

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

Penelitian ini dilakukan bersifat eksperimental menggunakan desain penelitian dengan RAL (Rancangan Acak Lengkap). Terdapat 2 variabel yakni variabel bebas yaitu ekstrak daun kenikir (*Cosmos caudatus Kunth*) dengan konsentrasi 55%, 70%, 85%, 100% dan variabel terikatnya adalah pertumbuhan jamur *Aspergillus flavus*.

Pada penelitian ini menggunakan metode difusi cakram *Kirby bauer* untuk melihat zona hambat yang terbentuk, dengan menggunakan kontrol negatif yakni aquadest steril dan kontrol positif menggunakan ketokonazol, kontrol positif dan negatif masuk dalam kelompok perlakuan sehingga pengulangan dilakukan sebanyak 4 kali yang diperoleh dari hasil perhitungan dengan menggunakan rumus freederer yakni $(t-1) (n-1) \geq 15$ dapat dilihat pada lampiran 1.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Parasitologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang dari pembuatan media (SDA) dan pemeriksaan uji daya hambat ekstrak daun kenikir (*Cosmos caudatus kunth*) terhadap pertumbuhan jamur *Aspergillus flavus*. Proses identifikasi determinasi dapat dilihat pada lampiran 12 dan ekstraksi daun kenikir (*Cosmos caudatus kunth*) dilaksanakan pada Laboratorium Botani Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Lampung penelitian dilaksanakan pada bulan Maret sampai dengan Mei 2024.

C. Subjek Penelitian

Daun kenikir (*Cosmos caudatus kunth*) yang diambil dari perkebunan di daerah Kecamatan Sekincau Lampung Barat dengan daun yang segar dan berwarna hijau tua, tidak berwarna kekuningan dan tidak berwarna kecoklatan. Daun hijau tua memiliki kadar flavonoid yang lebih tinggi dibandingkan daun yang berwarna hijau muda (Ardiansyah dkk, 2022). Daun kenikir (*Cosmos caudatus kunth*) dijadikan ekstrak lalu dibuat pengenceran

dengan konsentrasi 55%, 70%, 85%, 100% yang digunakan sebagai larutan uji dalam menghambat pertumbuhan jamur *Aspergillus flavus*. Jamur *Aspergillus flavus* yang digunakan dalam penelitian ini didapatkan dari Laboratorium Parasitologi Universitas Indonesia (UI).

D. Variabel dan Definisi Operasional Penelitian

Tabel 3.1 Variabel dan Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi	Cara ukur	Alat ukur	Hasil ukur	Skala
1	Variabel bebas: Ekstrak daun kenikir (<i>Cosmos caudatus kunth</i>)	Daun kenikir yang sudah di ekstrak menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96% lalu dilakukan pengenceran dengan konsentrasi 55%, 70%, 85%, 100%	Ekstrak diencerkan dengan rumus $V_1 \times \%1 = V_2 \times \%2$	Pipet Ukur	Ekstrak daun kenikir (<i>Cosmos caudatus kunth</i>) konsentrasi 55%, 70%, 85%, 100%	Interval
2	Variabel terikat: Pertumbuhan jamur <i>Aspergillus flavus</i>	Hambatan pertumbuhan jamur <i>Aspergillus flavus</i> oleh ekstrak daun kenikir (<i>Cosmos caudatus kunth</i>)	Mengukur diameter zona hambat yang terbentuk	Jangka sorong	Diameter zona hambat dalam kategori: 1. <10 mm daya hambat lemah 2. 10-15 mm daya hambat sedang 3. 16-20 mm daya hambat kuat 4. >20 mm daya hambat sangat kuat	Ordinal

Sumber: (Yusran & Muhasbir, 2018).

E. Pengumpulan Data

1) Prosedur Penelitian

- a. Mengajukan pembuatan surat permohonan izin dari Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang untuk melakukan uji determinasi dan ekstraksi daun kenikir (*Cosmos caudatus kunth*) dilakukan pada Laboratorium Botani Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Lampung dan pemesanan strain jamur dari Laboratorium Parasitologi Universitas Indonesia (UI).

- b. Menyiapkan alat dan bahan pemeriksaan seperti bahan yang digunakan yaitu media SDA, daun kenikir (*Cosmos caudatus kunth*), strain jamur *Aspergillus flavus* serta alat alat laboratorium.
 - c. Determinasi bahan uji daun kenikir (*Cosmos caudatus kunth*) di Laboratorium Botani Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Lampung.
 - d. Pembuatan simplisia dan pembuatan ekstrak daun kenikir (*Cosmos caudatus kunth*).
 - e. Uji fitokimia daun kenikir (*Cosmos caudatus kunth*) di Laboratorium Botani Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Lampung.
 - f. Pembuatan pengenceran dengan konsentrasi 55%, 70%, 85%, 100%.
 - g. Pembuatan suspensi *Aspergillus flavus*.
 - h. Pengujian ekstrak daun kenikir (*Cosmos caudatus kunth*) terhadap pertumbuhan jamur *Aspergillus flavus*.
 - i. Diamati zona hambat yang terbentuk pada masing-masing konsentrasi dan diukur dengan menggunakan alat ukur dalam satuan (mm).
- 2) Metode Pemeriksaan
- Pada penelitian ini menggunakan metode difusi cakram dengan cara *Kirby Bauer*.
- 3) Prosedur Kerja
- a. Persiapan alat dan bahan penelitian

Alat yang dipakai pada penelitian ini yaitu pinset, lidi kapas steril, jangka sorong, kertas cakram, rak tabung, tabung reaksi, cawan petri, timbangan, pipet ukur, batang pengaduk, neraca analitik, blender, kertas kopi, incubator, spatula, erlenmeyer, beaker glass, rotary vakum evaporator, autoclave, oven, aluminium foil, hotplate, lampu spiritus, korek api, mikroskop, handscoon, masker. Bahan yang digunakan ekstrak daun kenikir, media SDA, ketokonazol, etanol 96%, aquades steril, Nacl 0,85%, strain murni jamur *Aspergillus flavus*, kloramfenikol, standar McFarland 0.5 (Nuryani dkk, 2016).
 - b. Identifikasi dan determinasi daun kenikir (*Cosmos caudatus kunth*) di Laboratorium Botani Fakultas MIPA Universitas Lampung.

c. Uji daya hambat ekstrak daun kenikir (*Cosmos caudatus kunth*) pada pertumbuhan jamur *Aspergillus flavus* dengan prosedur berikut:

1) Sterilisasi Alat

Alat-alat gelas yang digunakan untuk penelitian harus disterilisasikan seperti cawan petri, pipet ukur dan tabung reaksi. Alat yang akan disterilisasi dibungkus menggunakan kertas lalu masukan kedalam oven dengan menggunakan suhu sekitar 160°C selama kurang lebih 2 jam (Kausar, 2023).

2) Pembuatan Kloramfenikol

Setiap 1000 ml *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) memerlukan 400 mg kloramfenikol, setiap 250 mg kloramfenikol dilarutkan dalam 10 ml NaCl 0,85% maka untuk 400 mg diperlukan NaCl 0,85% sebanyak $\frac{400 \text{ mg}}{250 \text{ mg}} \times 10 = 16$ ml (Soemarno, 2000).

3) Pembuatan Media SDA (*Saboraud Dextrose Agar*).

Media SDA ditimbang sebanyak 65 gr lalu setelah itu dilarutkan dalam 1000 ml aquades kemudian dipanaskan diatas hotplate. Setelah itu media disterilisasikan menggunakan alat autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah selesai sterilisasi, kemudian biarkan sampai suhu 45-50°C lalu tambahkan larutan kloramfenikol dan tuang media kedalam cawan petri steril dan biarkan mengeras (Basarang, 2020).

4) Pembuatan Standar McFarland

Dipipet sebanyak 9,95 ml larutan H₂so₄ 1% lalu tambahkan 0,05 ml BaCl₂ 1% sehingga volumenya menjadi 10 ml, kemudian larutan dihomogenkan (Audina dkk, 2018).

5) Pembuatan NaCl 0,85%

Ditimbang 0,85 gr NaCl larutkan dalam 100 ml aquades steril, kemudian homogenkan.

6) Pembuatan kontrol positif ketokonazole

Ditimbang 200 mg ketokonazole dan ditambahkan dengan aquades steril sebagai pelarut sebanyak 10 ml, lalu dihomogenkan.

7) Identifikasi Jamur *Aspergillus flavus*

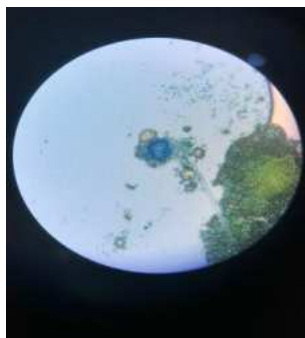
a) Pemeriksaan Makroskopis

Ditanam jamur *Aspergillus flavus* pada media SDA pada plate, kemudian di inkubasi pada suhu 37°C selama 3x24 jam, lalu amati koloni jamur *Aspergillus flavus* yang tumbuh.

Interpretasi hasil: jamur *Aspergillus flavus* yang tumbuh pada media SDA berwarna hijau kekuningan dan pada bagian bawah berwarna kekuningan hingga kecoklatan (Lindawati & Rini, 2019).

b) Pemeriksaan Mikroskopis

- 1) Objek glass dan cover glass dibersihkan dengan alkohol 70%, setelah dibersihkan, lalu diambil 1 koloni jamur *Aspergillus flavus* dari media SDA, lalu letakan ditengah objek glass (Lindawati & Rini, 2019).
- 2) Tetesi 1-2 tetes dengan larutan *Lactophenol Cotton Blue* (LBC) diteteskan di tengah objek glass yang berisi koloni jamur *Aspergillus flavus* preparat ditutup dengan cover glass (Lindawati & Rini, 2019).
- 3) Amati dibawah mikroskop dengan perbesaran 10x lalu diperjelas menggunakan lensa objektif 40x (Lindawati & Rini, 2019).
- 4) Interpretasi hasil jamur *Aspergillus flavus* secara mikroskopis yaitu vesikula berbentuk bulat dan konidia berbentuk bulat (Lindawati & Rini, 2019).



Gambar 2.4 Hasil Pengamatan Mikroskopis

8) Pembuatan suspensi jamur *Aspergillus flavus*

Dipipet 10 ml NaCl fisiologis 0,85% lalu masukan kedalam tabung reaksi, kemudian ambil satu mata ose biakan jamur *Aspergillus flavus* setelah itu homogenkan lalu bandingkan kekeruhan suspensi jamur dengan standar Mc Farland (Audina dkk, 2018).

9) Pembuatan ekstrak daun kenikir (*Cosmos caudatus kunth*)

a) Pembuatan Simplisia

Pembuatan simplisia daun kenikir (*Cosmos caudatus kunth*) diambil sampel daun kenikir diambil sebanyak 5 kg kemudian dicuci menggunakan air mengalir sampai bersih lalu tiriskan, daun kenikir (*Cosmos caudatus kunth*) dikeringkan di bawah sinar matahari secara tidak langsung dengan cara ditutup menggunakan kain hitam. Setelah simplisia kering kemudian dihaluskan menggunakan blender lalu disaring kemudian letakkan pada wadah yang bersih dan kering (Kausar dkk, 2023).

b) Pembuatan ekstrak daun kenikir (*Cosmos caudatus kunth*)

Daun kenikir (*Cosmos caudatus kunth*) yang sudah menjadi serbuk ditimbang 500 gram lalu dimasukkan kedalam wadah bejana, rendam simplisia menggunakan etanol 96% dan diaduk dengan batang pengaduk lalu diamkan selama 5 x 24 jam, kemudian tampung maserat menggunakan kertas saring dan diperoleh filtrat I, setelah itu rendam kembali ampas I menggunakan pelarut yang sama, lalu diaduk dengan batang pengaduk dan diamkan selama 3 hari setelah itu saring menggunakan kertas saring dan diperoleh filtrat II. Selanjutnya lakukan hal yang serupa sampai memperoleh filtrat III. Gabungan seluruh filtrat yang di dapat lalu disaring dan dipekatkan menggunakan Vacum Rotary Evaporator (RVE) dengan suhu 40°C sampai didapatkan ekstrak pekat. Setelah itu dilakukan pengenceran 55%, 70%, 85% dan 100% menggunakan aquades steril dan dilakukan perhitungan menggunakan rumus pengenceran (Manu, 2013). Hasil perhitungan pengenceran tiap konsentrasi dapat dilihat pada lampiran 2

$$V1 \times \%1 = V2 \times \%2$$

Keterangan:

VI = Volume larutan uji yang dipipet (ml)

%1 = Konsentrasi larutan uji (100%)

V2 = Volume larutan uji yang akan dibuat dengan aquades steril

%2 = Konsentrasi yang akan dibuat (%).

10) Pemeriksaan uji daya hambat

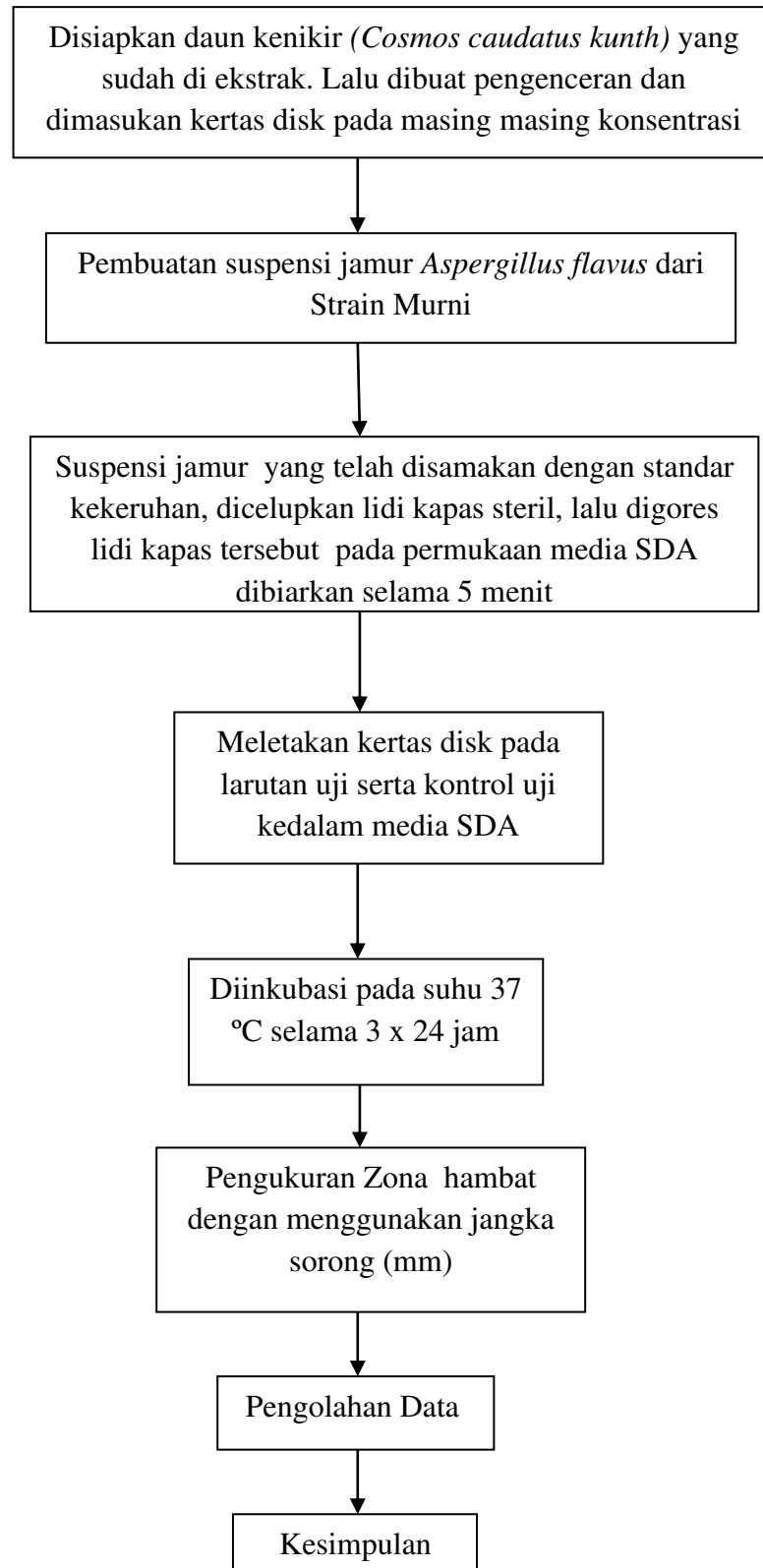
- a) Siapkan media SDA (*Saboraud Dextrose Agar*) yang sudah mengeras
- b) Dimasukan lidi kapas steril kedalam suspensi jamur *Aspergillus flavus* yang telah disamakan dengan kekeruhan standar McFarland 0,5%, biarkan sebentar agar suspensi menyerap, angkat kapas lidi steril dan tekan sedikit lidi tersebut ke dinding tabung agar sedikit meresap supaya tidak basah (Nuryani dkk, 2016).
- c) Setelah itu lidi kapas yang berisi suspensi digoreskan ke permukaan media *Saboraud Dextrose Agar* (SDA), sampai suspensi jamur *Aspergillus flavus* tersebar merata pada media (Nuryani dkk, 2016).
- d) Letakan media *Saboraud Dextrose Agar* (SDA) ditempat yang datar biarkan sampai 5-15 menit supaya suspensi jamur *Aspergillus flavus* meresap kedalam media (Nuryani dkk, 2016).
- e) Kertas cakram steril dimasukan pada disk yang sudah berisi ekstraksi daun kenikir (*Cosmos caudatus kunth*) dengan konsentrasi 55%, 70%, 85%, 100% dan biarkan selama 15 menit.
- f) Setelah itu letakan kertas cakram ke dalam media SDA menggunakan pinset dengan sedikit ditekan supaya kertas cakram menempel pada media SDA dengan jarak kertas antara satu dengan yang lain 15 mm.
- g) Lalu inkubasi selama 3 x 24 jam dengan suhu 37°C (Kausar dkk, 2023).
- h) Zona hambat yang terbentuk disekitar kertas cakram diukur menggunakan jangka sorong sebagai diameter zona hambat daun kenikir (*Cosmos caudatus kunth*) terhadap pertumbuhan jamur *Aspergillus flavus*.
- i) Interpretasi hasil pengukuran zona hambat pertumbuhan jamur dapat dilihat tabel berikut:

Tabel 3.2 Interpretasi zona hambatan pertumbuhan jamur

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

Sumber: (Yusran & Muhasbir,2018)

5. Alur Penelitian



F. Pengolahan dan Analisa Data

A. Pengolahan Data

- 1) Dilakukan pengujian daya hambat daun kenikir (*Cosmos caudatus kunth*) dengan konsentrasi 55%, 70%, 85% dan 100% terhadap pertumbuhan jamur *Aspergillus flavus*.
- 2) Data didapatkan dari pengukuran zona hambat dari tiap konsentrasi pada tiap pengulangan dan diukur menggunakan alat ukur jangka sorong (mm).
- 3) Data dilampiri pada bentuk tabel dan diolah dengan uji statistik untuk melihat perbedaan antara kedua variabel.

B. Analisa Data

Analisa data yang dipakai yaitu *One Way-Anova*, jika data tidak terdistribusi normal uji statistik yang dipakai yaitu *kruskal wallis* untuk menentukan apakah ada perbedaan signifikan antara dua statistik antara dua kelompok variabel dan untuk menentukan rata rata perbedaan menggunakan *Mann Whitney*. Data yang diperoleh untuk memasukan hasil uji statistik yaitu dari mengamati tiap konsentrasi ekstrak daun kenikir (*Cosmos caudatus kunth*) yang dilakukan pengulangan sebanyak 4 kali dengan menggunakan metode difusi cakram *Kirby Bauer*.

G. Ethical Clearence (Persetujuan etik)

Penelitian ini dilakukan atas izin komisi etik melalui tahapan kaji etik oleh Komite Etik Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang dengan keterangan layak etik nomor : No.340/KEPK-TJK/III/2024, pada tanggal 19 Maret 2024.