

## BAB IV

### METODOLOGI PENELITIAN

#### A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian Eksperimental. Penelitian Eksperimental menurut Sugiyono (2012) merupakan metode penelitian yang digunakan untuk mencari pengaruh dari perlakuan tertentu terhadap yang lainnya dalam kondisi yang terkendalikan. Pada penelitian ini digunakan rancangan acak lengkap.

Bentuk rancangan yang digunakan dapat dilihat pada tabel berikut :

**Tabel 3**  
**Rancangan Acak Lengkap**

| Perlakuan<br>(P) | Pengulangan |     |     |
|------------------|-------------|-----|-----|
|                  | 1           | 2   | 3   |
| P0               | P01         | P02 | P03 |
| P1               | P11         | P12 | P13 |
| P2               | P21         | P22 | P23 |
| P3               | P31         | P32 | P33 |
| P4               | P41         | P42 | P43 |
| P5               | P51         | P52 | P53 |

Keterangan :

P0 : Pemberian etanol 96% sebagai kontrol negatif

P1 : Pemberian ketoconazole sebagai kontrol positif

P2 : Pemberian ekstrak etanol daun pandan wangi konsentrasi 20%

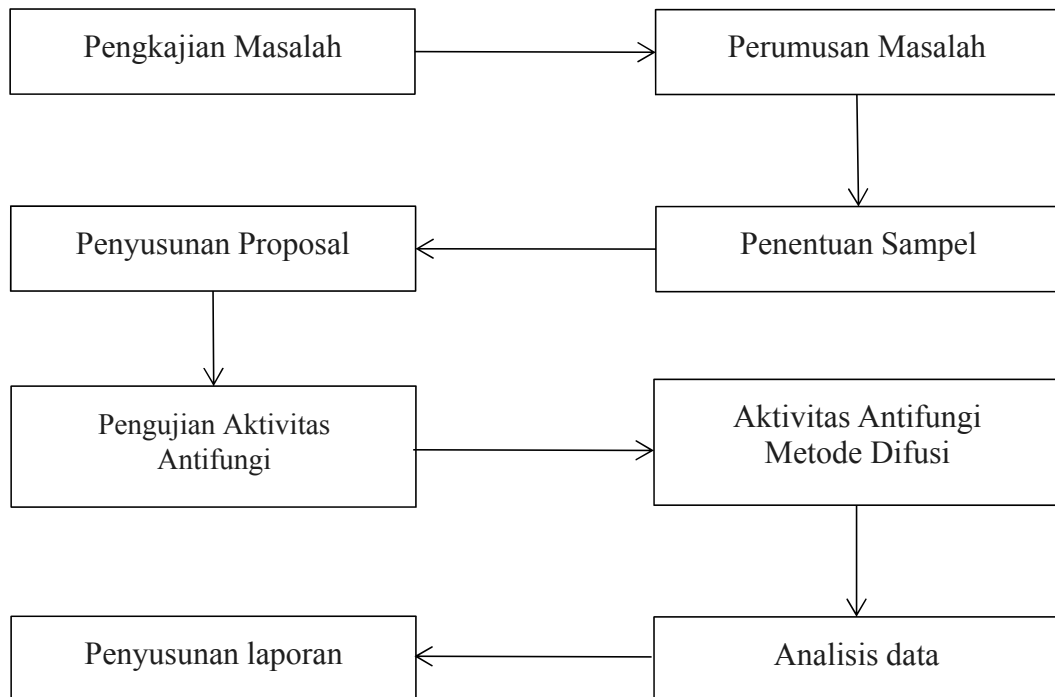
P3 : Pemberian ekstrak etanol daun pandan wangi konsentrasi 30%

P4 : Pemberian ekstrak etanol daun pandan wangi konsentrasi 40%

P5 : Pemberian ekstrak etanol daun pandan wangi konsentrasi 50%

## B. Alur Penelitian

Alur penelitian pada penelitian ini adalah dibawah ini :



Gambar 11 : Skema alur penelitian

## C. Tempat dan Waktu Penelitian

### 1. Tempat penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Terpadu Mikrobiologi dan Laboratorium Kimia Terapan Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Kemenkes Poltekkes Denpasar.

### 2. Waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari sampai Maret 2024

## D. Sampel dan Replikasi

### 1. Sampel penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak daun pandan wangi (*Pandanus ammarylifollius R.*) yang sudah melewati tahapan evaporasi

yang kemudian dibuat dengan beberapa konsentrasi yaitu 20%, 30%, 40% dan 50%. Sampel daun pandan wangi diperoleh dari Desa Banua, Kintamani dengan kriteria daun berwarna hijau tua dan daun tidak boleh rusak. Ekstrak daun pandan ini menggunakan etanol 96% yang dipekatkan dengan rotary evaporator sehingga didapatkan ekstrak kental daun pandan wangi.

## 2. Replikasi

Daun pandan wangi yang digunakan sebanyak 2 kg untuk sampel basah lalu disortasi dan dikeringkan kemudian diayak sehingga diperoleh 200 gram. Pada penelitian ini sampel yang diuji adalah ekstrak daun pandan wangi memiliki konsentrasi 20%, 30%, 40% dan 50% yang dibuat dengan cara mengencerkan ekstrak pekat daun pandan wangi menggunakan pelarut etanol 96%. Kontrol positif menggunakan *Ketoconazole* dan kontrol negatif menggunakan etanol 96%. Sehingga jumlah total perlakuan yang digunakan adalah enam perlakuan. Pada masing-masing perlakuan tersebut dilakukan pengulangan pada masing-masing variasi konsentrasi dihitung dengan rumus *federer* sebagai berikut :

$$(r - 1) (t - 1) \geq 15$$

Keterangan :

t : Perlakuan

r : Pengulangan

Dimana :

$$r - 1 (6 - 1) \geq 15$$

$$r - 1 (5) \geq 15$$

$$r - 1 \geq \frac{15}{5}$$

$$r \geq \frac{15+1}{5}$$

$$r \geq 3 \text{ (Pengulangan)}$$

Berdasarkan perhitungan diatas maka diperoleh hasil tiga kali pengulangan. Menurut hanafiyah (2016), jumlah minimal pengulangan pada pengujian di laboratorium adalah tiga kali.

### **3. Unit analisis**

Unit analisis yang digunakan dalam penelitian ini adalah zona hambat ekstrak daun pandan wangi (*Pandanus ammarylifollius R.*) dengan berbagai konsentrasi dalam menghambat pertumbuhan jamur *Aspergillus sp* pada konsentrasi 20%, 30%, 40% dan 50%.

## **E. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data**

### **1. Jenis data yang dikumpulkan**

Data yang dikumpulkan berupa data kuantitatif yaitu data primer dengan melakukan eksperimen laboratorium. Data primer didapatkan dari hasil pengukuran diameter zona hambat pada pertumbuhan jamur *Aspergillus sp* yang dihasilkan oleh ekstrak daun pandan wangi (*Pandanus ammarylifollius R.*).

### **2. Teknik pengumpulan data**

Teknik pengumpulan data pada penelitian ini adalah pengukuran dengan menggunakan alat melalui eksperimen laboratorium. Pengukuran dilakukan pada diameter zona hambat yang terbentuk pada pertumbuhan jamur *Aspergillus sp*.

## **F. Alat, Bahan dan Prosedur Kerja**

### **1. Alat**

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah tabung vial (4 buah), erlenmeyer iwaku 1000 ml (1 buah), tabung reaksi (4 buah), gelas ukur 250 ml (1 buah), corong kaca (1 buah), pisau (1 buah),blender (1 buah), ose bulat (1 buah), mikropipet 20µl- 1000µl, pinset (1 buah), beaker glass 500 ml (1 buah), api bunsen (1 buah), rak tabung reaksi (1 buah), spatula (1 buah), batang pendeduk (1

buah), cawan petri (petridisk) (10 buah), jangka sorong (1 buah), mc farland densitometer biosan (1 buah), neraca analitik (1 buah), inkubator escos (1 buah), autoclave (1 buah), oven (1 buah), biosafety cabinet (1 buah), evaporator (1buah),

## **2. Bahan**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak daun pandan wangi, aquadest, etanol 96%, jamur *Aspergillus sp*, media Potato Dextrose Agar (PDA), *Potato Dextrose Broth* (PDB), Ketoconazole, NaCl 0,9%, Standar 0,5 % Mc Farland, catton swab, yellow tip, bluetip, kapas, kertas saring, aluminium foil, kertas cakram kosong.

## **3. Prosedur kerja**

Menurut Salahudin & Cahyanto (2020) prosedur pembuatan ekstrak adalah sebagai berikut :

- a. Pembuatan ekstrak daun pandan wangi (*pandanus ammarylifoliius roxb*)
  - 1) Mengambil daun pandan wangi (*pandanus ammarylifollius roxb*) sebanyak 2 kg dan dicuci dan dibersihkan dari kotoran dengan air mengalir.
  - 2) Menghilangkan sisa-sisa air dari daun pandan wangi setelah pencucian dengan proses penirisan.
  - 3) Melakukan penimbangan awal untuk mengetahui massa awal bahan sampel.
  - 4) Mengeringkan bahan sampel dengan cara dioven selama 3 hari.
  - 5) Menimbang 200 gr daun pandan wangi yang sudah dikeringkan.
  - 6) Melakukan proses sortasi pada daun pandan wangi yang sudah dikeringkan sebelum daun dihaluskan untuk memperkecil ukuran butiran bahan kering dengan menggunakan blender.
  - 7) Menghaluskan bahan kering daun pandan wangi kemudian diayak untuk mendapatkan serbuk simplisia yang memiliki ukuran seragam.

- 8) Menimbang sebanyak 200 g serbuk simplisia daun pandan wangi yang bebas dari kotoran kemudian dimasukan kedalam satu botol 1,5 L dan ditambahkan pelarut etanol 96% hingga semua serbuk simplisia terendam sempurna dengan pelarut.
  - 9) Melakukan proses perendaman selama 2 hari dengan melakukan pengadukan sebanyak 4 kali dalam sehari.
  - 10) Menyaring sampel dengan kertas saring, kemudia filtrat ditampung dan dilakukan proses pemekatan menggunakan evaporator pada suhu 70°C hingga didapatkan ekstrak pekat.
- b. Pembuatan konsentrasi ekstrak daun pandan wangi (Haryanti, dkk, 2020).
- 1) Konsentrasi 20%, 30%, 40% dan 50% masing-masing konsentrasi dibuat dengan cara penimbangan ekstrak pekat daun pandan wangi dengan pelarut 96%.
  - 2) Membuat seri konsentrasi ekstrak daun pandan wangi dibuat dengan menimbang stok sampel (ekstrak pekat) sesuai dengan perhitungan menggunakan presentasi perbandingan konsentrasi % (b/v) yang ditentukan melalui rumus berikut :

$$\% = b/v \times 100$$

Keterangan :

% : Variasi konsentrasi (%) ekstrak daun pandan wangi

b : Massa ekstrak daun pandan wangi pekat 100%

v : Volume pelarut

Massa ekstrak daun pandan wangi dan massa pelarut yang akan digunakan dalam pembuatan konsentrasi 20%, 30%, 40% dan 50% disajikan

dalam tabel berikut :

**Tabel 4**  
**Variasi Konsentrasi Ekstrak Daun Pandan Wangi**

| <b>Konsentrasi</b> | <b>Ekstrak Daun Pandan</b> | <b>Etanol 96%</b> |
|--------------------|----------------------------|-------------------|
| <b>(%)</b>         | <b>Wangi (gram)</b>        | <b>(ml)</b>       |
| 20%                | 0,2                        | 1                 |
| 30%                | 0,3                        | 1                 |
| 40%                | 0,4                        | 1                 |
| 50%                | 0,5                        | 1                 |

- 3) Melakukan pencampuran pada masing-masing konsentrasi dihomogenkan.
- c. Uji Kualitatif Fitokimia
  - 1) Uji Alkaloid
    - a) Dipipet 3 ml sampel ekstrak bahan alam
    - b) Ditambahkan beberapa tetes asam sulfat 2N atau asam klorida 2N
    - c) Bagi larutan menjadi 2 bagian
    - d) Tambahkan pada 1 bagian dengan 1-2 tetes reagen Mayer dan Wagner
    - e) Tambahkan 1-2 tetes reagen dragendrof ke dalam bagian yang lain
    - f) Amati perubahan yang terjadi
    - g) Hasil positif bila terbentuk endapan merah-jingga dengan reagen dragendrof dan terbentuk endapan putih kekuningan dengan reagen Mayer dan Wagner
  - 2) Uji Saponin
    - a) Dipipet 1 ml sampel ekstrak bahan alam
    - b) Ditambahkan 10 ml air panas
    - c) Kocok kuat-kuat sampuran selama 10 detik
    - d) Amati busa yang terbentuk selama 5 menit
    - e) Tambahkan 1 tetes HCL 2 N

- f) Amati perubahan yang terjadi
- g) Jika hasil positif maka akan terbentuk warna hijau atau hijau biru
- 3) Uji Flafoniod
  - a) Dipipet 1 ml sampel ekstrak bahan alam
  - b) Tambahkan 0,1 mg serbuk Mg
  - c) Tambahkan 0,4 ml amil alkohol
  - d) Tambahkan 4 ml etanol kemudian kocok campuran
  - e) Amati perubahan yang terjadi
  - f) Hasil positif jika terbentuk warna merah, kuning atau jingga
- 4) Uji Tanin
  - a) Dipipet 3 ml sampel ekstrak bahan alam
  - b) Tambahkan 3 tetes larutan  $\text{FeCl}_3$
  - c) Amati perubahan warna yang terjadi
  - d) Hasil positif apabila terbentuk warna biru tua atau hitam kehijauan
- d. Pembuatan media PDA
  - 1) Sebanyak 9,75 gr serbuk media PDA dimasukan ke dalam erlenmayer dan dilarutkan dengan 250 ml aquades
  - 2) Kemudian memanaskan campuran media PDA dengan aquades sampai larut
  - 3) Setelah homogen dibiarkan hingga suhu larutan media menurun hingga 36-37°C, cek pH media diukur hingga didapatkan pH (4,5-5,5) jika pH kurang asam ditambahkan asam tartar 10% kedalam media
  - 4) Menutup erlenmayer dengan kapas, kasa da kertas kemudian disterilkan didalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 2 atm
  - 5) Larutan media ditambahkan kloramfenikol 20mL secara aseptis di dalam laminar air flow



- 6) Kemudian media dituangkan ke dalam cawan petri dan dibiarkan hingga memadat. (Azzahra dkk, 2020)
- e. Penanaman biakan murni
- 1) Jamur *Aspergillus sp* diinokulasikan kembali menggunakan metode gores cawan (*streak plate*) pada media PDA dengan cara memasukan ose yang sudah disterilisasi kedalam isolat jamur.
  - 2) Goreskan ose sebanyak 3-4 kali secara *streak plate* atau gores cawan
  - 3) Sampel diinkubasi selama 3 hari di inkubator dengan suhu kamar (37°C)
  - 4) Penanaman biakan jamur pada media cair
  - 5) Jamur *Aspergillus sp* diinokulasikan kedalam media cair dengan mengambil spora/ bagian jamur di media padat menggunakan ose lalu di celupkan ke flacon yang berisi *Potato Dextrose Broth* (PDB)
- f. Pembuatan suspensi jamur *Aspergillus sp*
- 1) Mengambil jamur *Aspergillus sp* dari stok kultur dengan menggunakan jarum ose yang sudah disterilkan terlebih dahulu dengan api bunsen
  - 2) Disuspensikan kedalam tabung reaksi 5 ml NaCl 0,9%
  - 3) Homogenkan hingga terbentuk kekeruhan yang setara dengan 0,5% standar Mc Farland
- g. Tahap pemeriksaan Uji Daya Hambat
- 1) Koloni jamur *Aspergillus sp* dari biakan murni diambil beberapa goresan dengan menggunakan ose dan disuspensikan ke dalam tabung reaksi yang berisi larutan NaCl 0,9% steril sampai diperoleh konsentrasi 0,5 MC *Farldan*.
  - 2) Kekeruhan suspensi jamur dibaca dengan menggunakan MC *Farldan* densitometer 0,5 MC *Farldan* setara dengan  $1,5 \times 10^8$  (Colony Forming Unit) CFU/ml

- 3) Diambil media agar yang sudah mengeras, kemudian diinokulasikan suspensi jamur *Aspergillus sp* sebanyak 0,5 ml diatas permukaan media lalu digoreskan keatas media PDA padat yang sudah disterilkan dengan api bunsen
- 4) Cakram kosong direndam selama 15 menit dengan larutan yang berisi kontrol negatif dan positif, serta ekstrak dengan masing-masing konsentrasi yang dicelupkan kedalam ekstrak etanol daun pandan wangi selama  $\pm 15$  detik.
- 5) Media dibagi menjadi tiga daerah untuk kontrol negatif (P0<sub>1</sub>, P0<sub>2</sub>, P0<sub>3</sub>) dimana P0 diletakan cakram yang berisi etanol 96% sebagai kontrol negatif, (P1<sub>1</sub>, P1<sub>2</sub>, P1<sub>3</sub>) diletakan cakram yang berisi ketoconazole sebagai kontrol positif. Pada cawan media lainnya dibagi menjadi empat daerah P2 diletakan cakram yang berisi ekstrak dengan konsenrasi 20%, P3 diletakan cakram yang berisi ekstrak dengan konsentrasi 30%, P4 diletakan cakram yang berisi ekstrak dengan konsentrasi 40%, dan P5 diletakan cakram yang berisi ekstrak dengan konsentrasi 50%.
- 6) Selanjutnya semua cawan petri di inkubasi pada suhu 37°C selama 2 x 24 jam dengan posisi cawan petri terbalik.
- 7) Setelah dua hari amati pertumbuhan jamur dan diukur zona hambat pada setiap perlakuan.

h. Pelaporan hasil

## **G. Pengolahan dan Analisis Data**

### **1. Teknik pengolahan data**

Data yang diperoleh adalah hasil pengukuran diameter zona hambat ekstrak etanol daun pandan wangi (*pandanus ammarylifollius R.*) terhadap pertumbuhan jamur *Aspergillus sp* sebagai salah satu jamur kontaminan menggunakan media PDA.

## 2. Analisis data

Data yang diperoleh akan dianalisis secara statistik menggunakan SPSS meliputi

### a. Uji Kolmogorof-Smirnov (KS)

Pengujian ini dilakukan untuk mengetahui normalitas data.

### b. Uji One Way *Anova*

Jika pada uji KS data berdistribusi normal maka dilanjutkan dengan uji *Anova* untuk mengetahui ada dan tidaknya perbedaan rata-rata zona hambat pertumbuhan *Aspergillus sp.*

### c. Uji *Kruskall Wallis*

Jika pada uji KS data berdistribusi tidak normal maka dilanjutkan dengan uji *Kruskall Wallis* untuk mengetahui ada dan tidaknya perbedaan rata-rata zona hambat pertumbuhan *Aspergillus sp.*

### d. Uji *Turkey HSD*.

Uji ini dilakukan untuk membandingkan rerata untuk mengetahui rerata manakah yang berbeda pada data.

## H. Etika Penelitian

Penerapan etika penelitian kesehatan dilakukan yakni ( Sugiyono dan Puspandini, 2020) :

### 1. Prinsip berbuat baik (*beneficence*) dan tidak merugikan

Dalam penelitian ini prinsip etika yang diterapkan adalah *beneficence*, yaitu prinsip kebijakan, mendatangkan manfaat dan meminimalkan kerugian bagi orang lain. Serta prinsip *Non maleficence*, yaitu dimaksudkan untuk memastikan bahwa subjek penelitian tidak dianggap merugikan dan memberikan perlindungan terhadap penyalahgunaan.

## 2. Prinsip keadilan (*justice*)

Prinsip etika ini mengandung arti bahwa hak subjek untuk memperoleh yang adil dan hak sama sebelum, selama dan setelah partisipasi dalam penelitian.