

## **BAB III**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **1.1 Rancangan Penelitian**

Metode penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah penelitian yang bersifat deskriptif yang bertujuan untuk mengetahui aktivitas antifungi perasan daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.) terhadap pertumbuhan *Candida albicans*.

Penelitian ini dilakukan dengan beberapa tahap yaitu tahap persiapan, tahap pelaksanaan, dan tahap terakhir. Tahap persiapan merupakan tahap awal penelitian yaitu persiapan sampel daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.), determinasi, persiapan alat dan bahan. Tahap kedua merupakan tahap pelaksanaan dalam penelitian yaitu pembuatan sampel perasan, uji identifikasi fitokimia, pembuatan kontrol negatif, pembuatan suspensi fungi, sterilisasi alat dan bahan, persiapan peremajaan *Candida albicans* pada media SDA dan pengujian aktivitas antifungi perasan daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.) menggunakan metode difusi sumuran. Tahap akhir dalam penelitian ini adalah analisis data.

#### **1.2 Populasi dan Sampel Penelitian**

##### **1.2.1 Populasi**

Populasi dalam penelitian ini adalah perasan daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.).

### 1.2.2 Sampel

Sampel merupakan bagian dari populasi yang akan diteliti. Sampel yang digunakan yaitu sebagian dari perasan daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.).

## 1.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

### 1.3.1 Lokasi

Lokasi penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakognosi dan Mikrobiologi Akademi Farmasi Putra Indonesia Malang.

### 1.3.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan dari pembuatan proposal mulai bulan November-Juli 2019.

## 1.4 Definisi Operasional Variabel

Definisi operasional dalam penelitian ini terdiri dari variabel bebas dan variabel terikat. Variabel bebas pada penelitian ini perasan daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.). Sedangkan variabel terikat dalam penelitian ini adalah aktivitas antifungi perasan daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.) terhadap *Candida albicans*.

**Tabel 3.1 Definisi Operasional Variabel**

Variabel	Definisi variabel	Alat ukur	Hasil ukur	Skala ukur
Bebas: perasan daun pandan wangi ( <i>Pandanus amaryllifolius</i> Roxb.)	Cairan yang diperoleh dari perasan daun pandan wangi yang dihaluskan dengan cara menumbuk dan menambahkan air sebanyak 30 mL.	Gelas Ukur	mL	Nominal
Terikat: Aktivitas antifungi perasan daun pandan wangi ( <i>Pandanus amaryllifolius</i> Roxb.) terhadap <i>Candida albicans</i> .	Adanya aktivitas antifungi perasan daun pandan wangi terhadap pertumbuhan <i>Candida albicans</i> .	Jangka sorong	mm	Nominal

## 1.5 Instrumen Penelitian

### 1.5.1 Alat

Dalam penelitian ini alat yang digunakan meliputi: pisau, blender, mortir dan stamper, *beaker glass*, batang pengaduk, gelas ukur, kaki tiga, kawat kassa, lampu spiritus, erlenmeyer, tabung reaksi, rak tabung reaksi, pipet volume, bola hisap, labu ukur, *aluminium foil*, jarum ose, cawan petri, mikro pipet, bluetip, LAF (*Laminar Air Flow*), inkubator, autoklaf, kapas, penggaris/jangka sorong, kertas coklat, spidol.

### 1.5.2 Bahan

Dalam penelitian ini bahan yang digunakan meliputi: daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.), *Candida albicans*, *Saboroud Dextrose Agar*, larutan NaCl 0,9%, Mg, HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, FeCl<sub>3</sub>, aquadest.

## 1.6 Pengumpulan Data

### 1.6.1 Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman Pandan Wangi (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.) dilakukan oleh UPT Materia Medika Batu.

### 1.6.2 Pengambilan Sampel Daun Pandan Wangi

1. Diambil 2 lembar daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.) (setara dengan 13 g) yang diambil urutan ke 10-15 dari atas.
2. Dibersihkan dengan cara dicuci dengan air mengalir.

### 1.6.3 Pembuatan Perasan

1. Diambil 2 lembar daun pandan wangi dan dipotong potong kecil-kecil 1 mm dan disiapkan air 30 mL.
2. Ditumbuk daun pandan wangi menggunakan lumpang dan alu.
3. Diperas dan disaring dengan kertas saring dan *syringe filter*.

### 3.6.4 Uji Identifikasi

#### 3.6.4.1 Uji Flavonoid

1. Diambil sebanyak 5 mL perasan daun pandan wangi segar.
2. Ditambahkan dengan 100 mL air panas, dididihkan selama 5 menit, kemudian disaring.
3. Diambil filtrat sebanyak 5 mL ditambahkan 0,05 g serbuk Mg dan 1 mL HCl pekat, kemudian dikocok kuat-kuat. Uji positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah, kuning, atau jingga. (Harborne, 1987)

#### 3.6.4.2 Uji Saponin

1. Diambil sebanyak 5 mL perasan daun pandan segar.
2. Ditambahkan dengan 10 mL air sambil dikocok selama 1 menit lalu.

3. Ditambahkan 2 tetes HCl 1 N. Bila busa yang terbentuk tetap stabil selama kurang lebih 7 menit, maka ekstrak positif mengandung saponin. (Harborne, 1987)

#### 3.6.4.3 Uji Tanin

1. Diambil sebanyak 5 mL perasan daun pandan segar.
2. Ditambahkan dengan 10 tetes  $\text{FeCl}_3$  10%. Uji positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna hijau kehitaman atau biru kehitaman. (Harborne, 1987)

#### 3.6.4.4 Uji Alkaloid

1. Diambil sebanyak 5 mL perasan daun pandan segar pada tabung reaksi.
2. Ditambahkan 2 mL kloroform dan 2 mL amonia kemudian disaring.
3. Filtrat yang didapat kemudian ditambahkan 3-5 tetes  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat lalu dikocok hingga terbentuk dua lapisan.
4. Lapisan atas dipindahkan ke dalam tiga tabung reaksi masing-masing 2,5 mL.
5. Ditambahkan pereaksi Mayer pada tabung 1 sebanyak 4-5 tetes.
6. Ditambahkan pereaksi Dragendorff pada tabung 2 sebanyak 4-5 tetes.
7. Diambahkan peraksi wagner pada tabung 3 sebanyak 4-5 tetes.
8. Terbentuknya endapan menunjukkan bahwa sampel tersebut mengandung alkaloid. Reaksi dengan pereaksi Mayer akan terbentuk endapan putih, dengan pereaksi Dragendorff terbentuk endapan merah jingga dan dengan pereaksi wagner terbentuk endapan coklat. (Harborne, 1987)

### 3.6.5 Sterilisasi Alat dan Bahan

1. Disiapkan terlebih dahulu alat dan bahan yang akan digunakan seperti cawan petri, tabung reaksi, erlenmeyer, beaker glass, bluetip.
2. Disiapkan 20 bluetip dimasukkan kedalam beaker glass 100 mL, 1 beakerglass, 1 erlenmeyer, 1 corong, kertas saring dan dibungkus dengan kertas coklat.
3. Semua alat dan bahan disterilkan dalam autoklaf dengan suhu 121<sup>0</sup>C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm. (Wijayanti dan Rahayu, 2018)

### 3.6.6 Pembuatan Media Miring

1. Ditimbang *Saboroud Dextrose Agar* (Dextrose, pepton, dan agar) 5,2 g dan dilarutkan dengan 80 mL aquadest kedalam erlenmeyer dipanaskan sampai mendidih.
2. Media kemudian ditutup dengan kapas dan kertas coklat lalu disterilkan dalam autoklaf dengan tekanan 1 atm pada temperatur 121<sup>0</sup>C selama 15 menit.
3. Setelah disterilisasi media dituangkan ke 10 tabung reaksi dan dimiringkan sampai memadat (untuk media pertumbuhan *Candida albicans*). (Khotimah S. , 2018)

### 3.6.7 Pembuatan Media Uji

1. Ditimbang *Saboroud Dextrose Agar* 3,775 g dan dilarutkan dengan 55 mL aquadest kedalam erlenmeyer dipanaskan sampai mendidih.
2. Media kemudian ditutup dengan kapas dan kertas coklat lalu disterilkan dalam autoklaf dengan tekanan 1 atm pada temperatur 121<sup>0</sup>C selama 15 menit. (Khotimah S. , 2018)

### 3.6.8 Uji Identifikasi *Candida albicans*.

1. Dibersihkan gelas obyek menggunakan alkohol 70%, kemudian ditetesi dengan larutan *Methylen Blue* (MB).
2. Diambil sedikit biakan *Candida albicans* dan diletakkan diatas gelas obyek yang telah ada MB nya.
3. Ditutup dengan cover glass kemudian diamati dengan mikroskop. (Khotimah, 2018). Morfologi mikroskopis *Candida albicans* memperlihatkan seperti sekumpulan jamur bentuk blastospora, hifa atau *pseudohyphae* atau campuran keduanya (Mutiawati, 2016).

### 3.6.9 Peremajaan *Candida albicans*

1. Disiapkan media miring SDA yang telah dibuat.
2. Diambil koloni jamur dari biakan murni yang tersedia, dilakukan secara aseptis dengan jarum ose.
3. Digoreskan pada media agar miring lalu diinkubasi pada suhu 37<sup>0</sup>C selama 24 jam. (Wijayanti dan Rahayu, 2018).
4. Fungi *Candida albicans* pada media SDA tampak seperti krim putih dan licin disertai bau khas seperti ragi.

### 3.6.10 Pembuatan Suspensi *Candida albicans*

1. Diambil dengan jarum ose fungi *Candida albicans* dari kultur persediaan yang diinokulasikan pada media agar miring.
2. Dimasukan ke dalam enlemayer yang berisi larutan NaCl 0,9%.
3. Kemudian dicampur hingga homogen dan ditandai dengan cairan berubah menjadi keruh.

4. Kekeruhan dari suspensi diukur dengan spektrofotometri UV-Vis sesuai dengan panjang gelombang 530 nm hingga diperoleh %T 90. (Wijayanti dan Rahayu, 2018).

### 3.6.11 Pembuatan Kontrol

#### 1.6.11.1 Kontrol Media

1. Disiapkan alat dan bahan.
2. Dimasukkan media SDA sebanyak 15 mL dan dibiarkan hingga memadat.
3. Dibungkus dengan kertas coklat dan diinkubasi pada suhu 37<sup>0</sup>C selama 24 jam (Wijayanti dan Rahayu, 2018).

#### 1.6.11.2 Kontrol negatif

1. Disiapkan alat dan bahan.
2. Disiapkan aquadest sebagai kontrol negatif
3. Dimasukkan suspensi fungi kedalam cawan petri.
4. Ditambahkan media SDA sebanyak 15mL dan dibiarkan hingga memadat.
5. Dibuat lubang sumuran pada media yang telah memadat dengan bor steril, kemudian diisi aquadest sebanyak 20  $\mu$ L dilakukan didalam LAF.
6. Diinkubasi pada suhu 37<sup>0</sup>C selama 24 jam. (Wijayanti & Rahayu, 2018)

#### 1.6.12 Pengujian Antifungi

1. Disiapkan alat dan bahan.
2. Dimasukkan suspensi mikroba 1 mL kedalam cawan petri.
3. Kemudian ditambahkan media SDA sebanyak 15 mL, digoyang-goyangkan sesuai angka delapan dan biarkan memadat.



4. Dibuat sumuran pada 3 cawan petri dengan menggunakan bor (pelubang) steril, lalu diisi perasan daun pandan wangi sebanyak 20  $\mu$ L dilakukan didalam LAF (*Laminar Air Flow*).
5. Diinkubasi pada suhu 37<sup>0</sup>C selama 24 jam.
6. Dihitung zona bening atau zona hambat. (Wijayanti dan Rahayu, 2018)

### **3.7 Analisa Data**

Dalam penelitian ini menggunakan analisis deskriptif untuk mendeskripsikan ada atau tidaknya pengaruh perasan daun pandan wangi dalam menghambat pertumbuhan *Candida albicans*.