

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis penelitian

Jenis penelitian yang digunakan bersifat eksperimental. Dengan menggunakan variable bebas terikat penelitian ekstrak buah mengkudu (*Morinda citrifolia*) dengan konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, dan 100% terhadap pertumbuhan jamur *Aspergillus flavus*.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi penelitian

Tempat penelitian ini dilakukan di Laboratorium Parasitologi Teknologi Laboratorium Medis Politeknik Kesehatan TanjungKarang. Proses ekstraksi dilakukan di Laboratorium Kimia Organik Fakultas MIPA Universitas Lampung.

2. Waktu penelitian

Waktu penelitian dilakukan pada bulan Mei-Juni tahun 2023.

C. Subyek penelitian

Subyek penelitian ini yaitu buah mengkudu (*Morinda citrifolia*) yang diperoleh di daerah Rejosari Mataram, RT/RW 001/01, Seputih Mataram, Lampung Tengah, kriteria buah mengkudu yang masih segar, berwarna hijau dan bebas dari hama, tidak terlalu tua, dan juga tidak terlalu muda, dengan buah berukuran diameter 10 cm. Buah mengkudu dibuat ekstrak dengan pelarut etanol 96% dan dilakukan pengenceran dengan konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, dan yang tidak di encerkan konsentrasi 100% yang digunakan sebagai larutan uji. Jumlah perlakuan buah mengkudu sebanyak 10 perlakuan dengan 3 kali pengulangan yang didapatkan dari perhitungan menggunakan rumus Federer, yaitu $(t-1)(r-1) \geq 15$.

D. Variabel dan Definisi Operasional Penelitian

No	Variabel penelitian	Definisi	Cara ukur	Alat ukur	Hasil ukur	Skala
1	Ekstrak buah mengkudu (<i>Morinda citrifolia</i>)	Buah mengkudu yang sudah di ekstrak menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96% kemudian dilakukan pengenceran dengan konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%.	Ekstrak diencerkan dengan rumus $V_1 \times \%_1 = V_2 \times \%_2$	Pipet ukur	%	Rasio
	Obat Ketokonazol	Ketokonazol diencerkan dengan aquades steril menjadi konsentrasi 2%.	Ditimbang 0,02 gram ketokonazol, dilarutkan dalam 10 ml aquades steril.	Neraca analitik	%	Rasio
2	Pertumbuhan jamur <i>Aspergillus flavus</i>	Jamur <i>Aspergillus flavus</i> yang mampu menghambat Buah Mengkudu	Diameter hambat	zone reader	Diameter (mm)	Rasio

E. Pengumpulan Data

1. Prosedur Penelitian

- a) Pengajuan permohonan izin dari jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Tanjungkarang untuk dilakukan determinasi buah mengkudu di Laboratorium Botani Fakultas MIPA Universitas Lampung, proses ekstraksi dilakukan di Laboratorium Kimia FMIPA Universitas Lampung, dan pemesanan strain jamur ke Universitas Indonesia (UI).
- b) Pengumpulan bahan-bahan pemeriksaan seperti strain *Aspergillus flavus*, media PDA, *blank disc*, dan buah mengkudu (*Morinda Citrifolia*).
- c) Determinasi bahan uji buah mengkudu di Laboratorium Botani Fakultas MIPA Universitas Lampung.
- d) Pembuatan simplisia buah mengkudu.
- e) Pengenceran bertingkat larutan uji menjadi konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 80%, 90%, 100%.
- f) Pembuatan suspensi *Aspergillus flavus*.
- g) Pengujian daya hambat ekstrak buah mengkudu (*Morinda Citrifolia*)

terhadap pertumbuhan *Aspergillus flavus* dengan metode difusi metode difusi cakram *Kirby Bauer*.

- h) Diamati zona hambat yang terbentuk pada masing-masing konsentrasi dan diukur menggunakan alat ukur jangka sorong dalam satuan (mm).

2. Metode Pemeriksaan

Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan metode maserasi yang kemudian dilakukan evaporasi. Pada penelitian ini metode pemeriksaan uji daya hambat yang digunakan yaitu metode difusi agar dengan cara *Kirby Bauer*.

3. Pelaksanaan Uji Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan untuk melihat secara kualitatif kandungan senyawa metabolit pada buah mengkudu seperti flavonoid, tanin, saponin, steroid, dan terpenoid.

- 1) Senyawa flavonoid, dipipet 0,5 ml sampel, ditambahkan 0,5 gr bubuk Magnesium (Mg), lalu tambahkan 5 ml HCl pekat (tetes demi setetes). Bila hasil berwarna merah atau kuning dan terdapat busa menunjukkan hasil positif.
- 2) Senyawa tannin, dipipet 1 ml sampel, ditambahkan 3 tetes larutan FeCl_3 10%. Bila larutan berwarna hitam kebiruan menunjukkan hasil positif.
- 3) Senyawa saponin, dipipet 0,5 ml sampel, ditambahkan 5 ml aquades, lalu dikocok selama 30 detik, dan amati hasil yang terbentuk. Bila terdapat busa menunjukkan hasil positif
- 4) Senyawa steroid, dipipet 0,5 ml sampel, ditambahkan 0,5 ml asam asetat glasial, lalu tambahkan 0,5 ml H_2SO_4 . Bila warna pada sampel berubah menjadi biru atau ungu menunjukkan hasil positif.
- 5) Senyawa terpenoid, dipipet 0,5 ml sampel, tambahkan 0,5 ml asam asetat glasial, lalu tambahkan 0,5 ml H_2SO_4 . Bila warna pada sampel berubah menjadi merah atau kuning menunjukkan hasil positif.

(Tasmin dkk, 2014)

4. Prosedur Pemeriksaan

a. Persiapan alat dan bahan pemeriksaan, yaitu:

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu, neraca analitik, autoclave, gunting, kapas, beaker glass 100 ml, wadah sampel, tabung reaksi, pipet ukur, lidi kapas steril, disc blank, pinset, cawan petri, kertas kopi, oven, corong gelas, vortex mixer, hotplate, Erlenmeyer 500 ml, lampu spirtus, korek api, jangka sorong, handscoon, masker, dan inkubator. Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu larutan ekstrak buah mengkudu dengan konsentrasi 10%-100%, aquades steril, NaCl (0,85%) steril, stok jamur *Aspergillus flavus*, standar *McFarland* 0.5, kloramfenikol, ketokonazol, media *Potato Dextrose Agar* (PDA).

b. Identifikasi bahan uji yaitu buah mengkudu (*Morinda Citrifolia*) di Fakultas MIPA Biologi Universitas Lampung. Untuk mengetahui kebenaran sampel, bahwa sampel benar-benar spesies *Morinda Citrifolia*.

c. Pengujian daya hambat ekstrak buah mengkudu *Morinda Citrifolia* terhadap pertumbuhan jamur *Aspergillus flavus* dengan prosedur kerja sebagai berikut:

1) Sterilisasi Alat

Alat-alat gelas yang digunakan dalam penelitian ini dibersihkan dan dikeringkan terlebih dahulu kemudian dibungkus dengan menggunakan kertas coklat. Disterilkan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C 1 atm selama 15 menit (Mutmainnah dkk, 2019).

2) Pembuatan Kloramfenikol

Pembuatan Larutan Kloramfenikol Setiap 1000 ml Potato Dextrose Agar (PDA) memerlukan 400 mg kloramfenikol, setiap 250 mg kloramfenikol dilarutkan dalam 10 ml NaCl 0,85%, dengan perhitungan $\frac{400 \text{ mg}}{250 \text{ mg}} \times 10 \text{ ml} = 16 \text{ ml}$. Maka untuk 400 mg Kloramfenikol diperlukan NaCl 0,85% sebanyak 16 ml (Basarang, 2020).

3) Pembuatan media agar dari *Potato Dextrose Agar*

Ditimbang Potato Dextrose Agar 9,75gram bubuk ditambahkan dengan aquades 250 ml dan dikalikan dengan volume yang dibutuhkan. Kemudian ditimbang, diaduk selanjutnya dipanaskan di atas hot plate sampai larut sempurna. Setelah larut sempurna, ditambahkan larutan kloramfenikol 15 ml (untuk mencegah tumbuhnya kuman kontaminasi), lalu media disterilkan di autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit pada tekanan 1 atm. Setelah disterilkan media dituang kedalam cawan petri yang telah disterilkan dengan ketebalan +3 mm dan dibiarkan dingin (Safitri dkk, 2010).

4) Uji sterilisasi media

Media yang sudah selesai dibuat, diambil beberapa plate kemudian diinkubasi 37°C selama 2x24 jam. Apabila ada pertumbuhan 2 koloni saja per plate, maka dianggap tidak steril (Alfiah dkk, 2015).

5) Pembuatan larutan standar *Mc Farland*

Dicampurkannya 9,95 ml larutan H₂SO₄ 1% dengan 0,05 ml larutan BaCl₂H₂O 1% sehingga volume menjadi 10 ml. Kemudian dikocok hingga homogen. Larutan harus dikocok setiap akan digunakan untuk membandingkan suspensi (Soemarno, 2000).

6) Pembuatan NaCl 0,85%

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

7) Pembuatan Larutan Ketokonazol

Dihaluskan 0,02gram ketokonazol, kemudian ditambahkan dengan 10 ml aquades steril dan dihomogenkan. Kemudian masukkan disk blank ke dalam larutan ketokonazol. Direndam disk blank ke dalam larutan tersebut selama 15 menit, setelah 15 menit diambil disk blank yang sudah direndam dan letakkan di atas media PDA yang telah dipulas dengan suspensi jamur.

8)

Identifikasi *Aspergillus flavus*

a) Pemeriksaan Makroskopis

Ditanam jamur pada media PDA plate, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 3x24 jam, lalu diamati koloni *Aspergillus flavus* yang tumbuh.

Interpretasi hasil:

Aspergillus flavus pada media PDA berwarna kuning kehijauan, koloni tekstur seperti pasir, berbentuk jeruji memiliki hifa yang berseptat.

b) Pemeriksaan Mikroskopis

(1) Diambil koloni jamur biakan media PDA yang telah ditanam, kemudian diletakkan pada permukaan objek glass, dibuat preparat dan ditambah NaCl 0,85%, kemudian dihomogenkan, lalu difiksasi.

(2) Diletakkan objek glass pada rak pengecatan, selanjutnya dilakukan pengecatan gram. Diteteskan gram A didiamkan selama 1 menit, lalu dibilas dengan air mengalir. Diteteskan gram B didiamkan selama 1 menit, lalu dibilas dengan air mengalir. Diteteskan gram C didiamkan selama 30 detik, lalu dibilas dengan air mengalir. Diteteskan gram D didiamkan selama 1 menit, lalu dibilas dengan air mengalir.

(3) Dikeringkan kemudian diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran awal 10x, kemudian lanjut perbesaran 100x (Yusmaniar, 2017). *Aspergillus flavus* pada pewarnaan gram akan menyerap warna ungu yang bersifat Gram Positif dan memiliki bentuk bulat lonjong (Ratnawati dkk, 2016).

9) Pembuatan suspensi *Aspergillus flavus*

Diambil koloni *Aspergillus flavus* I ujung ose dan disuspensikan ke dalam larutan NaCl 0,85% yang telah dibagi ke dalam beberapa tabung reaksi, kemudian dihomogenkan dengan alat mixer vortex hingga kekeruhannya sama dengan standar Mc Farland 0,5. Koloni jamur yang sudah dibuat suspensi

dibandingkan dengan tabung reaksi yang berisi kekeruhan Mc Farland 0,5 dengan latar belakang putih atau gelap. Apabila kurang keruh, tambahkan koloni *Aspergillus flavus*, sedangkan apabila lebih keruh, maka ditambahkan NaCl 0,85% (Soemarno, 2000).

- 10) Pembuatan larutan uji ekstrak buah mengkudu (*Morinda citrifolia*) dengan metode maserasi.
 - a) Identifikasi bahan uji buah mengkudu (*Morinda citrifolia*) di Laboratorium Botani Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Lampung.
 - b) Pembuatan simplisia buah mengkudu (*Morinda citrifolia*)
Diambil +6 kg buah mengkudu, kemudian dicuci dengan air mengalir dan ditiriskan. Buah mengkudu dikeringkan dengan cara ditutup kain hitam di bawah sinar matahari secara tidak langsung, selain itu dapatjuga menggunakan oven dengan suhu 50°C selama 150 menit sebagai alternaif lain selain sinar matahari (Dharma, 2020). Simplisia yang telah kering dihaluskan dengan cara tumbuk, kemudian diayak agar didapatkan simplisia yang halus, dan disimpan dalam wadah yang kering.
 - c) Pembuatan ekstrak buah mengkudu (*Morinda citrifolia*) dengan metode Maserasi, simplisia buah mengkudu dijadikan ekstrak dengan pelarut etanol 96%, kemudian dibuat konsentrasi 10-100%, yang digunakan sebagai larutan uji dalam menghambat pertumbuhan *Aspergillus flavus*. Simplisia yang telah halus dimasukkan ke dalam botol berwarna gelap dengan volume 1000 ml sebanyak 100gram dan dituang etanol 96% sebanyak 700 ml, kemudian dimasukkann ke dalam botol gelap dan ditutup menggunakan aluminium foil, selanjutnya diamkan selama 5 hari ditempat yang terlindung cahaya dengan pengadukan 2-3 kali setiap harinya. Setelah 5 hari, filtrat dan presifitat dipisahkan menggunakan kertas saring (Maserat I).

Kemudian presifitat yang telah dipisahkan direndam kembali dengan etanol 96% sebanyak 250 ml, dan didiamkan selama 2 hari kemudian disaring menggunakan kertas saring (maserat II). Maserat I dan II dicampur kemudian diuapkan di atas rotary evaporator pada suhu 40°C hingga diperoleh ekstrak kental, ekstrak diuapkan kembali di atas hotplate pada suhu 60°C. Selanjutnya dilakukan pengulangan untuk memastikan bahwa ekstrak sudah tidak mengandung pelarut lagi (ekstrak 100%). Kemudian simpan ekstrak pada wadah berbahan gelas berwarna gelap dan steril, bersih dan kering. Selanjutnya dilakukan pengenceran ekstrak dengan konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, Pengenceran dengan menggunakan rumus berikut:

$$V_1 \times \%_1 = V_2 \times \%_2$$

Keterangan:

VI = Volume larutan uji yang dipipet (ml)

%1 = Konsentrasi larutan uji (100%)

V2 = Volume larutan uji yang diinginkan (ml)

%2 = Konsentrasi yang akan dibuat (%)

1. Pelaksanaan Uji Daya Hambat

- a. Disiapkan media PDA yang telah mengeras.
- b. Dichelupkan lidi kapas steril ke dalam suspensi *Aspergillus flavus* yang telah dibandingkan kekeruhannya dengan standar Mac Farland 0.5, kemudian ditunggu sebentar supaya suspensi *Aspergillus flavus* meresap ke dalam kapas, kemudian lidi kapas diangkat dan diperas di dalam dinding tabung dengan cara menekannya sambil diputar (Pollack, 2014).
- c. Dipulaskan lidi kapas pada permukaan media PDA sampai seluruh permukaan tertutup rapat dengan pulasan, dilakukan 3x pulasan pada permukaan media dengan membolak balik lidi kapas steril

pada setiap pulasan, dari pulasan ke I ke pulasan II, kemudian plate diputar 90°C sedangkan dari pulasan II ke pulasan ke III plate diputar 45°C (Pollack, 2014).

- d. Dibiarkan media PDA tersebut di atas meja selama 5-15 menit supaya suspsi jamur meresap ke dalam media.
- e. Disk kosong direndam dengan ekstrakbuah mengkudu, kontrol positif dankontrol negatif masing-masing 15 menit.
- f. Dilakukan penempelan *disc* obat, dengan cara meletakkan *disc* obat di permukaan media dengan pinset, dengan cara sedikit ditekan sehingga cakram menempel pada media PDA dengan masing-masing media berisi 2 cakram dengan jarak antar cakram yaitu ± 15 mm.
- g. Lempeng agar diinkubasi pada suhu 37°C selama 3x24 jam.
- h. Zona bening yang terbentuk di sekitar disc obat diukur diameternya dengan menggunakan jangka sorong sebagai diameter daya hambat buah mengkudu (*Morinda citrifolia*) terhadap pertumbuhan *Aspergillus flavus* (Soemarno, 2000).

Interpretasi Hasil:

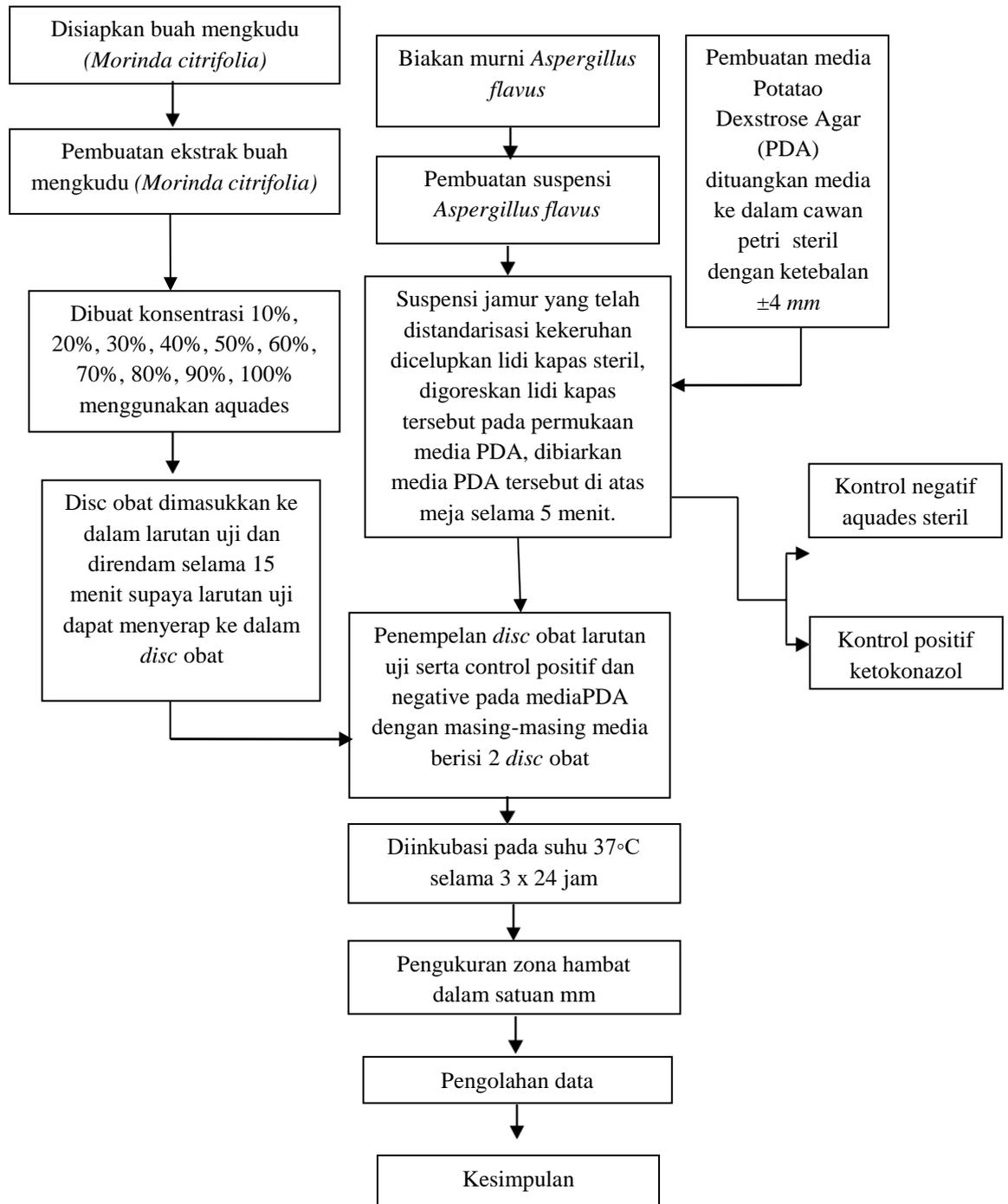
Penelitian kategori respon hambatan pertumbuhan jamur dapat dilihat pada tabel 3.1.

Tabel 3.1 Klasifikasi respon hambatan pertumbuhan jamur

Diameter Zona Bening	Respon Hambatan Pertumbuhan
<10 mm	Lemah
10-15 mm	Sedang
16-20 mm	Kuat
>20 mm	Sangat Kuat

Sumber (Phutera, 2007).

5. Skema Kerja



F. Pengolahan dan Analisa Data

1. Pengolahan data

- a. Dilakukan pengujian daya hambat ekstrak buah mengkudu (*Morinda citrifolia*) dengan konsentrasi 10-100% terhadap pertumbuhan *Aspergillus flavus*.
- b. Dilakukan pengukuran zona hambat dari masing-masing konsentrasi pada tiap pengulangan menggunakan alat ukur dalam satuan *mm*.
- c. Data zona hambat yang diperoleh disajikan dalam bentuk tabel.

2. Analisis Data

Penelitian ini menggunakan analisa data univariat dan analisa bivariat.

- a. Analisa univariat adalah analisa data univariat terhadap variabel dari hasil penelitian dengan konsentrasi 10-100% ekstrak buah mengkudu (*Morinda citrifolia*) terhadap pertumbuhan jamur *Aspergillus flavus* yang dilakukan pengulangan 3 kali kemudian diakumulasi dan dihitung rata-ratanya.
- b. Analisis bivariat data yang berupa hasil diameter zona hambat yang dianalisis dengan uji *Oneway Anova* untuk mengetahui perbedaan antar konsentrasi 10-100% ekstrak buah mengkudu (*Morinda citrifolia*) terhadap pertumbuhan jamur *Aspergillus flavus* pada tiap perlakuan, serta kontrol positif (Ketokonazol). Dan uji *T- Test* untuk mengetahui perbedaan ekstrak buah mengkudu dengan pertumbuhan jamur *Aspergillus flavus* konsentrasi yang paling efektif dan kontrol positif (Ketokonazol).

G. Ethical Clearance

Penelitian yang dilakukan atas izin etik, penelitian ini tidak menimbulkan bahaya bagi lingkungan, limbah yang dihasilkan dan proses penelitian ini akan dikumpulkan dan dimusnahkan dalam penanganan limbah. Limbah larutan uji ekstrak buah mengkudu (*Morinda citrifolia*) ditangani dengan cara langsung dibuang pada saluran pembuangan, dikarenakan limbah larutan tidak membahayakan lingkungan. Limbah media serta limbah suspensi *Aspergillus flavus* pada tabung dimusnahkan dengan cara perebusan pada suhu 100°C selama 30 menit, air bekas rebusan limbah media dan suspensi *Aspergillus flavus* dibuang pada saluran pembuangan, lalu setelah penelitian plate dan tabung direbus kembali dengan penambahan deterjen, setelah itu air bekas

rebusan dibuang pada saluran pembuangan, plate dan tabung dicuci menggunakan deterjen pada air mengalir.