / petridisk, tabung reaksi, autoclave, oven, soxhlet, statif, klem, refluks, labu ekstraksi, kondensor, labu destilasi, termometer, waterbath, kertas saring (Whatman), lampu spiritus, Beaker glass, inkubator, neraca analitik, filler, mortal, stamper, erlenmeyer, ose, bulat, penggaris dan pipet ukur.

3.5.4 Bahan penelitian

1. Cakram kertas yang mengandung ekstrak daun Rambutan (*Nephelium lappaceum* Linn) dengan konsentrasi 0 %, 50 % dan 100 %
2. Media *Sadaroud Dektose Agar* (SDA)
3. Aquadest steril
4. PZ steril

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

Semua alat dan bahan yang akan digunakan dalam penelitian ini sebelumnya disteril dalam autoclave. Sterilisasi dalam autoclave dilakukan dalam suhu 121° C selama 15 menit. Berdasarkan buku petunjuk praktikum mikrobiologi prosedur sterilisasi menggunakan autoclave sebagai berikut :

1. Memasukkan air secukupnya kedalam bejana.
2. Memasang pemanasnya.
3. Masukkan alat dan bahan yang akan disteril kedalam bejana dan pasang pengunci autoclave.
4. Membuka klep angin sampai udara yang ada di dalam bejana keluar.
5. Menutup klep angin dan pertahankan dalam suhu 121° C selama 15 menit
6. Matikan pemanas, biarkan suhu turun dan membuka klep angin agar tekanan udara didalam autoclave turun.
7. Buka autoclave saat suhunya tepat pada 0° C.

3.6.2 Pembuatan ekstrak daun rambutan (*Nephelium lappaceum* Linn)

3.6.2.1 Pengeringan dan pembuatan serbuk daun rambutan (*Nephelium lappaceum* Linn)

Alat yang digunakan :

Alat yang digunakan dalam prosen pengeringan dan pembuatan serbuk daun rambutan (*Nephelium lappaceum* Linn) adalah gunting, blender, oven dan kasa penyaring.

Bahan yang digunakan :

Bahan yang digunakan dalam proses pengeringan dan pembuatan serbuk daun rambutan (*Nephelium lappaceum* Linn) adalah daun rambutan (*Nephelium lappaceum* Linn).

Prosedur pengeringan dan pembuatan serbuk daun rambutan (*Nephelium lappaceum* Linn)

1. Mengambil daun rambutan yang sudah matang
2. Memotong daun rambutan menjadi berukuran lebih kecil untuk mengoptimalkan penguapan air

3. Kemudian daun rambutan (*Nephelium lappaceum* Linn) dihilangkan kadar air dalam tanaman agar reaksi enzimatik dapat dihentikan sehingga tidak mudah rusak
4. Menghilangkan kadar air daun rambutan (*Nephelium lappaceum* Linn) memakai oven dengan suhu 60° C selama 24 jam.
5. Setelah kering daun rambutan (*Nephelium lappaceum* Linn) menghaluskan dengan cara memblender dan mengayak sehingga didapat serbuk halus daun rambutan (*Nephelium lappaceum* Linn).

3.6.2.2 Pembuatan ekstrak daun rambutan (*Nephelium lappaceum* Linn) dengan Metode Soxhletasi

Alat yang digunakan :

Alat yang digunakan dalam pembuatan ekstrak daun rambutan (*Nephelium lappaceum* Linn) adalah : soxhlet, selang, kondensor, labu ekstraksi, waterbath, statif, klem dan termometer.

Bahan yang digunakan :

Bahan yang digunakan dalam pembuatan ekstrak daun rambutan (*Nephelium lappaceum* Linn) adalah daun rambutan (*Nephelium lappaceum* Linn), dan Etanol 96 %.

Prosedur ekstraksi metode soxhletasi

1. Menyiapkan rangkaian ekstraksi soxhlet.
2. Menimbang 100 gram serbuk halus daun rambutan (*Nephelium lappaceum* Linn) dan Bungkus bahan ekstraksi dengan kertas saring dan masukkan kedalam soxhlet.
3. Masukkan 400 ml etanol 96% kedalam labu ekstraksi.

4. Memanaskan pelarut menggunakan waterbath dengan suhu 70 - 80° C,
5. Matikan pemanas setelah siklus etanol menjadi jernih.

3.6.2.3 Pembuatan ekstrak kental daun rambutan (*Nephelium lappaceum* Linn) dengan metode destilasi

Alat yang digunakan :

Alat yang digunakan dalam Pembuatan ekstrak kental daun rambutan (*Nephelium lappaceum* Linn) adalah labu destilasi, kondensor, selang, waterbath, karet penutup, statif, klem, beaker glass dan termometer

Bahan yang digunakan :

Bahan yang digunakan dalam Pembuatan ekstrak kental daun rambutan (*Nephelium lappaceum* Linn) adalah ekstrak etanol daun rambutan (*Nephelium lappaceum* Linn).

Prosedur destilasi

1. Menyiapkan rangkaian alat destilasi
2. Memindahkan hasil ekstraksi daun rambutan (*Nephelium lappaceum* Linn) dari labu ekstraksi kedalam labu destilasi.
3. Melakukan proses destilasi dengan suhu 75° C
4. Lakukan proses destilasi sampai tidak ada destilat yang menetes dari kondensor

3.6.2.4 Pembuatan konsentrasi ekstrak daun rambutan (*Nephelium lappaceum* Linn)

Alat yang digunakan :

Alat yang digunakan dalam Pembuatan konsentrasi ekstrak daun rambutan (*Nephelium lappaceum* Linn) adalah pipet ukur, filler dan tabung reaksi.

Bahan yang digunakan :

Bahan yang digunakan dalam Pembuatan konsentrasi ekstrak daun rambutan (*Nephelium lappaceum* Linn) adalah ekstrak kental daun rambutan (*Nephelium lappaceum* Linn) dan aquadest steril.

Prosedur pembuatan konsentrasi ekstrak daun rambutan (*Nephelium lappaceum* Linn) dengan metode destilasi

1. Konsentrasi ekstrak daun rambutan (*Nephelium lappaceum* Linn) 0%
Memipet 10 ml aquadest steril tanpa memberi ekstrak daun rambutan (*Nephelium lappaceum* Linn).
2. Konsentrasi ekstrak daun rambutan (*Nephelium lappaceum* Linn) 50%
Memipet 5 ml aquadest steril ditambah 5 ml ekstrak kental daun rambutan (*Nephelium lappaceum* Linn).
3. Konsentrasi ekstrak daun rambutan (*Nephelium lappaceum* Linn) 100%
Memipet 10 ml ekstrak kental daun rambutan (*Nephelium lappaceum* Linn) tanpa ditambah aquadest steril.

3.6.3 Pembuatan media *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA)

Alat yang digunakan :

Alat yang digunakan dalam pembuatan media *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) adalah Erlenmeyer, Beaker glass, Neraca analitik, Pipet pasteur, Autoclave, Hotplate dan Plate atau petridisk.

Bahan yang digunakan :

Bahan yang digunakan dalam pembuatan media *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) adalah Reagen Media *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA), Aquadest, NaOH 0,1 N dan HCL 0,1 N.

Prosedur Pembuatan Media *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA)

1. Menimbang 15,6 gram media *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA)
2. Kemudian melarutkan dalam 240 ml aquadest
3. Diaduk sambil dipanaskan sampai media larut dan didinginkan sampai kurang lebih suhu $\pm 25^{\circ}\text{C}$
4. Setelah suhu $\pm 25^{\circ}\text{C}$ dilakukan pengukuran PH sampai PH $5,6 \pm 0,2$
5. Apabila PH terlalu asam maka ditambah NaOH 0,1 N, apabila PH terlalu basa maka ditambah HCL 0,1 N sampai syarat PH tercapai
6. Setelah PH media SDA memenuhi syarat, kemudian mensteril media SDA dengan autoclave dengan suhu 151°C selama 15 menit
7. Setelah mensteril media SDA kemudian menuang media SDA ke plate yang sudah terlebih dahulu disteril.

3.6.4 Pembuatan standart Mac Farland 0,5.

Alat yang digunakan :

Alat yang digunakan dalam pembuatan standart Mac Farland 0,5 adalah Pipet ukur, Tabung reaksi dan Filler.

Bahan yang digunakan :

Bahan yang digunakan dalam pembuatan standart Mac Farland 0,5 adalah Asam Sulfat (H_2SO_4) 1%, Barium Klorida (BaCl_2) 1% dan Aquadest.

Prosedur Pembuatan Standart Mac Farland 0,5.

1. Memipet 0,05 ml Barium Klorida (BaCl_2) 1% kedalam tabung reaksi
2. Kemudian tambah 9,95 ml asam sulfat (H_2SO_4) 1%
3. Mencampur kedua larutan tersebut sehingga didapatkan standart Mac Farland 0,5 maka setara dengan jumlah spora jamur $1,5 \times 10^8$ CFU/ml

3.6.5 Pembuatan Suspensi Jamur *Candida albicans*

Alat yang digunakan :

Alat yang digunakan dalam Pembuatan Suspensi Jamur *Candida albicans* adalah tabung reaksi, ose bulat dan pipet pasteur.

Bahan yang digunakan :

Bahan yang digunakan dalam Pembuatan Suspensi Jamur *Candida albicans* adalah Koloni biakan murni jamur *Candida albicans* dan PZ steril.

Prosedur Pembuatan Suspensi Jamur *Candida albicans*

1. Mengisi tabung reaksi dengan 10 ml PZ steril
2. Menambahkan 1 mata ose biakan murni Jamur *Candida albicans*.

3. Bila suspensi jamur lebih keruh dari standart Mac Farland 0,5 maka ditambah PZ steril.
4. Jika suspensi jamur kekeruhannya kurang dari standart Mac Farland 0,5 maka ditambah koloni biakan murni jamur *Candida albicans*.

3.6.6 Pembuatan difusi cakram kertas ekstrak daun rambutan (*Nephelium lappaceum* Linn)

Alat yang digunakan :

Alat yang digunakan dalam pembuatan cakram kertas adalah Stampler atau pelubang kertas dengan diameter 6 mm.

Bahan yang digunakan :

Bahan yang digunakan dalam pembuatan cakram kertas adalah kertas saring whatman dan ekstrak daun rambutan (*Nephelium lappaceum* Linn)

Prosedur pembuatan difusi cakram kertas ekstrak daun rambutan (*Nephelium lappaceum* Linn)

1. Menyiapkan kertas saring Whatman.
2. Membuat cakram kertas dengan diameter 6 mm menggunakan stampler dengan cara menekan stempler pada kertas saring Whatman.
3. Mensteril cakram kertas yang sudah dibuat kedalam autoclave dengan suhu 121° C selama 15 menit.
4. Memasukkan cakram kertas kedalam ekstrak daun Rambutan (*Nephelium lappaceum* Linn) menggunakan pinset steril.
5. Kemudian direndam $\pm$ 2 jam untuk menjenuhkan ekstrak daun Rambutan (*Nephelium lappaceum* Linn) pada cakram kertas.

3.6.7 Penanaman jamur *Candida albicans* pada Media *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) dengan cara tebar (*Spread plate methode*)

Alat yang digunakan :

Alat penanaman jamur *Candida albicans* pada Media *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) adalah Api bunsen, filler, spatula bengkok dan pipet ukur.

Bahan yang digunakan :

Bahan penanaman jamur *Candida albicans* pada Media *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) adalah Media *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) suspensi jamur *Candida albicans* yang sudah setara dengan standart Mac Farland 0,5

Prosedur Penanaman Jamur *Candida albicans* pada Media *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA)

1. Memipet 0,2 ml suspensi jamur *Candida albicans* yang sudah setara dengan standart Mac Farland 0,5 dan letakkan di permukaan media SDA
2. Meratakan suspensi jamur *Candida albicans* dengan spatula bengkok dengan cara memutar spatula bengkok di permukaan media SDA
3. Meletakkan cakram kertas yang sudah mengandung ekstrak daun Rambutan (*Nephelium lappaceum* Linn) 0 %, 50 % dan 100 % diatas permukaan media *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA)
4. Kemudian diinkubasi dengan inkubator pada suhu 37° C selama 24 jam.



Keterangan :

K1 : Cakram kertas yang mengandung ekstrak daun rambutan 0 %

K2 : Cakram kertas yang mengandung ekstrak daun rambutan 50 %

K3 : Cakram kertas yang mengandung ekstrak daun rambutan 100 %

Gambar 3.2 : Skema penanaman jamur *Candida albicans* pada media Sabouraud Dextrose Agar (SDA) (Anonim, 2016)

3.6.8 Pengukuran zona hambat jamur *Candida albicans*

Alat yang digunakan :

Alat yang digunakan untuk pengukuran zona hambat jamur *Candida albicans* adalah penggaris dan bolpoin.

Bahan yang digunakan :

Bahan yang diukur adalah zona hambat jamur *Candida albicans* adalah koloni jamur yang sudah diberi perlakuan ekstrak daun rambutan (*Nephelium lappaceum* Linn) 0%, 50% dan 100%.

Prosedur pengukuran zona hambat jamur *Candida albicans*

1. Siapkan penggaris dan bolpoin
2. Mengukur diameter zona hambat jamur *Candida albican* secara horizontal dan vertikal
3. Menjumlah hasil pengukuran horizontal dan vertikal kemudian dibagi dua sehingga didapat nilai rata – rata dari zona hambat jamur *Candida albican*.
4. Mencatat hasil pengukuran zona hambat pertumbuhan jamur *Candida albican* dan membuat tabulasi.

3.7 Tabulasi Data

Untuk memperoleh data dan informasi, maka dari hasil penelitian secara eksperimental yang diperoleh dari zona hambat jamur *Candida albicans*, dengan tujuan untuk mengetahui perbedaan zona hambat jamur *Candida albicans* pada cakram kertas yang mengandung ekstrak daun Rambutan (*Nephelium lappaceum* Linn) pada konsentrasi 0%, 50% dan 100%.

Tabel 3.1 Contoh tabulasi data hasil penelitian tentang uji daya hambat ekstrak daun rambutan (*Nephelium lappaceum* Linn) terhadap jamur *Candida albicans* secara *in vitro*

No.	Replikasi	Konsentrasi Ekstrak Daun Rambutan (<i>Nephelium lappaceum</i> Linn)		
		0%	50%	100%
1	R1			
2	R2			
3	R3			
4	R4			
5	R5			
6	R6			
7	R7			
8	R8			
9	R9			
10	R10			
11	R11			
12	R12			
Jumlah				
Rata-rata				
SD				

3.8 Metode Analisis Data

Data zona hambat pertumbuhan jamur *Candida albicans* dianalisis dengan *One - Way ANOVA* untuk membandingkan zona hambat pertumbuhan jamur *Candida albicans* dengan ekstrak daun rambutan (*Nephelium lappaceum* Linn) pada konsentrasi 0%, 50% dan 100% pada tingkat kesalahan 5% ($\alpha = 0,05$).