

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental dalam bidang Mikologi. Desain penelitian Rancangan Acak Lengkap (RAL). Variabel bebas Ekstrak Daun Pandan Wangi (*Pandanus amaryllifolius Roxb*) konsentrasi 70%, 80%, 90%, 100% dan kontrol positif ketokonazole. Variabel terikat pertumbuhan jamur *Candida albicans*. Kontrol negatif adalah aquadest steril dan kontrol positif ketokonazole. Pemeriksaan menggunakan metode difusi cakram agar Kirby Bauer dengan melihat zona hambat yang terbentuk. Pengulangan dilakukan sebanyak 6 kali yang didapat dari perhitungan menggunakan rumus Freederer yaitu $(t-1)(n-1) \geq 15$.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di UPTD Balai Laboratorium Kesehatan Provinsi Lampung. Proses determinasi tumbuhan dilakukan di Laboratorium Botani Fakultas MIPA Universitas Lampung, dan ekstraksi dilaksanakan di Laboratorium Kimia Organik Fakultas MIPA Universitas Lampung pada bulan April-Juni 2022.

C. Subjek Penelitian

Daun Pandan Wangi (*Pandanus amaryllifolius Roxb*) yang diambil adalah daun yang segar yang baru dipetik, ciri-ciri permukaan atas daun bewarna hijau tua, permukaan bawah daun bewarna hijau muda (Suwandi dan Sugito, 2017). Daun Pandan Wangi kemudian dijadikan ekstrak lalu dibuat konsentrasi 70%, 80%, 90%, 100%, yang digunakan sebagai larutan uji dalam menghambat pertumbuhan jamur *Candida albicans*. Jamur *Candida albicans* didapat dari Laboratorium Mikologi Balai Laboratorium Kesehatan Provinsi Lampung.

D. Variabel dan Definisi Operasional Penelitian

No	Variabel	Definisi	Cara Ukur	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
1.	Variabel Bebas: Ekstrak Daun Pandan Wangi (<i>Pandanus amaryllifolius</i> Roxb)	Daun Pandan Wangi (<i>Pandanus amaryllifolius</i> Roxb) dibuat simplisia kemudian dibuat ekstraksi dengan etanol 96% dan dilakukan pengenceran 70%, 80%, 90%, 100%	Ekstrak diencerkan dengan rumus $V_1 \times \%_1 = V_2 \times \%_2$	Pipet ukur	Ekstrak Daun Pandan Wangi konsentration 70%, 80%, 90%, 100%	Rasio
2.	Variabel Bebas: Kontrol positif ketokonazole	Kontrol positif ketokonazole yaitu kontrol yang dibuat untuk memastikan metode yang digunakan sudah benar atau belum yang ditunjukkan dengan adanya zona hambat	Mengukur diameter zona hambat dengan metode difusi cakram Kirby Bauer	Jangka sorong	Diameter zona hambat dalam (mm)	Rasio
3.	Variabel Terikat: Pertumbuhan jamur <i>Candida albicans</i>	Pertumbuhan jamur <i>Candida albicans</i> yang dihambat oleh Ekstrak Daun Pandan Wangi (<i>Pandanus amaryllifolius</i> Roxb)	Mengukur diameter zona hambat dengan metode difusi cakram Kirby Bauer	Jangka sorong	Diameter zona hambat dalam (mm)	Rasio

Tabel 3.1 Variabel dan Definisi Operasional Penelitian

E. Pengumpulan Data

Pengumpulan data dilakukan dengan cara sebagai berikut:

1. Prosedur Penelitian

- a. Pengajuan Permohonan izin dari jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Tanjungkarang untuk dilakukan determinasi dan pembuatan ekstrak daun pandan wangi di Laboratorium Fakultas MIPA Universitas Lampung dan pemesanan strain jamur ke Laboratorium Mikologi Balai Laboratorium Kesehatan Provinsi Lampung.
- b. Pengumpulan bahan-bahan pemeriksaan seperti strain jamur *Candida albicans*, media SDA, disk kosong, dan daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius Roxb*).
- c. Determinasi bahan uji daun pandan wangi di Laboratorium Botani Fakultas MIPA Universitas Lampung.
- d. Pembuatan simplisia daun pandan wangi.
- e. Ekstraksi simplisia daun pandan wangi di Laboratorium Kimia Fakultas MIPA Universitas Lampung.
- f. Pengenceran larutan uji menjadi konsentrasi 70%, 80%, 90%, 100%. Pembuatan suspensi jamur *Candida albicans*
- g. Pengujian ekstrak daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius Roxb*) terhadap pertumbuhan jamur *Candida albicans* dengan metode difusi cakram *Kirby Bauer* dan pengamatan zona hambat yang terbentuk pada masing-masing konsentrasi dan diukur menggunakan alat ukur jangka sorong dalam satuan mm.

2. Metode Pemeriksaan

Difusi agar cakram dengan cara *Kirby Bauer*.

3. Prinsip Pemeriksaan

Cakram kertas yang mengandung antibiotik diletakkan di atas media yang telah diberi organisme uji, selanjutnya di inkubasi dan dibaca hasilnya berdasarkan kemampuan penghambatan organisme uji di sekitar kertas cakram. Zona jernih yang terbentuk di sekitar cakram merupakan indikator penghambatan antibiotik terhadap pertumbuhan organisme uji (Yusmaniar, 2017).

4. Prosedur Kerja

a. Persiapan alat dan bahan pemeriksaan

- 1) Alat: Pipet ukur, gelas ukur, cawan petri, disk cakram steril, pinset, lidi kapas steril, vacuum pump, korek api, kapas, botol gelap, kain hitam, kertas kopi, aluminium foil, mikropipet + tip, hotplate, objek glass, corong gelas, tabung reaksi, rak tabung reaksi, ose, lampu spiritus, neraca analitik, inkubator, erlenmeyer, autoklaf, jangka sorong, vortex, thermometer, waterbath, oven, evaporator.
- 2) Bahan: Aquadest steril, NaCl 0,85%, standar Mc. Farland 0.5, ketokonazole, media Sabouroud Dextrose Agar (SDA), Daun Pandan Wangi (*Pandanus amaryllifolius Roxb*), dan strain murni *Candida albicans*.

b. Identifikasi bahan uji daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius Roxb*) di Laboratorium Botani Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Lampung.

c. Pengujian ekstrak daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius Roxb*) terhadap pertumbuhan jamur *Candida albicans* dengan prosedur kerja sebagai berikut:

1) Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat-alat gelas disterilisasi menggunakan oven menggunakan suhu 160° selama 1 jam. Autoklaf merupakan teknik sterilisasi yang paling efisien, karena adanya uap panas akan memperbesar penetrasi uap air ke dalam organisme uji dan distribusi panas lebih merata. Digunakan untuk sterilisasi media, lidi kapas menggunakan suhu 121° selama 15 menit dengan tekanan 1 atm (Putri dkk, 2017).

2) Pembuatan Larutan Standar Mc Farland 0,5

Dicampurkan 9,95 ml larutan H₂SO₄ 1% dengan 0,05 ml larutan BaCl₂·2H₂O 1% sehingga volume menjadi 10 ml. dikocok hingga homogen (Gesar dan Sasongkowat, 2015).

3) Pembuatan NaCl 0,85%

Ditimbang 0,85 gram NaCl kemudian dilarutkan dalam 100 ml aquadest steril, dihomogenkan.

4) Pembuatan Media Agar Dari Saboraud Dextrose Agar (SDA)

Pembuatan media dilakukan berdasarkan petunjuk pembuatan pada botol media yaitu 65 gram serbuk media Saboraud Dextrose Agar dalam 1000 ml aquadest dikalikan dengan volume yang dibutuhkan. Kemudian ditimbang, diaduk, lalu dipanaskan di atas hotplate sampai larut sempurna. Kemudian media disterilisasi di autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm. Kemudian didinginkan sampai mencapai suhu 50°C, ditambahkan larutan ketokonazole. Setelah itu media dituang ke dalam cawan petri yang telah disterilisasi dengan ketebalan ± 4 mm dan biarkan mengeras (Soemarno, 2000).

5) Uji Sterilisasi Media

Media yang sudah dibuat, diambil beberapa plate kemudian diinkubasi pada suhu 35-37°C selama 2 hari. Apabila terdapat pertumbuhan 2 koloni per plate, maka dianggap tidak steril (Soemarno, 2000).

6) Identifikasi Jamur *Candida albicans*

a. Pemeriksaan Makroskopis

Ditanam jamur *Candida albicans* pada media SDA, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 2x24 jam lalu diamati koloni jamur *Candida albicans* yang tumbuh. Interpretasi hasil:

Candida albicans pada media SDA didapatkan koloni berwarna putih, permukaan licin, menonjol disertai bau khas ragi (Putri dkk, 2017).

b. Pemeriksaan Mikroskopis

(1) Diambil koloni jamur biakan media SDA yang telah ditanam sebelumnya, kemudian diletakkan pada permukaan objek glass, dibuat preparat dan ditambah NaCl 0,85%, lalu dihomogenkan dan difiksasi di atas nyala lampu bunsen.

(2) Diletakkan objek glass pada rak pengecatan, kemudian dilakukan pewarnaan gram. Ditetaskan Gram A didiamkan selama 1 menit, lalu dibilas dengan air mengalir. Ditetaskan Gram B didiamkan selama 1

menit, lalu dibilas dengan air mengalir, Ditetaskan Gram C didiamkan selama 30 detik. Ditetaskan Gram D didiamkan selama 1 menit, lalu dibilas dengan air mengalir.

- (3) Keringkan dan diamati dengan mikroskop perbesaran 40x dan 100x (Putri dkk, 2017).

Interpretasi Hasil:

Candida albicans pada pewarnaan gram menyerap warna ungu bersifat Gram positif dan memiliki bentuk bulat, cembung (Kemenkes RI, 2016).

8) Pembuatan Suspensi Jamur *Candida albicans*

Suspensi jamur *Candida albicans* diambil 1 ujung ose dan disuspensikan ke dalam larutan NaCl 0,85% pada tabung reaksi, kemudian dihomogenkan dengan alat mixer vortex hingga kekeruhannya sama dengan standar Mc Farland 0,5. Suspensi dibandingkan dengan tabung reaksi yang berisi kekeruhan Mc Farland 0,5 (Gesar dan Sasongkowat, 2015).

9) Pembuatan Larutan Kontrol Positif

Dihaluskan 200 mg obat ketokonazole lalu ditambahkan dengan 10 ml Aquadest steril dan dihomogenkan (Alfiah, 2020).

10) Pembuatan Larutan Uji Ekstrak Daun Pandan Wangi

- a) Identifikasi bahan uji Daun Pandan Wangi (*Pandanus amaryllifolius* Roxb) di Laboratorium Botani Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Lampung.

b) Pembuatan Simplisia

Sampel Daun Pandan Wangi sebanyak 3kg diambil dalam kondisi yang segar dan tidak berjamur, kemudian dicuci dengan air mengalir dan ditiriskan. Daun Pandan Wangi dikeringkan (pengeringan dilakukan secara tidak langsung menggunakan wadah yang ditutup dengan kain hitam). Simplisia yang telah kering dihaluskan dengan cara diblender, kemudian diayak agar didapatkan simplisia yang halus, lalu ditimbang 484 gram dan disimpan dalam wadah yang kering.

c) Pembuatan Ekstrak Daun Pandan Wangi

Simplisia yang telah dihaluskan dimasukan kedalam wadah lalu ditambahkan etanol 96% sebanyak 1000 mL dan diaduk menggunakan batang pengaduk lalu didiamkan selama 3 hari. Ekstrak disaring dengan penyaring. Diperoleh filtrat I, ditampung dalam botol dan ampas I ditambah etanol 96% 1000 mL lagi, diaduk dengan batang pengaduk lalu diadkan selama tiga malam. Kemudian ekstrak disaring dengan kertas saring sehingga diperoleh filtrat II. Selanjutnya proses yang sama dilakukan hingga diperoleh filtrat III. Seluruh filtrat yang diperoleh dari proses maserasi I, II, III digabung, disaring dan dipekatkan dengan *Vacum Rotary Evaporator* pada suhu 40°C hingga diperoleh ekstrak kental, Kemudian dilakukan pengenceran ekstrak dengan konsentrasi 70%, 80%, 90%, 100% dari larutan induk menggunakan rumus pengenceran.

11) Pelaksanaan Uji Daya Hambat

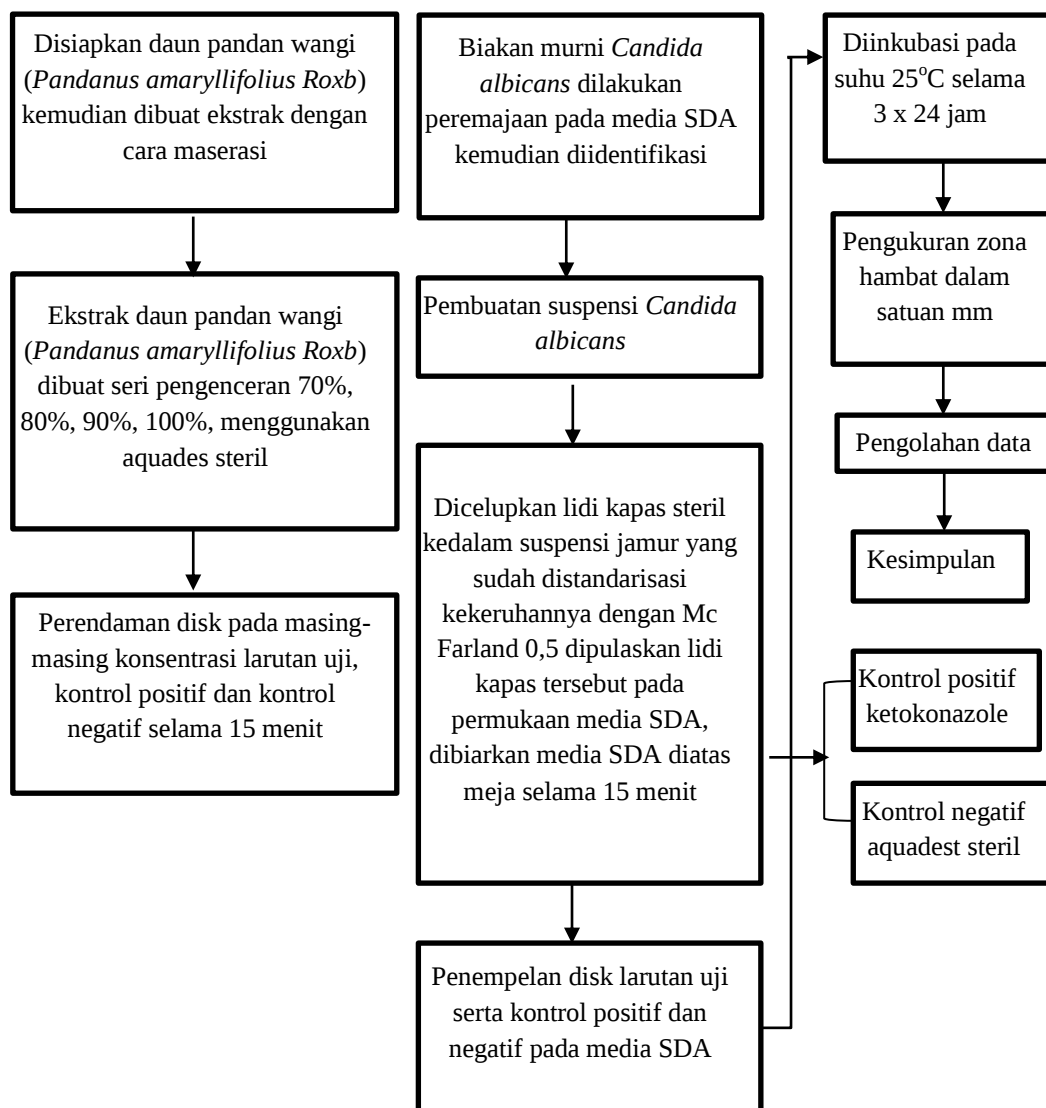
- a) Disiapkan media agar SDA (Saboraud Dextrose Agar) yang telah mengeras.
- b) Dichelupkan lidi kapas steril kedalam suspensi jamur *Candida albicans* yang telah dibandingkan kekeruhannya dengan standar Mc Farland 0,5, ditunggu sebentar agar suspensi jamur *Candida albicans* meresap ke dalam kapas, kemudian lidi kapas diangkat dan diperas di dalam dinding tabung dengan cara menekannya sambil diputar.
- c) Dipulaskan lidi kapas pada permukaan media SDA (Saboraud Dextrose Agar) sampai seluruh permukaan tertutup rapat dengan pulasan.
- d) Dibiarkan media SDA (Saboraud Dextrose Agar) diatas meja selama 15 menit agar suspensi jamur *Candida albicans* meresap ke dalam media.
- e) Disk kosong direndam ekstrak daun pandan wangi, kontrol positif dan kontrol negatif masing-masing 15 menit.
- f) Dilakukan penempelan disk diatas permukaan media SDA menggunakan pinset dengan cara sedikit ditekan sehingga cakram menempel pada media dengan masing-masing media berisi 2 cakram dengan jarak antar cakram adalah kurang lebih 15mm.

- g) Lempeng agar diinkubasi pada suhu 25°C selama 3x24 jam (Jawetz dkk, 2008).
- h) Zona jernih yang terbentuk di sekitar disk diukur menggunakan jangka sorong sebagai diameter daya hambat ekstrak Daun Pandan Wangi (*Pandanus amaryllifolius Roxb*) terhadap pertumbuhan jamur *Candida albicans*.
- i) Interpretasi Hasil pengukuran diameter zona hambat dapat di lihat Tabel 3.2 (Alfiah dkk, 2015).

Tabel 3.2. Kategori Diameter Zona Hambat (Alfiah dkk, 2015).

Diameter Zona Hambat	Kategori Zona Hambat
< 10 mm	Lemah
10-15 mm	Sedang
16 -20 mm	Kuat
>20 mm	Sangat Kuat

5. Skema Kerja Pemeriksaan



F. Pengolahan dan Analisis Data

1. Pengolahan Data

Data diperoleh dengan cara:

- Dilakukan pengujian ekstrak daun pandan wangi konsentrasi 70%, 80%, 90%, 100% terhadap pertumbuhan jamur *Candida albicans*.
- Dilakukan pengukuran zona hambat dari masing-masing konsentrasi menggunakan alat ukur dan satuan mm.
- Data zona hambat yang diperoleh disajikan dalam bentuk tabel.

2. Analisis Data

Data berupa diameter zona hambat pada masing-masing konsentrasi ekstrak daun pandan wangi dianalisis menggunakan uji ANOVA (*Analysis Of Variances*) jika didapatkan nilai $p = 0,000 (< 0.05)$ maka dilanjutkan ke uji BNT (Beda Nyata Terkecil).

G. *Ethical Clearance* (Persetujuan Etik)

Penelitian ini dilakukan atas izin komisi etik. Penelitian ini tidak akan menimbulkan bahaya bagi lingkungan, karena limbah yang dihasilkan dari proses penelitian ini dikumpulkan dan dimusnahkan dalam penanganan limbah. Limbah ekstrak daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius Roxb*) ditangani dengan cara langsung dibuang pada saluran pembuangan, karena limbah larutan tidak berbahaya bagi lingkungan. Limbah suspensi jamur *Candida albicans* pada tabung dan limbah media Sabouraud Dextrose Agar Plate dimusnahkan dengan cara perebusan pada suhu 100°C selama 30 menit, air bekas rebusan dibuang pada saluran pembuangan, Kemudian tabung dan plate direbus kembali dengan penambahan detergen, Setelah itu air bekas rebusan dibuang pada saluran pembuangan, Setelah itu tabung dan plate yang telah digunakan dicuci menggunakan detergen dan dibilas dengan air mengalir.