

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) daun nangka (*Artocarpus heterophyllus*) pada konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, 100% 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 4 kali dan didapatkan dari hasil perhitungan dengan rumus Freederer yaitu $(t - 1)(n - 1) \geq 15$.

B. Lokasi dan waktu penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Parasitologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang dari pembuatan media SDA (*Sabourad Dextrose Agar*) dan pemeriksaan uji daya hambat ekstrak daun nangka (*Artocarpus heterophyllus*) terhadap jamur *Aspergillus flavus*. Proses ekstraksi daun nangka (*Artocarpus heterophyllus*) dan identifikasi determinasi tumbuhan dilaksanakan pada Laboratorium Fakultas MIPA Universitas Lampung. Penelitian dilaksanakan di bulan Mei sampai bulan Juni 2024.

C. Subjek Penelitian

Subjek penelitian ini merupakan daun nangka (*Artocarpus heterophyllus*) yang digunakan dari perkebunan di daerah Lampung Barat dengan karakteristik daun yang diambil pada pagi hari dalam keadaan segar dan daun yang tua berwarna hijau, tidak berwarna kekuningan dan tidak berwarna kecoklatan. Daun hijau tua mengandung flavonoid dan saponin yang lebih tinggi (Adyani,dkk2016). Daun nangka (*Artocarpus heterophyllus*) dijadikan

ekstrak lalu diencerkan berbagai konsentrasi yaitu 20%, 40%, 60%, 80%, 100% 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 nangka (<i>Artocarpus heterophyllus</i>)	Daun nangka (<i>Artocarpus heterophyllus</i>) dengan karakteristik daun yang diambil pada pagi hari dalam keadaan segar dan daun tua berwarna hijau diekstrak menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96% lalu diencerkan dengan konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, 100%	Ekstrak diencerkan dengan rumus $V_1 \times \%1 = V_2 \times \%2$	Pipet ukur	Ekstrak Daun nangka (<i>Artocarpus heterophyllus</i>) konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, 100%	Interval
2	Variabel Dependen: Pertumbuhan jamur <i>Aspergillus flavus</i> yang dihambat oleh Ekstrak Daun nangka (<i>Artocarpus heterophyllus</i>) dengan membentuk area jernih mengelilingi cakram.	Pertumbuhan jamur <i>Aspergillus flavus</i> yang dihambat oleh Ekstrak Daun nangka (<i>Artocarpus heterophyllus</i>) 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 (Alfiah dkk, 2015).	Ordinal

E. Pengumpulan Data

1. Prosedur penelitian

- a. Pembuatan surat izin pada Direktur Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang untuk melakukan uji determinasi, pembuatan ekstrak daun nangka (*Artocarpus heterophyllus*) pada Laboratorium Botani Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Lampung serta pembelian strain jamur dari Laboratorium Parasitologi Universitas Indonesia.
- b. Penyiapan bahan dan alat penelitian yaitu daun nangka (*Artocarpus heterophyllus*) 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 nangka (*Artocarpus heterophyllus*) pada Laboratorium Fakultas MIPA Universitas Lampung.
- d. Pembuatan simplisia daun nangka (*Artocarpus heterophyllus*)
- e. Pembuatan ekstrak daun nangka (*Artocarpus heterophyllus*) pada Laboratorium Fakultas MIPA Universitas Lampung.
- f. Pembuatan larutan uji melakukan pengenceran dengan konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, 100% dilakukan pada Laboratorium Parasitologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes 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 H_2SO_4 1 % dipipet sebanyak 9,95 ml + larutan $BaCl_2.H_2O$ dipipet sebanyak 0,05 ml sehingga menjadi volume 10 ml, lalu dihomogenkan (Soemarno, 2000).

i. Pengujian daun nangka (*Artocarpus heterophyllus*) 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 Kemenkes 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 1000 ml, timbangan analitik, inkubator tipe 211 DS Shaking Incubator, objek glass, deck glass, 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 nangka (*Artocarpus heterophyllus*), media *Sabourad Dextrose*

Agar (SDA), etanol 96%, dan strain jamur *Aspergillus flavus* (Japar et al., 2022).

- b. Identifikasi dan determinasi bahan penelitian daun nangka (*Artocarpus heterophyllus*) oleh petugas Laboratorium Fakultas MIPA Universitas Lampung.
- c. Uji ekstrak daun nangka (*Artocarpus heterophyllus*) 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 atau 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 aquades steril berjumlah 16 ml (Fatmawati dkk, 2023).

- 3) Pembuatan NaCl 0,9 %

Timbang 0,9 % gr NaCl dan masukan pada 100 ml aquadest steril lalu dilarutkan (Soemarno, 2000).

- 4) Pembuatan kontrol positif ketokonazol

Ditimbang 200 mg ketokonazol dan dilarutkan pada 10 ml aquadest steril, lalu dihomogenkan.

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

Pada media dibuat dengan menimbang sebanyak 35 gr Sabourad Dextrose Agar dalam 540 ml 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 3 x 24 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

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).

- 1) 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).
- 2) Ditutup dengan cover glass dan hindari jangan sampai terdapat gelembung udara (Lindawati & Rini, 2019)
- 3) Kemudian diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 10x dan memperjelas menggunakan pembesaran 40x (Lindawati & Rini, 2019).
- 4) Pengamatan mikroskopis didasarkan pada pengamatan hifa berseptata atau tidak, terdapat spora atau tidak, terdapat vesikel atau tidak, karakteristik stipa (kasar/halus) serta karakteristik kepala konidia (conidia head) (Lindawati & Rini, 2019).

5) Pembuatan larutan uji ekstrak daun nangka (*Artocarpus heterophyllus*)

c. Pembuatan Simplisia

Sampel daun nangka sejumlah ± 3 kg dikumpulkan dengan karakteristik yang tua dan masi segar, lalu dibersihkan pada air bersih dan ditiriskan. Kemudian daun dirajang dan dijemur menggunakan tutupan kain hitam terlebih dahulu dan diletakan di bawah sinar matahari dengan tidak langsung. Simplisia setelah mengering selanjutnya dihaluskan dengan alat blender kemudian disaring dan diletakan di dalam wadah kering dan juga bersih (Kadir & Anggraeni, 2020).

d. Pembuatan ekstrak

Simplisia yang sudah dihaluskan sebanyak 500 g dimasukan ke dalam wadah lalu ditambahkan etanol 96% sebanyak 2000 ml dan diaduk menggunakan batang pengaduk lalu diamkan selama 3 hari. Ekstrak disaring dengan penyaring. Di peroleh 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 filtrat III. Pada filtrat maserasi di gabung dan hasil saringan diuapkan dipekatkan dengan menggunakan rotary evaporator dengan suhu 40-50°C sampai di dapatkan ekstrak pekat. Pengenceran ekstrak dilakukan menggunakan aquadest steril kosentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, 100% dari larutan baku dengan perhitungan pengenceran (Manu, 2013).

Rumus Pengenceran : $V_1 \times \%1 = V_2 \times \%2$

Keterangan : V_1 = Volume larutan uji yang dipipet (ml)

$\%1$ = Konsentrasi larutan uji (100%)

V_2 = Volume larutan uji yang diinginkan (ml)

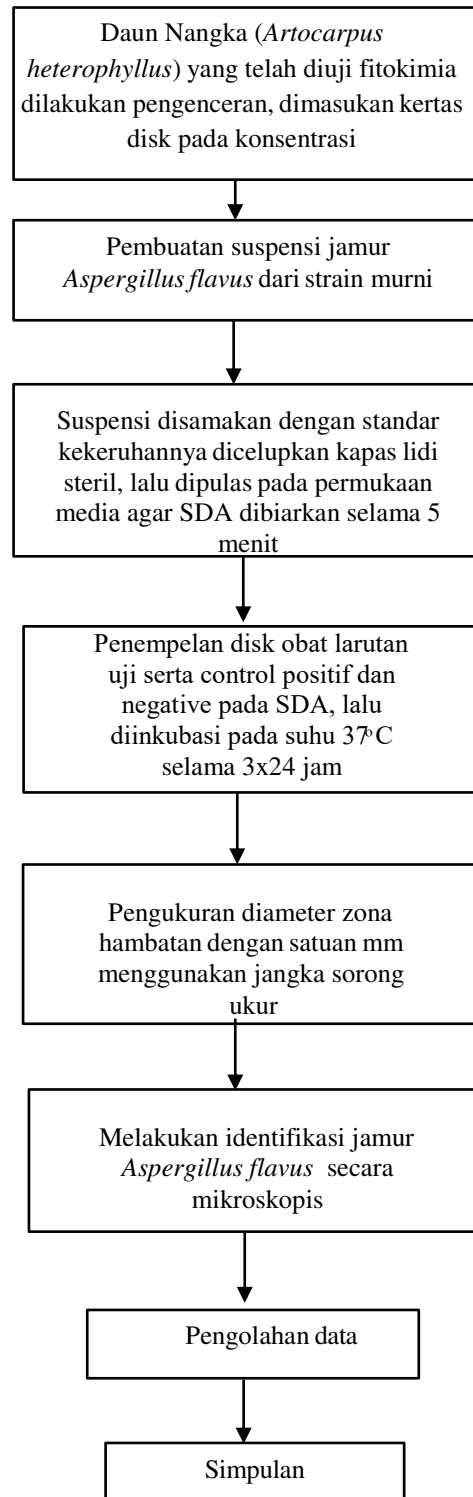
$\%2$ = Konsentrasi larutan yang akan dibuat (%)

- 7) 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 27 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 ekstrak ekstrak daun nangka (*Artocarpus heterophyllus*) 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 di sekeliling kertas cakram menunjukkan uji positif dan diameter zona hambat diukur menggunakan jangka sorong sebagai diameter daya hambat ekstrak daun nangka (*Artocarpus heterophyllus*) terhadap pertumbuhan jamur *Aspergillus flavus* (Japar dkk, 2022).
 - 8) Interpretasi hasil pengukuran zona hambat selanjutnya diamati pada tabel 3.2 (Alfiah dkk, 2015).

Tabel 3.2 Interpretasi zona hambat

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

F. Alur Penelitian



G. Pengolahan dan Analisis Data

A. Pengolahan Data

- 1) Data di dapatkan melalui pengukuran diameter zona hambat dari tiap-tiap konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, 100% 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 4 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. 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.

H. *Ethical Clearence*

Penelitian dilaksanakan dengan berdasarkan izin etik dari Komisi Etik Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang No.268/KEPK-TJK/III/2024, pada tanggal : 05 Maret 2024. Penelitian tidak akan memicu gangguan terhadap lingkungan, limbah yang diperoleh pada kegiatan penelitian ini disatukan lalu diolah dengan penanganan limbah. Limbah larutan uji ekstrak daun nangka (*Artocarpus heterophyllus*) 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 ke dalam saluran pembuangan, plate serta tabung dibersihkan menggunakan air mengalir.