

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni dengan desain Rancang Acak Lengkap (RAL) melalui pengujian aktivitas antijamur dari ekstrak daun kelor untuk mendapatkan konsentrasi hambat minimum (KHM) yang diperoleh secara maserasi menggunakan pelarut etanol terhadap jamur uji yang dikembangbiakkan secara *in vitro*. Pengujian dilakukan dengan metode difusi cakram. Pengamatan uji dilakukan dengan mengukur diameter daerah hambat menggunakan jangka sorong dengan satuan milimeter (mm).

Banyaknya pengulangan dalam penelitian dihitung menggunakan rumus Federer:

$(n-1)(t-1) \geq 15$; dengan t : jumlah kelompok, n : jumlah ulangan. Jumlah kelompok perlakuan adalah 5 dengan 2 kelompok kontrol (kontrol positif dan kontrol negatif). Dengan $t = 7$ maka didapatkan jumlah pengulangan yang dibutuhkan:

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

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

$$n \geq 3,5 \approx 4$$

Dari perhitungan tersebut, maka penelitian dapat dilakukan dengan pengulangan sebanyak 4 kali.

B. Tempat dan Waktu

Penelitian ini akan dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran, Laboratorium Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) dan Laboratorium Teknologi Hasil Hutan Fakultas Kehutanan. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari 2015 – April 2015.

C. Bahan Penelitian

C. 1. Bahan Uji

Daun kelor diambil di Desa Rasau Jaya, Kecamatan Rasau Jaya, Kabupaten Kubu Raya. Jamur uji yang digunakan pada penelitian ini adalah kultur murni *Candida albicans* yang merupakan koleksi dari Unit Laboratorium Kesehatan (ULK) Pontianak.

C. 2. Bahan Non-Kimia

Akuades, *aluminium foil*, kertas saring Whatman no. 1, kertas sampul cokelat, kain kasa, kapas, plastik tahan panas.

C. 3. Bahan Kimia

Ketokonazol 15 μ g/disk, *Dymethyl Sulfoxide* (DMSO) 10%, etanol 70%, spiritus, pereaksi Mayer, pereaksi Wagner, pereaksi Dragendorff, kalium iodida, magnesium (Mg), asam klorida (HCL) pekat, besi (III) klorida ($FeCl_3$) 5%, besi (III) klorida ($FeCl_3$) 1%, pereaksi Molisch, asam asetat (CH_3COOH) glasial, H_2SO_4 pekat, kloroform (CH_3Cl), *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA), Standar McFarland 0,5, larutan *Lactophenol Cotton Blue* (LPCB), larutan karbol gentian violet, larutan lugol, larutan alkohol 96%, larutan safranin, larutan fuchsin, larutan natrium klorida (NaCl) 0,9%.

D. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain pisau, wadah plastik, lemari pendingin, *blender*, sendok tanduk, *soxhlet* 500 mL *round bottom flask*, *extraction thimble for soxhlet glassware system* 25 mL, *vacuum rotary evaporator*, *water bath*, timbangan analitik, sendok *stainless*, *oven*, *hot plate*, inkubator, krusibel porselen, desikator, corong kaca, pinset, *Biological Safety Cabinet* (BSC), *Laminar Air Flow* (LAF) *cabinet*, autoklaf, labu ukur 25 mL dan 10 mL, gelas ukur 50 mL dan 10 mL, vial, erlenmeyer, *beaker glass*, cawan penguap, tabung reaksi, toples kaca, batang pengaduk, *object glass*, *cover glass*, cawan petri, pipet tetes, penggaris, prevorator, pecandang, pipet pasteur, batang L/drugal, jarum ose, mikroskop, sendok *stainless*, tip dan mikropipet, pembakar bunsen.

E. Variabel Penelitian

E. 1. Variabel Bebas

Variabel bebas yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak daun kelor dengan variasi konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80% dan 100%.

E. 2. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah diameter zona hambat jamur *C. albicans*.

E. 3. Variabel Kontrol

Variabel kontrol dalam penelitian ini adalah suhu, pH, waktu, dan media.

F. Definisi Operasional

F. 1. Ekstrak Etanol Daun Kelor

Ekstrak Etanol Daun Kelor adalah sediaan kental yang diperoleh dengan mengekstraksi simplisia daun kelor dengan menggunakan pelarut etanol, kemudian pelarut diuapkan. Metode pengukuran menggunakan konsentrasi ekstrak dengan skala kategorik ordinal.

F. 2. Ukuran Zona Hambat

Ukuran zona hambat adalah diameter zona bening atau zona pada media *Sabouraud Dextrose Agar* yang tidak ditumbuhi *C. albicans* setelah perlakuan ekstrak daun kelor dan ketokonazol. Menurut Hermawan *et al.* (2007), bahwa interpretasi daerah hambatan pertumbuhan antimikroba mengacu pada standar umum yang dikeluarkan Departemen Kesehatan (1998) disebutkan bahwa mikroba dikatakan peka terhadap antimikroba asal tanaman apabila mempunyai ukuran diameter daya hambatan sebesar 12-24 mm. Hasil dari pengukuran berupa diameter zona hambat dalam satuan milimeter (mm) dengan skala pengukuran numerik.

G. Prosedur kerja

G. 1. Penyediaan Bahan Baku

Penyediaan sampel penelitian berupa daun kelor diperoleh dari kebun di Desa Rasau Jaya, Kecamatan Rasau Jaya, Kabupaten Kubu Raya.

G. 2. Pembuatan Simplisia

Bahan baku didapat dengan cara memetik daun langsung dari pohonnya. Daun yang diambil dipilih dalam kondisi segar, berwarna hijau, dan tidak layu. Bahan baku dipilih ketika masih segar, sortasi dilakukan terhadap bagian lain dari tanaman yang tidak digunakan, bagian yang kotor dan bagian tanaman yang rusak. Bahan baku dibersihkan dari kotoran yang melekat dengan menggunakan sikat yang lembut dan dicuci dengan air mengalir dari sumber air Perusahaan Air Minum (PAM) sampai bersih.

Bahan baku dirajang kasar menjadi potongan-potongan kecil dan selanjutnya disiapkan untuk dimasukkan ke dalam oven. Bahan baku yang telah dirajang dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 50⁰C selama 2x24 jam. Bahan baku yang telah mengalami proses pengeringan dinamakan simplisia. Simplisia disortasi kering dengan cara memisahkannya dari simplisia yang gosong atau terkena kotoran. Dilakukan pengecilan ukuran dengan menggunakan blender dan disimpan di tempat yang kering dan bersih. Simplisia disimpan di dalam wadah yang kedap dan dijauhkan dari sinar matahari secara langsung.

G. 3. Pembuatan Ekstrak Daun Kelor

Sebanyak 181 g serbuk daun kelor dimaserasi dalam etanol 70% hingga simplisia terendam seluruhnya. Selanjutnya disaring dengan saringan kasar hingga diperoleh filtrat I dan ampas I. Ampas I, dimaserasi kembali dalam etanol 70% dengan perbandingan 1:2 selama 24 jam. Setelah itu, disaring lagi untuk mendapatkan filtrat II dan ampas II. Hal yang sama dilakukan untuk memperoleh ampas III. Filtrat I, II, dan III digabungkan kemudian diuapkan menggunakan *rotary vacuum evaporator*.

G. 4. Penetapan Susut Pengeringan

Ekstrak ditimbang 1–2 g dalam krusibel porselen yang sebelumnya telah dipanaskan pada suhu penetapan selama 30 menit dan telah ditara. Zat diratakan dengan krusibel dengan cara digoyangkan hingga terbentuk lapisan setebal kurang lebih 5 mm sampai 10 mm, dimasukkan ke dalam oven, dibuka tutupnya kemudian dikeringkan pada suhu 105⁰C hingga bobot tetap. Sebelum tahap pengeringan ekstrak dalam krusibel dibiarkan mendingin hingga suhu kamar,

kemudian pada suhu penetapan selama waktu yang ditentukan atau hingga bobot tetap (Depkes RI, 1979). Penetapan dilakukan triplo.

G. 5. Skrining Fitokimia

G. 5. a. Pemeriksaan Fenol

Ekstrak sampel sebanyak 1 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan beberapa tetes air panas dan beberapa tetes pereaksi FeCl_3 1%. Jika warna larutan berubah menjadi warna hijau, biru, atau ungu menunjukkan adanya senyawa fenol (Atmoko dan Ma'ruf, 2009). Pemeriksaan dilakukan triplo.

G. 5. b. Pemeriksaan Flavonoid

Ekstrak senyawa sebanyak 2 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan beberapa mg serbuk Mg dan larutan HCl pekat. Perubahan warna larutan menjadi warna merah tomat menandakan adanya flavonoid (Gupta *et al.*, 2010). Pemeriksaan dilakukan triplo.

G. 5. c. Pemeriksaan Tanin

Ekstrak sampel dimasukkan ke dalam 2 tabung reaksi masing-masing sebanyak 1 ml, lalu ditambahkan 2 ml FeCl_3 5% pada tabung reaksi. Pada tabung reaksi terbentuknya warna biru kehitaman menandakan adanya tanin (Gupta *et al.*, 2010). Pemeriksaan dilakukan triplo.

G. 5. d. Pemeriksaan Saponin

Ekstrak sampel sebanyak 0,5 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 5 ml air panas, setelah itu didinginkan dan dikocok secara kuat selama 10 menit sehingga terbentuk buih yang menunjukkan adanya saponin (Gupta *et al.*, 2010). Pemeriksaan dilakukan triplo.

G. 5. e. Pemeriksaan Alkaloid

Ekstrak sebanyak 1 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan dengan 1 ml HCL 2 N. Masing-masing 1 ml filtrat diambil dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi 1, 2, dan 3. Kemudian ditambahkan dua tetes pereaksi Mayer pada tabung 1, dua tetes pereaksi Wagner pada tabung reaksi 2, dan dua tetes pereaksi Dragendroff pada tabung reaksi 3. Hasil positif ditandai dengan terbentuk endapan putih pada tabung reaksi 1, endapan coklat pada tabung reaksi 2, dan endapan *orange* pada tabung reaksi 3. Pemeriksaan dilakukan triplo.

G. 5. f. Pemeriksaan Steroid dan Terpenoid

Ekstrak sampel sebanyak 2 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan dengan 2 ml asam asetat glasial dan 2 ml larutan asam sulfat pekat. Jika warna larutan berubah menjadi biru atau ungu menandakan adanya kelompok steroid, jika warna larutan berubah menjadi merah menunjukkan adanya kelompok senyawa terpenoid (Gupta *et al*, 2010). Pemeriksaan ini dilakukan triplo.

G. 6. Sterilisasi Alat dan Bahan

Sterilisasi alat dilakukan sebelum semua peralatan digunakan, yaitu dengan cara membungkus semua peralatan dengan menggunakan kertas cokelat kemudian dimasukkan ke dalam autoklaf pada suhu 121⁰C dengan tekanan 15 psi (*per square inch*) selama 15 menit. Untuk alat yang tidak tahan panas tinggi disterilisasikan dengan zat kimia berupa alkohol 70%.

G. 7. Pembuatan Media Sabouraud Dextrose Agar (SDA)

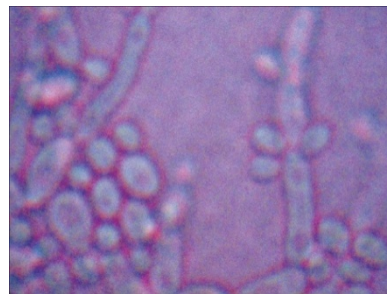
Pembuatan media SDA menggunakan bahan: *dextrose* 40 gram, *peptone* 10 gram, agar 15 gram, dan akuades 1 liter. Cara pembuatannya yaitu menimbang berat media SDA dengan menggunakan timbangan analitik. Media SDA yang diperlukan untuk 1 liter air adalah 65 gram, setelah itu media SDA dimasukkan pada labu erlenmeyer dan ditambahkan 1 liter air. Bahan dipanaskan di atas kompor listrik sambil diaduk hingga semua bahan terlarut sempurna. Labu erlenmeyer ditutup rapat dengan kapas, kemudian dilapisi dengan *aluminium foil*. Media disterilkan dengan autoklaf pada tekanan 1 atm, temperatur 121⁰C selama 15-20 menit. Kemudian media dipanaskan kembali dengan panas paling minimum agar *dextrose* tidak rusak lalu dituangkan pada cawan petri secara aseptik hingga merata. Penambahan antibiotik seperti streptomisin atau kloramfenikol dapat dilakukan untuk menghindari kontaminasi bakteri (Hare, 2008).

G. 8. Karakterisasi Jamur

G. 8. a. Identifikasi Jamur dengan Pewarnaan *Lactophenol Cotton Blue* (LPCB)

Alkohol 70% diteteskan sebanyak 1 tetes pada *object glass*. Jamur uji lalu dicampurkan pada tetesan alkohol tersebut. Tambahkan 1 atau paling banyak 2 tetes larutan LPCB sebelum alkohol mengering. *Coverslip* dipegang diantara jari

telunjuk dan ibu jari, lalu disentuh salah satu ujung tetesan pada *object glass* dengan salah satu tepi *coverslip*, lalu direndahkan perlahan-lahan untuk menghindari gelembung udara. Preparat siap diamati dibawah mikroskop (Leck, 1999).



Gambar 3.1. *Candida albicans* dengan pewarnaan LPCB (Kantheti, 2012)

G. 8. b. Identifikasi Jamur dengan Pewarnaan Gram

Jamur uji yang sudah terfiksasi pada kaca objek ditetesi dengan karbol kristal ungu selama 60 detik. Setelah itu dicuci dengan akuades. Selanjutnya ditetesi dengan larutan lugol selama 60 detik. Setelah itu dicuci kembali dengan akuades. Berikutnya larutan alkohol 96 % diteteskan di atas preparat tersebut sampai tidak ada warna ungu lagi pada preparat. Setelah itu preparat dicuci kembali dengan akuades sampai bersih. Langkah selanjutnya preparat ditetesi dengan larutan safranin dan dibiarkan selama 45 detik. Setelah itu preparat dicuci lagi dengan akuades, dikeringkan dan diperiksa dibawah mikroskop. Bakteri Gram positif berwarna ungu dan bakteri Gram negatif berwarna merah. *C. albicans* menunjukkan warna ungu seperti bakteri Gram positif. (Gandasoebrata, 2007).

G. 8. c. Identifikasi Khusus Jamur Uji

Jamur *C. albicans* dari media peremajaan diambil menggunakan jarum ose kemudian dioleskan pada media *Sabouraud Dextrose Agar*. Inkubasi pada suhu 37°C selama 24 – 48 jam. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya koloni bulat, berwarna putih dengan permukaan koloni yang terlihat agak kasar (Kayser, *et al.*, 2005).

G. 9. Persiapan Uji Aktivitas Antimikroba

G. 9. a. Peremajaan Jamur

Isolat jamur uji *Candida albicans* yang akan digunakan dilakukan peremajaan dengan cara membiakkannya pada media *Sabouraud Dextrose Agar* kemudian diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 24 – 48 jam.

G. 9. b. Pembuatan Suspensi Jamur

Pembuatan suspensi jamur dilakukan secara aseptis dengan cara koloni jamur uji pada media peremajaan diambil dengan menggunakan jarum ose dan disuspensikan ke dalam tabung berisi 5 ml larutan NaCl steril 0,9%. Kekeruhan yang diperoleh kemudian disetarakan dengan standar McFarland 0,5 untuk memperoleh suspensi yang mengandung 1×10^8 CFU/ml (Canno Para, 1999). Setelah setara maka suspensi ini yang digunakan sebagai jamur uji.

G. 9. c. Kontrol Positif

Kontrol positif yang digunakan dalam penelitian ini adalah Ketokonazol 15µg/disk.

G. 9. d. Kontrol Negatif

Kontrol negatif yang digunakan dalam penelitian adalah persentase DMSO 10%.

G. 9. e. Pembuatan Larutan Ekstrak Daun Kelor

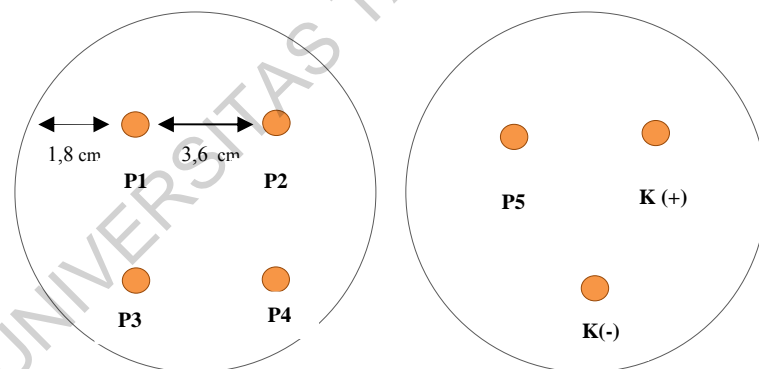
Pembuatan larutan ekstrak daun kelor terdiri dari pembuatan larutan stok dan pembuatan variasi konsentrasi. Pembuatan larutan stok ekstrak etanol daun kelor dibuat dengan melarutkan 10 g ekstrak dalam 1mL DMSO yang diencerkan dalam *aquadest* 10 ml. Kemudian dibuat variasi konsentrasi, yaitu 20%, 40%, 60%, 80% dan 100%.

G. 10. Uji Konsentrasi Hambat Minimum dengan Metode *Disc Diffusion* (Tes Kirby-Baurer)

Pengujian daya hambat ekstrak etanol daun kelor terhadap pertumbuhan jamur *C.albicans* dilakukan dengan metode difusi menggunakan kertas cakram berdiameter 6 mm. Tahapan awal yang dilakukan yakni kapas steril dicelupkan ke dalam suspensi jamur uji, kemudian diputar beberapa kali dan ditekan ke dinding tabung di atas cairan untuk menghilangkan inokulum yang berlebihan pada kapas.

Permukaan media SDA diinokulasikan jamur uji dengan mengulaskan kapas berisi suspensi jamur di seluruh permukaan media dengan melakukan *streaking* di seluruh permukaan agar bolak-balik dalam gerakan zig-zag sampai kira-kira 30% dari media agar telah tertutup. Kapas kembali disterilkan, kemudian dilanjutkan kembali mengulaskan kapas pada bagian media agar yang belum diulas, kapas di-*streaking* dua sampai tiga kali dengan melanjutkan pola zig-zag. Diputar sekitar 60° untuk memastikan pemerataan inokulum (CLSI, 2012).

Tahapan berikutnya yakni kertas cakram yang telah direndam dalam larutan sampel ekstrak etanol daun kelor, kontrol positif dan kontrol negatif selama 15 menit ditempatkan pada permukaan media SDA yang telah diinokulasi jamur uji menggunakan pinset steril. Setelah itu, baru masing-masing kertas cakram berukuran 6 mm sebanyak 4 buah diletakan di atas media SDA tersebut dengan jarak tiap cakram sebesar 3 cm dan dari tepi lempeng sebesar 2 cm (Waluyo, 2008; CLSI, 2012).

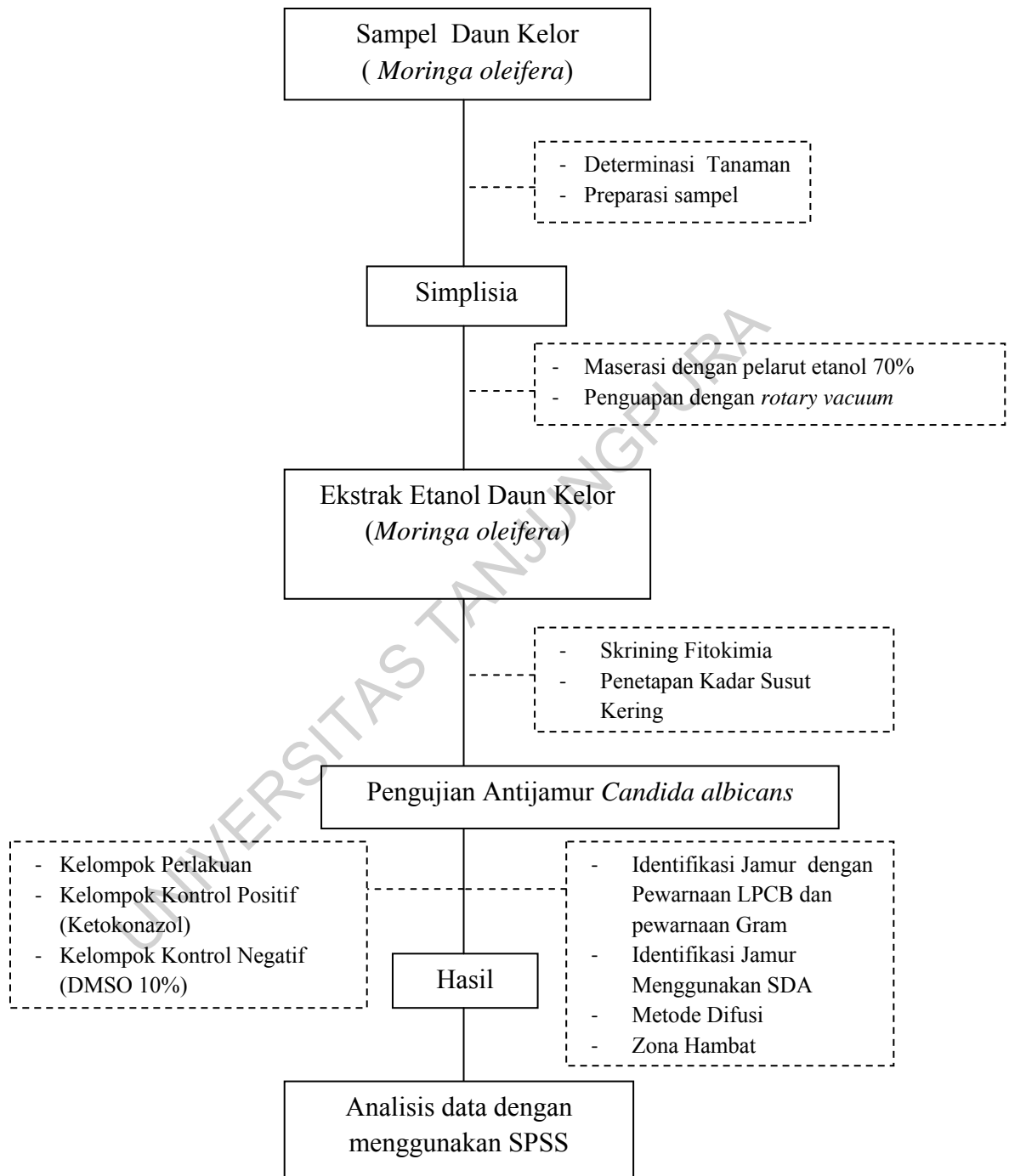


Gambar 3.2. Tata Letak Cakram pada Media Uji Antijamur (CLSI, 2012)

H. Analisis Data

Data hasil penelitian yang normal dan homogen (setelah diuji Shapiro-Wilk dan uji Levene's) akan dianalisa dengan *Analysis of Varians* (ANOVA) satu arah dengan taraf kepercayaan 95% untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh yang signifikan pemberian ekstrak daun kelor terhadap jamur *Candida albicans*, kemudian dilanjutkan dengan *Least Significant Difference* (LSD) untuk mengetahui perbedaan secara signifikan dari data satu kelompok perlakuan ekstrak dengan kelompok lainnya.

I. Alur Penelitian



Gambar 3.3. Alur Penelitian

J. Jadwal Penelitian

Tabel 3.1. Jadwal Penelitian

Kegiatan	2015			
	Januari	Februari	Maret	April
Persiapan bahan alat dan penelitian	√	√	√	
Pengumpulan dan analisis data			√	
Penyusunan Hasil dan Pembahasan				√

K. Etika Penelitian

Seluruh perlakuan pada subjek penelitian telah lolos etik oleh kaji etik FK Untan (531/UN22.9/DT/2015).