

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental menggunakan desain penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Ada 2 variabel yakni variabel bebas (Independent) ekstrak daun katuk (*Sauropus androgynus* (L.) Merr.) pada konsentrasi 15%, 30%, 45%, 60%, 75% dan variabel terikat (Dependent) yaitu pertumbuhan jamur *Aspergillus flavus*.

Pemeriksaan dengan metode defusi cakram *Kirby Baure* untuk mengamati zona hambat yang dihasilkan. Pada penelitian ini kontrol positif menggunakan ketokonazol serta kontrol negatif menggunakan aquadest steril. Pengulangan dilakukan pada 5 kali dan didapatkan dari hasil perhitungan dengan rumus Freederer yaitu $(t - 1)(n - 1) \geq 15$.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian akan dilaksanakan di Laboratorium Parasitologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Tanjungkarang dari pembuatan media (SDA) *Sabourad Dextrose Agar* dan pemeriksaan uji daya hambat ekstrak daun katuk (*Sauropus androgynus* (L.) Merr.) terhadap jamur *Aspergillus flavus*. Proses ekstraksi daun katuk (*Sauropus androgynus* (L.) Merr) dan Identifikasi determinasi tumbuhan dilaksanakan pada Laboratorium Fakultas MIPA Universitas Lampung. Penelitian dilaksanakan di bulan Maret hingga sampai bulan Mei 2023.

C. Subjek Penelitian

Subjek penelitian ini merupakan daun katuk (*Sauropus androgynus* (L.) Merr.) yang digunakan dari Perkebunan di daerah Lampung Selatan dengan karakteristik daun yang diambil segar dan daun katuk yang digunakan berwarna hijau tua, tidak berwarna kekuningan dan tidak berwarna kecoklatan. Daun hijau tua mengandung alkaloid lebih tinggi dibandingkan daun hijau muda (Fakhrizal & Saputra, 2020). Daun katuk (*Sauropus androgynus* (L.) Merr.) dijadikan ekstrak lalu diencerkan berbagai konsentrasi yaitu 15%, 30%,

45%, 60%, 75% yang digunakan sebagai larutan uji terhadap menghambat pertumbuhan dari jamur *Aspergillus flavus*.

D. Variabel dan Definisi Operasional Penelitian

Tabel 3.1 Variabel dan Definisi Operasional Penelitian

No	Variabel	Definisi	Cara Ukur	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala
1	Variabel Independen: Ekstrak daun katuk (<i>Sauropus androgynus</i> (L.) Merr.)	Daun katuk (<i>Sauropus androgynus</i> (L.) Merr.) dengan karakteristik daun yang diambil segar dan daun katuk yang digunakan berwarna hijau tua diekstrak menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70% lalu diencerkan dengan konsentrasi 15%, 30%, 45%, 60%, 75%.	Ekstrak diencerkan dengan rumus $V1 \times \frac{1}{2}$ $V2 \times \frac{2}{2}$	Pipet ukur	Ekstrak daun katuk (<i>Sauropus androgynus</i> (L.) Merr.) konsentrasi 15%, 30%, 45%, 60%, 75%.	Interval
2	Variabel Dependen: Pertumbuhan jamur <i>Aspergillus flavus</i>	Pertumbuhan jamur <i>Aspergillus flavus</i> yang dihambat oleh ekstrak Daun katuk (<i>Sauropus androgynus</i> (L.) Merr.) dengan membentuk area jernih mengelilingi cakram.	Mengukur diameter zona hambat yang terbentuk dengan metode difusi Kirby Baure	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

E. Pengumpulan Data

1. Prosedur penelitian

- a. Pembuatan surat izin pada Direktur Poltekkes Tanjungkarang untuk melakukan uji determinas, pembuatan ekstrak daun katuk (*Sauropus androgynus* (L.) Merr.) pada Laboratorium Fakultas MIPA Universitas Lampung serta pembelian strain jamur dari Laboratorium Parasitologi Universitas Indonesia.

- b. Penyiapan bahan dan alat penelitian yaitu: daun katuk (*Sauropus androgynus* (L.) Merr.), media SDA (*Sabourad Dextrose Agar*), Strain Jamur *Aspergillus flavus* dan alat-alat lab yang akan digunakan, seperti disk kosong, pipet ukur dll.
 - c. Identifikasi determinasi bahan uji terhadap daun katuk (*Sauropus androgynus* (L.) Merr.) pada Laboratorium Fakultas MIPA Universitas Lampung.
 - d. Pembuatan simplisia daun katuk (*Sauropus androgynus* (L.) Merr.).
 - e. Pembuatan ekstrak daun katuk (*Sauropus androgynus* (L.) Merr.) pada Laboratorium Fakultas MIPA Universitas Lampung.
 - f. Pembuatan larutan uji melakukan pengenceran dengan konsentrasi 15%, 30%, 45%, 60%, 75% dilakukan pada Laboratorium Parasitologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Tanjungkarang.
 - g. Pembuatan suspensi jamur *Aspergillus flavus*
Jamur biakan murni diambil dengan kawat ose steril, lalu ditanamkan pada media dengan cara dipulas. Selanjutnya, diinkubasi dalam inkubator pada suhu 25°C selama 24 jam. Jamur uji yang telah diinokulasi diambil dengan kawat ose steril lalu disuspensikan kedalam tabung yang berisi 9 ml larutan NaCl 0,9% (Japar dkk, 2022).
 - h. Pembuatan Mac farland
Larutan H₂SO₄ 1 % dipipet sebanyak 9,95 mL + larutan BaCl₂.H₂O dipipet sebanyak 0,05 mL sehingga menjadi volume 10 mL, lalu dihomogenkan (Soemarno, 2000).
 - i. Pengujian ekstrak daun katuk (*Sauropus androgynus* (L.) Merr.) terhadap perkembangan jamur *Aspergillus flavus* serta pengamatan zona hambat dari masing-masing konsentrasi dengan menggunakan pengukuran jangka ukur pada satuan mm dilaksanakan pada Laboratorium Parasitologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Tanjungkarang.
2. Metode pemeriksaan
- Difusi cakram *Kirby Baure* (Japar dkk, 2022).

3. Prinsip Pemeriksaan

Cakram kertas menyerap sejumlah senyawa yang diujikan dengan menempelkan pada media agar padat sesudah diinokulasi oleh mikroba uji. Sesudah inkubasi, diameter zona hambat pada daerah zona diukur untuk diameter hambatan obat organisme lain (Jawetz *et al*, 2017).

4. Prosedur kerja

a. Persiapan alat dan bahan penelitian

1) Alat: Plate disk, gelas ukur 1000 mL, erlenmeyer 1000mL, timbangan analitik, inkubator tipe 211 DS Shaking Incubator, objekglass, deckglass, mikroskop merk Olympus, autoclaf merk Hirayama, pipet ukur 1mL dan 5mL, karet penghisap, disk blank, batang pengaduk, kertas lensa, pinset, tabung reaksi, cotton swab steril, kapas, kertas coklat, alumunium foil, hotplate merk Ika Tipe Hs-7, gelas objek, mixer vortex merk SCIOLOGEX DLAB MX-S, turbidimeter merk Lutron tu-2016, korek api, evaporator tipe RV 10 digital V, corong gelas, tabung reaksi, spirtus, ose, dan jangka sorong (Japar *et al.*, 2022).

2) Bahan: Aquadest steril, NaCl 0,9 %, kloramfenikol, ketokonazol, daun katuk (*Sauropus androgynus* (L.) Merr), media *Sabourad Dextrose Agar* (SDA), etanol 70%, dan strain jamur *Aspergillus flavus* (Japar *et al.*, 2022).

b. Identifikasi dan determinasi bahan penelitian daun katuk (*Sauropus androgynus* (L.) Merr.) oleh petugas Laboratorium Fakultas MIPA Universitas Lampung.

c. Uji fitokimia daun katuk (*Sauropus androgynus* (L.) Merr) (Tasmin dkk, 2014).

1) Senyawa saponin

0,5 mL ekstrak + 5 mL aquades, lalu dikocok pada 30 detik. Hasil pengamatan positif ditunjukkan dengan terdapat buih

2) Senyawa steroid

0,5 mL ekstrak + 0,5 mL asam asetat glacial + 0,5 mL H₂SO₄. Hasil pengamatan positif ditunjukkan dengan warna ekstrak menjadi jadi biru atau ungu.

3) Senyawa terpenoid

0,5 mL ekstrak + 0,5 mL asam asetat glacial + 0,5 mL H₂SO₄. Hasil pengamatan positif ditunjukkan dengan warna ekstrak berganti jadi merah atau kuning

4) Senyawa tanin

1 mL ekstrak + 3 tetes larutan FeCl₃ 10 %. Hasil pengamatan positif ditunjukkan dengan warna larutan hitam kebiruan

5) Senyawa alkaloid

0,5 mL ekstrak + 5 tetes kloroform + 5 tetes pereaksi Mayer (1 g KI dimasukkan pada 20 mL aquades, dimasukkan 0,271 g HgCl₂ hingga larutan). Hasil pengamatan positif ditunjukkan dengan berwarna putih kecoklatan

6) Senyawa flavonoid

0,5 mL ekstrak + 0,5 g serbuk Mg + 5 mL HCl pekat (tetes demi setetes). Hasil pengamatan positif ditunjukkan dengan warna merah/ kuning dan ada busa.

d. Uji ekstrak daun katuk (*Sauropus androgynus* (L.) Merr) pada pertumbuhan fungi *Aspergillus flavus* dilakukan prosedur kerja seperti berikut:

1) Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan untuk penelitian terlebih dahulu, setelah dibersihkan alat ditutup dengan kapas bersih lalu dibungkus dengan aluminium foil ataupun kertas kopi dengan menutupi seluruh alat-alat yang akan disterilkan. Sterilkan dengan oven pada suhu 40°C selama 50 menit, setelah selesai semua alat dikeluarkan dan ditunggu hingga mendingin (Soemarno 2000).

2) Pembuatan Larutan Kloramfenikol

Pada 1000 mL *Sabourad Dextrose Agar* (SDA) diperlukan 400 mg Antibiotik. Pada 250 mg kloramfenikol dibuat dalam 10 mL Aquadest steril, menggunakan hitungan $\frac{400 \text{ mg}}{250 \text{ mg}} \times 10 \text{ mL} = 16 \text{ mL}$. Sehingga untuk melarutkan 400 mg kloramfenikol digunakan Aquadest steril berjumlah 16 mL (Fatmawati dkk, 2023).

3) Pembuatan NaCl 0,9 %

Timbang 0,9 % gram NaCl dan dimasukkan pada 100mL aquadest steril, dilarutkan (Soemarno, 2000).

4) Pembuatan kontrol positif ketokonazol

Ditimbang 200mg ketokonazol dan dilarutkan pada 10mL Aquadest steril, dihomogenkan.

5) Pembuatan Media Agar dengan Sabourad Dextrose Agar (SDA)

Pada media dibuat dengan menimbang sebanyak 65gr Sabourad Dextrose Agar dalam 1000mL Aquadest, kemudian diaduk dan dipanaskan. Setelah larut sempurna selanjutnya media disterilkan dengan autoklaf dengan suhu 121°C pada 15 menit. Setelah itu dinginkan sampai menyentuh suhu 45-50°C lalu ditambahkan larutan kloramfenikol. Media yang telah ditambahkan larutan kloramfenikol dimasukkan pada cawan petri yang sudah disterilkan dengan ketebalan ± 4 mm selanjutnya ditunggu memadat (Sahabuddin dkk, 2020).

6) Identifikasi Jamur *Aspergillus flavus*

a) Pemeriksaan Makroskopis

Jamur *Aspergillus flavus* ditanam ke media SDA, selanjutnya diinkubasi dengan suhu 37° C selama 3x24 jam dan dilihat pertumbuhan jamur *Aspergillus flavus* yang berkembang.

Interpretasi hasil :

Hasil dari jamur makroskopis koloni terbentuk berwarna hijau kekuningan dan untuk bagian bawahnya berwarna kekuningan hingga coklat (Lindawati & Rini, 2019).

b) Pemeriksaan Mikroskopis

- 1) Dibersihkan objek glass dengan kapas yang dibasahi alkohol 70%, lalu difiksasi diatas nyala api spiritus sehingga objek glass bersih, kering dan bebas lemak atau debu (Lindawati & Rini, 2019).
- 2) Ditetesi 1-2 tetes larutan Lactophenol Cotton Blue (LPCB) ditengah objek glass. Diambil 1 koloni jamur yang tumbuh pada media SDA dengan menggunakan ose bulat dan diletakkan pada objek glass yang berisi cat Lactophenol Cotton Blue (LPCB) (Lindawati & Rini, 2019).
- 3) Ditutup dengan cover glass dan hindari jangan sampai terdapat gelombang udara (Lindawati & Rini, 2019)

- 4) Kemudian diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 10x dan memperjelas menggunakan pembesaran 40x (Lindawati & Rini, 2019).
- 5) Pengamatan mikroskopis didasarkan pada pengamatan hifa bersepta atau tidak, terdapat spora atau tidak, terdapat vesikel atau tidak, karakteristik stipa (kasar/halus) serta karakteristik kepala konidia (conidia head) (Lindawati & Rini, 2019).
- 7) Pembuatan larutan uji ekstrak daun katuk(*Sauropus androgynus* L. Merr.)
 - a) Pembuatan Simplisia

Sampel daun katuk sejumlah \pm 3 kg dikumpulkan dengan karakteristik yang masih segar, lalu dibersihkan pada air bersih lalu ditiriskan. Sampel dijemur menggunakan tutupan kain hitam terlebih dahulu dan diletakan dibawah sinar matahari dengan tidak langsung. Simplisia setelah mengering selanjutnya dihaluskan dengan alat blender kemudian disaring dan diletakan didalam wadah kering dan juga bersih (Kadir & Anggraeni, 2020).
 - b) Pembuatan ekstrak

Serbuk simplisia direndam dengan etanol 70 % selama 5 hari, kemudian disaring dan memperoleh filtrat I lalu ditampung, ampas 1 direndam kembali dengan etanol, diaduk lalu didiamkan waktu tiga hari. Sampel disaring menggunakan kertas saring dan didapatkan filtrat II. Selanjutnya hal yang serupa dilakukan sampai memperoleh filrat III. Pada filtrat maserasi digabung dan hasil saringan diupkan dipekatkan dengan menggunakan rotary evaporator dengan suhu 40-50°C sampai didapatkan ekstrak pekat. Untuk pengenceran ekstrak dilakukan menggunakan aquadest steril kosentrasi 15%, 30%, 45%, 60%, 75% dari larutan baku dengan perhitungan pengenceran (Manu, 2013).
- 8) Pemeriksaan Uji Daya Hambat
 - 1) Sediakan media uji SDA (*Sabourad Dextrose Agar*) yang telah mengeras.
 - 2) Masukkan lidi kapas steril pada suspensi jamur *Aspergillus flavus* pada tingkat kekeruhannya telah diukur dengan tingkat kekeruhannya menggunakan turbidimeter, lalu tunggu sampai suspensi menyerap pada

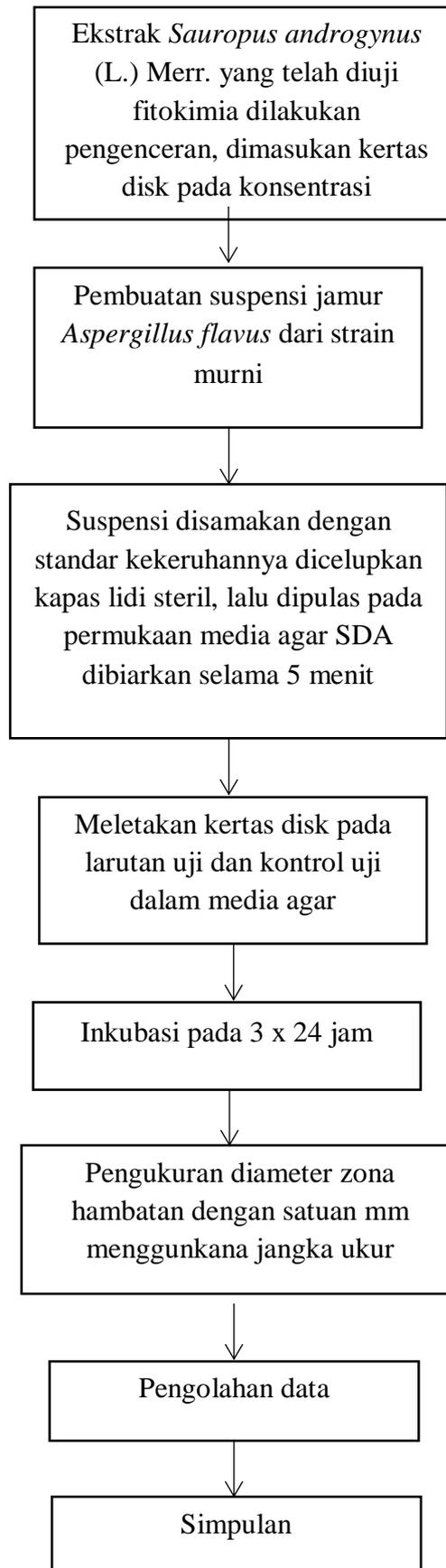
kapas, angkat kapas dan peras dengan cara ditempel pada dinding tabung lalu sedikit diputar (Marliana dkk, 2022).

- 3) Permukaan media diapus dengan Kapas lidi berisikan suspensi hingga tersebar dan tertutup merata, lalu biarkan selama 5 menit.
- 4) Kertas cakram steril dimasukkan pada disk yang berisi ekstraksi *Sauropus androgynus* (L.) Merr dengan berbagai taraf konsentrasi dan dibiarkan selama 15 menit.
- 5) Setelah itu, kertas cakram diletakkan di atas lempeng pada media agar menggunakan pinset dengan sedikit ditekan pada media dengan Jarak kertas antara satu dengan yang lainnya sebesar 2 cm .
- 6) Media agar diinkubasi selama 3x24 jam pada suhu 37°C (Japar et al., 2022).
- 7) Zona hambat pertumbuhan disekeliling kertas cakram menunjukkan uji positif dan diameter zona hambat diukur menggunakan jangka sorong sebagai diameter daya hambat ekstrak daun katuk *Sauropus androgynus* terhadap pertumbuhan jamur *Aspergillus flavus* (Japar dkk, 2022).
- 8) Interpretasi hasil pengukuran zona hambat selanjutnya diamati pada tabel 3.2 (Alfiah dkk, 2015).

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

Tabel 3.2 Interpretasi zona hambat

5. Skema Kerja Pemeriksaan



F. Pengolahan dan Analisis Data

A. Pengolahan Data

- 1) Data didapatkan melalui pengukuran diameter zona hambat dari tiap-tiap konsentrasi 15%, 30%, 45%, 60%, 75% terhadap pertumbuhan jamur *Aspergillus flavus*.
- 2) Data berasal dari pengukuran zona hambat yang didapatkan dilampiri pada bentuk tabel lalu diolah dengan Uji statistik untuk melihat perbedaan kedua variabel yang didapatkan.

B. Analisis Data

Data yang didapatkan dianalisis menggunakan cara mengamati konsentrasi yang diperoleh diameter zona hambat dengan pengulangan yaitu 5 kali. Analisis data ditujukan untuk mengamati keterhambatan perkembangan fungi pada diameter zona bening yang dihasilkan setiap konsentrasi ekstrak menggunakan metode difusi cakram Kirby Bauer disk obat. Analisis data yang dipakai yaitu Uji *One Way-Anova*, jika data tidak terdistribus normal uji statistik yang digunakan yaitu *Uji Kruskal wallis* untuk menentukan adakah perbedaan signifikan secara statistik antara dua atau lebih kelompok variabel dan untuk menentukan rata-rata perbedaan signifikan menggunakan *Mann whitney*.

G. *Ethical Clearence*

Penelitian dilaksanakan dengan berdasarkan izin etik, penelitian tidak akan memicu gangguan terhadap lingkungan, limbah yang diperoleh pada kegiatan penelitian ini disatukan lalu diolah dengan penanganan limbah. Limbah larutan uji ekstrak yang telah dilakukan pemeriksaan dibuang kedalam saluran pembuangan, pada limbah tersebut tidak mengancam lingkungan. Pada penanganan limbah media plate serta limbah suspensi jamur *Aspergillus flavus* dalam tabung dibersihkan melakukan perebusan dengan suhu 100°C waktu 30 menit, air yang telah digunakan untuk perebusan limbah media plate dan suspensi jamur diletakan kedalam saluran pembuangan, kemudian plate dan tabung setelah melakukan penelitian direbus ulang dan menambahkan sabun, selanjutnya air dari rebusan dimasukan kedalam saluran pembuangan, plate serta tabung dibersihkan menggunakan air mengalir.