

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan secara eksperimental yang bertujuan untuk mengetahui perbedaan aktivitas antifungi air perasan jeruk nipis, jeruk purut dan jeruk lemon terhadap *Candida albicans* dengan menggunakan metode Rancangan Acak Kelompok (RAK) yang dibagi dalam 5 kelompok perlakuan, yaitu 3 kelompok air perasan buah jeruk dan 2 kelompok kontrol. Pengulangan yang dilakukan untuk setiap perlakuan penelitian ini adalah sebanyak 3 kali.

Adapun tahapan penelitian meliputi persiapan alat, bahan, dan menyiapkan sampel yang akan digunakan untuk pengujian yaitu air perasan jeruk nipis, jeruk purut, jeruk lemon, peremajaan *Candida albicans*. Kemudian dilakukan pengujian perbandingan aktivitas antifungi air perasan jeruk nipis, jeruk purut dan jeruk lemon terhadap *Candida albicans* menggunakan media *Saboraud Dextrose Agar* (SDA) dan dilakukan dengan menggunakan metode difusi sumuran untuk melihat zona bening pada media SDA. Tahapan akhir dengan melakukan pengolahan dan analisis data serta membuat kesimpulan dan hasil penelitian.

3.2 Populasi dan Sampel

Populasi pada penelitian ini adalah buah jeruk nipis, jeruk purut dan jeruk lemon yang didapat dari Balitjestro Kota Probolinggo sedangkan sampel yang digunakan adalah air perasan dari jeruk nipis, jeruk purut dan jeruk lemon.

3.3 Lokasi dan Waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Akademi Farmasi Putra Indonesia Malang dan Laboratorium Farmakognosi Akademi Farmasi Putra Indonesia Malang. Pengumpulan bahan dilakukan di Balitjestro Kota Probolinggo. Penelitian ini dilakukan mulai bulan Desember 2018 untuk penyusunan laporan Karya Tulis Ilmiah sampai bulan Juni 2018 untuk analisis data.

3.3 Definisi Operasional Variabel

Definisi Operasional Variabel dalam penelitian terdiri dari variabel bebas dan variabel terikat. Variabel bebas penelitian ini adalah air perasan dari jeruk nipis, jeruk purut dan jeruk lemon sedangkan variabel terikat dalam penelitian ini adalah adanya aktivitas antifungi air perasan jeruk nipis, jeruk purut dan jeruk lemon terhadap *Candida albicans*.

Tabel 1. Definisi operasional

Variabel Penelitian	Definisi Operasional	Indikator/ Hasil Ukur	Alat Ukur	Skala Ukur
Air perasan jeruk nipis, jeruk purut dan jeruk lemon	Cairan yang diperoleh dari perasan buah jeruk nipis, jeruk purut dan jeruk lemon dengan menggunakan cara manual	Air perasan yang dihasilkan dari perasan buah jeruk	Gelas ukur	Rasio
Hasil skrining fitokimia air perasan buah jeruk nipis, jeruk purut dan jeruk lemon	Proses untuk mengetahui metabolit sekunder suatu sampel meliputi flavonoid, alkaloid, saponin, tanin, steroid dan terpenoid	Flavonoid : merah jingga, Alkaloid : endapan jingga (pereaksi dragendorff) atau endapan putih kuning (pereaksi mayer), Saponin : busa stabil,	Tabung reaksi dan pereaksi	Ordinal

		Tanin : warna biru-hijau		
Aktivitas antifungi	Kemampuan suatu senyawa dapat memberikan efek bagi mikroorganisme	Diameter zona hambat disekitar sumuran (mm)	Jangka sorong	Rasio

3.4 Instrumen Penelitian

Pelaksanaan penelitian ini membutuhkan alat dan bahan. Adapun alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah cawan petri, tabung reaksi (pyrex), erlemeyer (pyrex), oven (Memmert), autoklaf (All American), inkubator (Memmert), spektrofotometer (Thermo), *cork borrrer*, timbangan analitik (Ohaus), *Laminar Air Flow* (Mascotte model LH-S), jarum ose, bunsen, mikro pipet, pipet tetes, bluetip, jangka sorong, kapas, kertas coklat, tissue.

Adapun bahan yang digunakan dalam penelitian in adalah air perasan dari buah jeruk nipis, jeruk purut, jeruk lemon yang didapatkan dari Balitjestro Kota Probolinggo, media *Sabouraud Dextrosa Agar* (SDA), NaCl 0,9%, BaCl₃, H₂SO₄, FeCl₃, reagen Mayer, reagen Dragendorff, methanol, serbuk Mg, HCl, kloroform, asam asetat anhidrat dan aquadest.

3.5 Prosedur Penelitian

3.6.1. Preparasi Sampel

Pengambilan air perasan buah jeruk nipis, jeruk purut dan jeruk lemon dilakukan didalam *Laminar Air Flow* untuk mengurangi resiko kontaminasi. Buah jeruk nipis, jeruk purut dan jeruk purut terlebih dahulu disortir dan dibersihkan dari debu juga kotoran dengan

dicuci. Setelah itu dikeringkan dengan di angin – anginkan. Kemudian buah jeruk dipotong menjadi dua bagian dan diperas secara manual dengan menggunakan sarung tangan untuk menghasilkan air perasan. Selanjutnya, disimpan dalam wadah tertutup rapat yang sudah disterilkan.

3.6.2. Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder

Uji fitokimia merupakan uji kualitatif kandungan senyawa pada tumbuhan tingkat tinggi, sehingga dapat diketahui senyawa yang terdapat didalamnya. Senyawa kimia dalam tumbuhan dapat diketahui melalui uji fitokimia.

a) Uji Alkaloid

Pengujian dilakukan dengan mengambil masing-masing 2 mL sampel air perasan jeruk nipis, jeruk purut dan jeruk lemon kedalam 2 buah tabung reaksi yang berbeda. Setelah itu masing-masing air perasan ditambah dengan 5 tetes reagen Dragendroff. Jika masing-masing larutan terbentuk endapan jingga maka positif mengandung alkaloid. Selanjutnya untuk pengujian Alkaoid dengan menggunakan reagen mayer dilakukan dengan cara mengambil masing-masing sebanyak 2 mL sampel air perasan jeruk nipis, jeruk purut dan jeruk lemon kedalam 2 buah tabung reaksi yang berbeda. Setelah itu masing-masing ekstrak ditambah 3 tetes HCl pekat dan 5 tetes reagen Mayer. Jika masing-masing larutan terbentuk endapan putih maka sampel positif mengandung alkaloid (Ergina, dkk, 2014).

b) Uji Flavonoid

Air perasan dari masing buah jeruk jeruk nipis, jeruk purut dan jeruk lemon dimasukkan kedalam tabung reaksi kemudian dilarutkan dalam 1- 2 mL methanol panas 50 %.

Ditambahkan serbuk Mg dan 0,5 mL HCl pekat. Adanya flavonoid ditunjukkan dengan terbentuknya larutan berwarna merah atau jingga (Indrayani, dkk, 2006).

c) Uji Saponin

Air perasan dari masing buah jeruk jeruk nipis, jeruk purut dan jeruk lemon sebanyak 1 mL ditambahkan aquadest 10 mL dan dikocok selama 30 menit sampai muncul busa. Tabung reaksi diletakkan dalam posisi tegak selama 30 menit. Apabila masih terdapat busa, maka kemungkinan mengandung saponin. Untuk memastikan bahwa busa yang terbentuk berasal dari saponin maka diteteskan larutan asam sebanyak 3 tetets, bila busa stabil maka dipastikan terdapat saponin (Indrayani, dkk, 2006).

d) Uji Tanin

Air perasan dari masing buah jeruk jeruk nipis, jeruk purut dan jeruk lemon dimasukkan kedalam tabung reaksi kemudian ditambahkan dengan 2 -3 tetes larutan FeCl_3 1 %. Jika bahan mengandung tanin maka akan menghasilkan larutan berwarna hijau kehitaman atau biru tua (Indrayani, dkk, 2006).

3.6.3. Pemeriksaan Mikroskopik *Candida albicans*

1. Ditetesi larutan KOH 10% pada objek glass.
2. Dibasahi ujung ose dengan larutan KOH 10% dan diambil koloni dengan menggunakan ose.
3. Diletakkan koloni pada tetesan KOH 10% dan ditutup dengan deck glass dan dihindari terjadinya gelembung udara.
4. Dilewatkan sediaan tersebut beberapa kali diatas nyala api.
5. Diperiksa dibawah mikroskopik dengan perbesaran 40x.
6. Diamati bagian – bagiannya seperti blastospora dan pseudohifa (Farizal, 2017).

3.6.4. Uji Aktivitas Antifungi

a. Sterilisasi Alat

Sebelumnya alat – alat dicuci bersih dan dikeringkan. Sterilisasi alat – alat yang berbahan kaca seperti cawan petri, erlemeyer, tabung reaksi, beaker glass, gelas ukur dilakukan dengan cara sterilisasi panas basah menggunakan autoklaf pada suhu 121^o C dan tekanan 1 atm. Alat yang tidak tahan panas disterilkan dengan menggunakan alkohol 96 % (Wulandari, 2017)

b. Pembuatan Media Saboraud Dextrose Agar (SDA)

Pembuatan media agar dilakukan dengan mencampurkan 32,5 gr SDA dengan 500 mL aquadest dalam erlemeyer. Media dipanaskan dengan menggunakan bunsen diaduk dengan batang pengaduk. Kemudian ditutup menggunakan kertas coklat dan dikencangkan menggunakan karet gelang dan disterilkan didalam autoklaf selama 15 menit, pada suhu 121^oC pada tekanan 1 atm (Gunawan, dkk, 2015).

c. Peremajaan Biakan *Candida albicans*

Media SDA yang telah disterilkan, kemudian dituang kedalam 10 buah tabung reaksi, kemudian diletakkan dalam keadaan miring dan dibiarkan memadat. Selanjutnya koloni jamur diambil dari biakan murni, dilakukan secara aseptis dengan jarum ose dan digoreskan pada media agar miring lalu diinkubasi pada suhu 37^o selama 24 jam – 48 jam (Yanti, dkk, 2016).

d. Pembuatan suspensi Jamur *Candida albicans*

NaCl 0,9 % diambil sebanyak 20 mL dimasukkan kedalam erlemeyer kemudian jamur uji yang telah diremajakan diambil menggunakan jarum ose dan dimasukkan kedalam larutan NaCl. Disuspensikan dan dihomogenkan. Kemudian diukur kekeruhan suspensinya dengan menggunakan alat spektrometer UV-VIS dengan

menggunakan kuvet pada panjang gelombang 530 nm hingga diperoleh transmittansi 90% setara dengan 10^8 CFU/mL (Octaviani *et al*, 2018).

- e. Uji Daya Hambat Air Perasan Jeruk Nipis, Jeruk Purut dan Jeruk Lemon terhadap *Candida albicans*

Pembuatan kontrol media dilakukan dengan memasukkan media SDA steril sebanyak 15 mL kedalam cawan petri steril dengan metode pour plate. Digoyang-goyangkan seperti angka 8 sampai merata kemudian ditunggu hingga memadat. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37° C selama 24 – 48 jam.

Pembuatan kontrol fungi dilakukan dengan memasukkan suspensi fungi *Candida albicans* kedalam cawan petri sebanyak 1 mL menggunakan bluetip, kemudian dimasukkan media SDA ke dalam cawan petri dengan metode pour plate sebanyak 15 mL. Digoyang-goyangkan seperti angka 8 sampai merata, kemudian ditunggu hingga memadat. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37° C selama 24 – 48 jam.

Pengujian aktivitas antijamur dilakukan dengan menggunakan metode lubang sumuran dengan diameter 8 mm (Balouri, 2016). Setelah dilakukan pengukuran kekeruhan yang telah sesuai, kemudian *Candida albicans* diinokulasi ke media SDA dengan cara mengambil suspensi bakteri sebanyak 1 mL menggunakan bluetip kedalam cawan petri kemudian tuangkan media SDA dengan metode pour plate. Biarkan hingga agar memadat selama beberapa menit pada suhu ruang dengan cawan tertutup. Kemudian dibuat lubang sumuran pada tengah – tengah media menggunakan *cork borer* dengan diameter 8 mm. (WHO dalam Yanti, dkk, 2016).

Media SDA yang telah diinokulasi suspensi *C.albicans* dalam 9 cawan petri. Selanjutnya dilakukan perlakuan :

Kelompok 1 : Dibuat lubang pada cawan petri dengan diameter 8 mm menggunakan *cork borer*. Pada lubang ditetesi dengan air perasan buah jeruk nipis sebanyak 250 μ L (5 tetes) menggunakan mikropipet. Dilakukan 3 kali pengulangan untuk kelompok perlakuan 1.

Kelompok 2 : Dibuat lubang pada cawan petri dengan diameter 8 mm menggunakan *cork borer*. Pada lubang ditetesi dengan air perasan buah jeruk purut sebanyak 250 μ L (5 tetes) menggunakan mikropipet. Dilakukan 3 kali pengulangan untuk kelompok perlakuan 2.

Kelompok 3 : Dibuat lubang pada cawan petri dengan diameter 8 mm menggunakan *cork borer*. Pada lubang ditetesi dengan air perasan buah jeruk lemon sebanyak 250 μ L (5 tetes) menggunakan mikropipet. Dilakukan 3 kali pengulangan untuk kelompok perlakuan 3.

Setelah semua kelompok perlakuan telah selesai, semua kelompok diinkubasi selama 24-48 jam dengan suhu 37°C dan diukur zona bening yang terbentuk menggunakan jangka sorong.

3.6 Analisis Data

Data yang diperoleh diolah dan dianalisa dengan menggunakan sistem komputerisasi dengan program SPSS. Untuk mengetahui perbedaan terhadap perlakuan yang diberikan dilakukan uji statistic Analisis Of Variance (ANOVA) satu arah dengan taraf kepercayaan 95 % untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh yang signifikan pemberian air perasan buah jeruk nipis, jeruk purut dan jeruk lemon terhadap *Candida albicans*, kemudian dilanjutkan dengan *Post-Hoc Least Significant Difference* (LSD) untuk mengetahui perbedaan secara signifikan dari data satu kelompok perlakuan air perasan dengan kelompok lainnya.

