

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Rancangan Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah eksperimental laboratoris dengan menguji aktivitas antijamur bunga dan daun, serta menguji konsentrasi yang paling efektif untuk menghambat pertumbuhan *C. albicans*.

3.2. Waktu dan Tempat Penelitian

3.2.1 Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan pada bulan Februari-Maret 2023.

3.2.2 Tempat Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan di Laboratorium Mikologi Universitas Setia Budi, Surakarta.

3.3. Alat dan Bahan

3.3.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah :

- a. Pipet tetes
- b. Cawan petri steril
- c. Tabung reaksi
- d. Batang pengaduk
- e. Boor proof
- f. Erlenmeyer
- g. Pipet ukur
- h. Jarum ose
- i. Kapas steril
- j. Kapas lidi steril
- k. Kertas koran
- l. Mikropipet
- m. Yellow tip
- n. Pembakar spirtus
- o. Entkas/Laminar air flow
- p. Autoklaf

3.3.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah :

- a. Bunga Telang (*Clitoria ternatea*) dan Daun Pepaya (*Carica papaya*) yang diambil pada bulan Januari 2023 dari Mojosongo, Surakarta
- b. Biakan murni *C. albicans*, media tanam yang digunakan adalah media SGA (*Sabouraud Glukosa Agar*) dalam cawan petri, bahan lain yang digunakan adalah aquadest steril.

3.4. Populasi dan sampel

3.4.1 Populasi Penelitian

Biakan murni jamur *C. albicans* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Setia Budi, Surakarta.

3.4.2 Sampel Penelitian

Infusa kombinasi Bunga Telang (*Clitoria Ternatea*) dan Daun Pepaya (*Carica Papaya*) dengan variasi konsentrasi infusa A, B, C, D, dan E.

3.5. Variabel Penelitian

3.5.1. Variabel bebas

Variabel bebas pada penelitian ini berupa kombinasi konsentrasi infusa Bunga Telang (*Clitoria ternatea*) dan Daun Pepaya (*Carica papaya*) dengan variasi konsentrasi :

Tabel 3. 1 Variasi Konsentrasi Infusa Bunga Telang (*Clitoria ternatea*) dan Daun Pepaya (*Carica papaya*)

Konsentrasi	Bunga Telang	Daun Pepaya
A	100%	
B	75%	25%
C	50%	50%
D	25%	75%
E		100%

3.5.2. Variabel terikat

Diameter zona hambat jamur *C. albicans* pada media SGA

3.6. Prosedur Kerja

3.6.1. Pengumpulan bahan

Bahan yang digunakan berupa Bunga Telang (*Clitoria ternatea*) dan Daun Pepaya (*Carica papaya*) yang tidak terlalu tua atau terlalu muda, segar, dan tidak busuk yang diambil di Mojosongo, Surakarta

3.6.2. Pembuatan infusa kombinasi Bunga Telang (*Clitoria ternatea*) dan Daun Pepaya (*Carica papaya*)

Pembuatan infusa dilakukan dengan membuat masing-masing 100 ml infusa bunga telang (*Clitoria ternatea*) dan 100 ml daun pepaya (*Carica papaya*) yang dilakukan secara terpisah. Prosedur pembuatan infusa menurut Febrina (2019) yaitu sebagai berikut :

- a. Bahan ditimbang seberat 10 gram kemudian dimasukkan ke dalam panci infusa dan ditambahkan aquades 100 ml.
- b. Bunga Telang (*Clitoria ternatea*) dan Daun Pepaya (*Carica papaya*) yang telah ditambahkan aquades dipanaskan menggunakan penangas air selama 15 menit terhitung setelah suhu dalam panci mencapai 90°C, sambil sesekali diaduk.
- c. Diserai selagi panas dengan menggunakan kain flanel, dijadikan 100 ml infusa.
- d. Jika volumenya kurang dari 100 ml dapat ditambahkan air panas yang dilewatkan pada ampasnya hingga diperoleh 100 ml volume infusa.

Hasil perolehan infusa Bunga Telang (*Clitoria ternatea*) dan Daun Pepaya (*Carica papaya*) yang akan dilakukan uji antijamur yaitu dengan 5 perlakuan variasi konsentrasi yaitu konsentrasi A, B, C, D, dan E (seperti pada Tabel 3.1).

3.6.3. Uji kandungan kimia dengan uji tabung

Uji kandungan kimia dilakukan untuk menentukan kandungan senyawa aktif yang terkandung dalam tanaman sehingga dapat digunakan sebagai obat dalam penyembuhan berbagai penyakit, khususnya antijamur (Saragih dan Arsita, 2019). Menurut Sulistyawati (2019),

prosedur uji kandungan senyawa kimia dilakukan sebagai berikut:

a. Uji Fenol

Pengujian Fenol dilakukan dengan cara memasukkan 1 ml ekstrak ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan beberapa tetes air panas dan pereaksi FeCl_3 1%. Perubahan warna larutan menjadi hijau, biru, atau ungu menandakan adanya fenol.

b. Uji Flavonoid

Ada tidaknya flavonoid dilakukan dengan cara memasukkan 2 ml ekstrak ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan beberapa mg serbuk Mg dan larutan HCl pekat. Adanya perubahan warna larutan menjadi merah tomat atau jingga menandakan adanya flavonoid.

c. Uji Saponin

Ada tidaknya saponin dilakukan dengan cara memasukkan ekstrak sebanyak 0,5 ml ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 5 ml aquadest panas, kemudian didinginkan dan dikocok dengan kuat selama 10 menit. Terbentuknya busa setinggi 1-10 cm yang stabil selama tidak kurang dari 10 menit menunjukkan adanya saponin (Padmasari *et al*, 2017).

d. Uji Alkaloid

Ada tidaknya alkaloid dilakukan dengan cara memasukkan ekstrak sebanyak 1 ml ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan dengan 1 ml HCl 2N dan dua tetes pereaksi Dragendroff. Adanya alkaloid ditandai dengan terbentuk endapan jingga atau cokelat pada tabung reaksi.

e. Uji Tanin

Ada tidaknya tanin dilakukan dengan cara memasukkan ekstrak ke dalam 2 tabung reaksi sebanyak 1 ml, kemudian ditambahkan 2 ml FeCl_3 2%. Adanya tanin ditunjukkan dengan terbentuknya warna biru atau hijau kehitaman.

3.6.4. Pembuatan larutan uji

Larutan uji dibuat dengan konsentrasi A, B, C, D, dan E dengan cara sebagai berikut :

- Kontrol Positif : Menggunakan flukonazol cair yang sudah siap dipakai.
- Kontrol Negatif : Disiapkan tabung reaksi lalu dimasukkan aquades steril dipipet 10 ml dan ditutup dengan kapas steril.
- Variasi konsentrasi infusa dibuat dengan cara sebagai berikut :

Tabel 3. 2 Variasi kombinasi konsentrasi Infusa Bunga Telang (*Clitoria ternatea*) dan Daun Pepaya (*Carica papaya*)

Konsentrasi	Bunga Telang (μ l)	Daun Pepaya (μ l)	Flukonazol (ml)	Aquadest (ml)
A	100	-	-	-
B	25	75	-	-
C	50	50	-	-
D	75	25	-	-
E	-	100	-	-
K. Positif	-	-	10	-
K. Negatif	-	-	-	10

3.6.5. Identifikasi jamur uji *C. albicans*

- Koloni *C. albicans* diambil satu koloni dengan ose bulat dan diinokulasikan pada media serum hasil inkubasi, yaitu memakai serum manusia.
- Diinkubasi pada suhu 37°C selama 2 -3 jam.
- Koloni pertumbuhan diambil satu ose dan diletakkan kedalam objek glass dan ditutup cover glass.
- Preparat tersebut diperiksa dibawah mikroskop pembesaran 40 x 10. Hasil dinyatakan positif bila ditemukan sel ragi yang berkecambah (germ tube +) dan dinyatakan negatif bila tumbuh hanya blastospora/ sel ragi (Khusnul 2018).

3.6.6. Standarisasi jamur menggunakan Mc. Farland

- Diambil 2-3 ose jamur uji *C. albicans* secara aseptis
- Dimasukkan kedalam tabung reaksi yang berisi 5 ml media NaCl fisiologis.
- Kekeruhan larutan disetarakan dengan standard Mc. Farland 1,5x10⁸ cfu/ml (Sulistiyawati, *et al.*, 2019).

3.6.7. Sterilisasi alat-alat dan bahan

Sterilisasi alat dilakukan sebelum semua alat digunakan yaitu dengan cara semua alat seperti tabung reaksi, cawan petri, batang pengaduk, dan erlenmeyer dibungkus dengan kertas lalu disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

3.6.8. Pembuatan media SGA

- a. Media yang digunakan pada penelitian ini adalah media Sabouroud Glukosa Agar (SGA) sebanyak 9,75 gr dengan penambahan 150 ml aquadest steril
- b. Dimasak sampai mendidih
- c. Ditambahkan kloramfenikol 30 mg lalu dihomogenkan
- d. Media tersebut didapatkan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi, Surakarta.

3.6.9. Pembuatan lempeng Agar (Sabouroud Glukosa Agar)

Media SGA (*Sabouroud Glukosa Agar*) dalam keadaan hangat dituangkan sebanyak 60 ml dalam cawan petri besar dan dibiarkan memadat.

3.6.10. Pengujian antijamur dengan metode difusi sumuran

- a. Dilakukan inokulasi jamur secara streak plate pada media yang telah dituangkan pada cawan petri besar, yaitu dengan cara mengambil suspensi jamur menggunakan kapas lidi steril
- b. Didiamkan hingga suspensi terserap ke dalam kapas lidi, lalu diangkan dan ditiriskan pada dinding tabung. Kemudian dilakukan perataan pada media SGA (*Sabouroud Glukosa Agar*) yang telah dituangkan pada cawan petri besar dan didiamkan 5-15 menit agar suspensi meresap ke dalam media.

3.6.11. Pembuatan Lubang Sumuran

Media yang telah diinokulasikan dengan suspensi jamur *C. albicans* lalu dibuat lubang sumuran menggunakan borproof dengan diameter 6 mm. lubang sumuran dibuat sebanyak 5 lubang untuk kontrol positif, konsentrasi A, konsentrasi B, konsentrasi C, konsentrasi D, konsentrasi E, dan dan kontrol negatif. Lubang pertama digunakan sebagai kontrol positif yang diisi dengan flukonazol cair, lubang kedua, ketiga, keempat, kelima, dan

keenam diisi dengan berbagai konsentrasi infusa Bunga Telang (*Clitoria Ternatea*) dan Daun Pepaya (*Carica Papaya*). sedangkan kontrol negatif diisi dengan aquades dengan pengisian masing-masing 50 µl dengan clinipete (Luhurningtyas, 2018).

3.6.12. Inkubasi

Inkubasi dilakukan pada suhu 37°C selama 24-72 jam pada perlakuan yang sudah diinokulasikan dengan suspensi *C. albicans* (Sulistyawati *et al*, 2019).

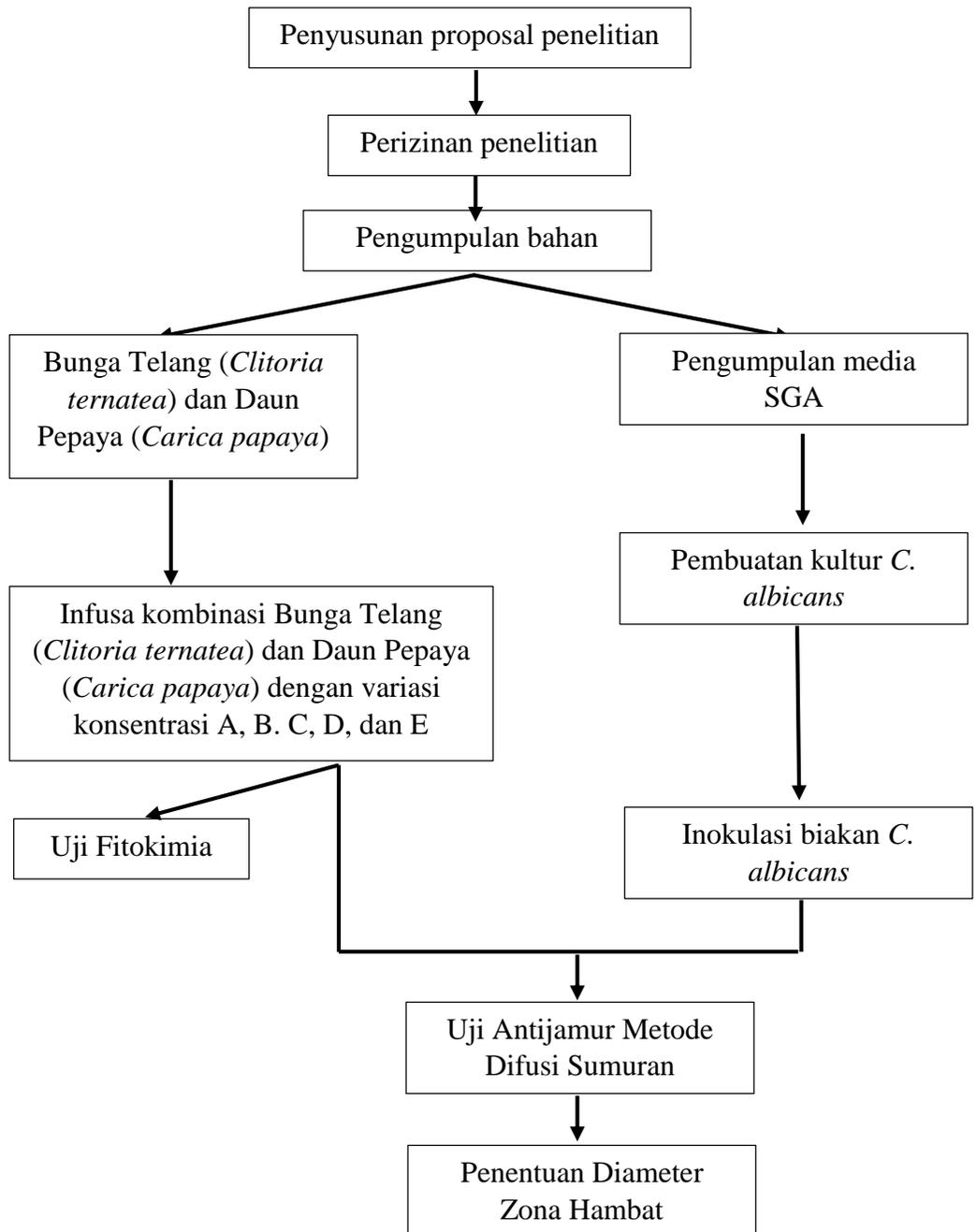
3.6.13. Identifikasi Hasil Pengamatan

Penelitian ini dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali. Diamati ada tidaknya zona bening disekitar sumuran lalu diukur dengan menggunakan jangka sorong untuk mengetahui diameter zona hambatnya, adanya zona bening disekeliling lubang sumuran menunjukkan adanya aktivitas antijamur lalu diukur dengan penentuan kategori respon zona hambat menurut Sulistyawati, *et al*, (2019) yaitu sebagai berikut :

Tabel 3. 3 Kategori Respon Zona Hambat

Diameter Zona Hambat	Respon Hambat
< 5 mm	Lemah
5-10 mm	Sedang
10-20 mm	Kuat
>20 mm	Sangat Kuat

3.7. Alur Penelitian



Gambar 3. 1 Alur penelitian