

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Metode penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah penelitian yang bersifat deskriptif yang bertujuan untuk mengetahui aktivitas antifungi seduhan daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius Roxb.*) terhadap pertumbuhan fungi *Candida albicans* berdasarkan variasi waktu penyeduhan. 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 seduhan dengan variasi waktu 15menit, 30menit dan 45menit dengan 2x replikasi, uji identifikas fitokimia, pembuatan kontrol negatif (aquades), pembuatan kontrol media, pembuatan suspensi bakteri, sterilisasi alat dan bahan, peremajaan fungi *Candida albicans* yang ditumbuhkan dan diremajakan dimedia SDA. Tahap akhir dalam penelitian ini adalah pengujian aktivitas antifungi ekstrak seduhan daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius Roxb.*) menggunakan metode sumuran.

3.2 Populasi Dan Sampel Penelitian

3.2.1 Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah seduhan daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.)

3.2.2 Sampel

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

3.3 Lokasi dan waktu penelitian

3.3.1 Lokasi

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

3.3.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan dalam kurun waktu dari bulan Februari-Juni 2019.

3.4 Definisi Operasional Variabel

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

Tabel 3. 1 Definisi Operasonal Variabel

Variabel	Definisi variabel	Alat ukur	Hasil ukur	Skala ukur
Bebas: seduhan daun panan wangi dengan variasi lama penyeduhan 15menit, 30menit da 45menit.	Cairan yang diperoleh dengan menyeduh daun pandan wangimenggunakan air mendidih suhu 92°C sebanyak 200 ml selama 15menit, 30menit da 45menit.	Gelas Ukur	mL	Nominal
Terikat : Aktivitas antifungi seduhan daun pandan wangi terhadap pertumbuhan <i>Candida albicans</i>	Zona bening yang terbentuk disekitar sumuran yang telah diberi seduhan dengan variasi lama penyeduhan 15menit, 30menit da 45menit.	Jangka sorong, penggaris	Adanya zona bening yang terbentuk di sekitar sumuran pada media uji	Nominal

3.5 Instrumen Penelitian

3.5.1 Alat

Alat-alat yang akan digunakan pada penelitian ini adalah alat-alat untuk proses dentifikasi metabolit sekunder tabung rekasi, rak tabung, beker glass, gelas ukur, labu takar, batang pengaduk, pipet tetes, erlenmeyer. Alat-alat untuk uji aktivitas antijamur: LAF (Laminar Air Flow), cawan petri, gelas ukur, erlenmeyer, kawat ose, kapas, karet gelang, autoklaf, bor steril (pelubang sumuran), penggaris, jangka sorong, thermometer, bluetip, micropiet, inkubator, aluminium foil, bunsen, spirtus, korek api, kuvet dan spektrofotometer uv-vis.

3.5.2 Bahan

Bahan-bahan yang akan digunakan pada penelitian ini antara lain: daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius* Roxb) yang diambil di Malang, biakan jamur *Candida albican* (diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya), etanol, SDA, (Saboraud Dextrose Agar), H₂SO₄, NaCl 0,9%, aquades, HCl, serbuk Mg, FeCl₃, kloroform, larutan wagner, dragendroff dan meyer.

3.6 Pengumpulan Data

3.6.1 Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.) dilakukan oleh Materia Medica Batu.

3.6.2 Pengambilan Sampel Daun Pandan Wangi (Dari masyarakat Tulungagung)

1. Diambil 2 lembar daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.) daun yang diambil adalah daun ke 10 sampai ke 15 dari ujung.
2. Dibersihkan dari kotoran-kotoran yang melekat pada daun pandan wangi dengan air mengalir yang bersih.
3. Selanjutnya setelah daun benar-benar bersih dilakukan penirisan.

3.6.3 Pembuatan Seduhan

3.6.3.1 Penyeduhan dengan waktu 15 menit

1. Diambil 2 lembar daun pandan wangi dan dipotong ±2mm.
2. Lalu diseduh dengan air mendidih dengan suhu 92°C sebanyak 200 mL.
3. Ditutup menggunakan alumunium foil lalu dibiarkan sampai dengan 15 menit.

3.6.3.2 Penyeduhan dengan waktu 30 menit

1. Diambil 2 lembar daun pandan wangi dan dipotong ± 2 mm.
2. Lalu diseduh dengan air mendidih dengan suhu 92°C sebanyak 200 mL.
3. Ditutup menggunakan alumunium foil lalu dibiarkan sampai dengan 30 menit.

3.6.3.3 Penyeduhan dengan waktu 45 menit.

3.4.1.1 Diambil 2 lembar daun pandan wangi dan dipotong ± 2 mm.

3.4.1.2 Lalu diseduh dengan air mendidih dengan suhu 92°C sebanyak 200 mL.

3.4.1.3 Ditutup menggunakan alumunium foil lalu dibiarkan sampai dengan 45 menit.

3.6.4 Skrining Fitokimia

3.6.4.1 Uji Flavonoid (Sahputra, 2008)

1. Disiapkan alat dan bahan.
2. Diambil 5 ml seduhan daun pandan.
3. Ditambahkan 5ml etanol kemudian dikocok, dipanaskan dan dikocok kembali sampai homogen.
4. Disaring campuran dan diambil fitratnya.
5. Ditambahkan 0,2 gram serbuk Mg dan 3 tetes HCl pada hasil fitrat. Terbentuknya warna merah pada lapisan etanol menunjukkan adanya senyawa flavonoid.

3.6.4.2 Uji Saponin (Sari, 2011)

1. Disiapkan alat dan bahan.
2. Diambil 5ml seduhan daun pandan wangi.
3. Ditambahkan aquades 10 mL dan dikocok kuat-kuat selama 30 menit sampai muncul busa.

4. Tabung reaksi diletakkan dalam posisi tegak selama 30 menit. Apabila masih terdapat busa, maka mengandung saponin.
5. Uji penegasan ditetaskan larutan asam klorida sebanyak 3 tetes, bila busa stabil maka dipastikan terdapat saponin.

3.6.4.3 Uji Tanin (Sahputra, 2008)

1. Disiapkan alat dan bahan
2. Diambil 5ml seduhan daun pandan
3. Ditambahkan dengan 5 ml aquades kemudian didihkan selama 5 menit.
4. Disaring campuran sehingga diperoleh filtrat.
5. Ditambahkan dengan 5 tetes FeCl_3 1% pada hasil penyaringan (filtrat). Diamati perubahan warna yang terjadi. Terbentuknya warna biru tua atau hijau kehitaman menunjukkan adanya tanin.

3.6.4.4 Uji Alkaloid (Sahputra, 2008)

1. Disiapkan alat dan bahan
2. Diambil sebanyak 5ml seduhan daun pandan wangi.
3. Ditambahkan dengan 5 ml kloroform dan 3 tetes amonia.
4. Kemudian fraksi kloroform dipisah dan diasamkan dengan 10 tetes H_2SO_4 2M. Lapisan asam dipisah kedalam 3 bagian dan disebut sebagai bagian A, B dan C.
5. Ditambahkan pereaksi Meyer pada lapisan A
6. Ditambahkan pereaksi dragendorf pada lapisan B
7. Ditambahkan pereaksi wagner pada lapisan C. Diamati timbulnya endapan oleh masing-masing pereaksi. Terdapatnya alkaloid ditandai dengan terbentuknya

endapan putih oleh pereaksi Meyer, endapan merah oleh pereaksi Dragendorf dan endapan coklat oleh pereaksi Wagner.

3.6.5 Sterilisasi Alat dan Bahan

3.6.5.1 Sterilisasi kering

Sterilisasi alat seperti pinset, jarum ose, ujung pipet, bibir tabung elemeyer, cawan petri dan tabung reaksi menggunakan bunsen sedangkan alat seperti cawan petri, elemeyer menggunakan suhu 170°C selama 1,5-2jam (Wijayanti dan Rahayu, 2018).

3.6.5.2 Sterilisasi basah

Sterilisasi basah yaitu aquadest, larutan NaCl, bluetip menggunakan uap air panas, penggunaan uap air panas bertekanan 1 atm dengan suhu 121°C selama 15 menit (Wijayanti dan Rahayu, 2018).

3.6.6 Pembuatan Media

3.6.6.1 Pembuatan Media SDA (*Saboround Dextrose Agar*) (Wijayanti dan Rahayu, 2018).

1. Ditimbang SDA (*Saboround Dextrose Agar*) 28 gram.
2. Dilarutkan ke dalam 430 mL aquades.
3. Dipanaskan diatas bunsen sambil diaduk hingga mendidih.
4. Media kemudian ditutup dengan kapas dan dibungkus menggunakan kertas coklat.
5. Dilakukan sterilisasi dengan autoklaf dengan tekanan 1 atm dengan temperatur 121°C selama 15 menit.

6. Setelah disterilisasi media sebanyak 70 mL dituangkan ke 10 tabung reaksi sebanyak 7ml dan dimiringkan sampai memadat (untuk media pertumbuhan *Candida albicans*). Sisa media SDA disisihkan dan digunakan untuk uji aktifitas antifungi.

3.6.7 Peremajaan Fungi *Candida albicans* (Wijayanti dan Rahayu, 2018).

1. Inokulasi 1 ose *Candida albicans* dari biakan murni kedalam 10 tabung reaksi yang berisi media Saboroud Dextrose Agar
2. Setelah itu, diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37⁰ C,
3. Diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 24jam.
4. Fungi *Candida albicans* pada media SDA tampak seperti krim putih dan licin disertai bau khas seperti ragi. Morfologi mikroskopis *Candida albicans* memperlihatkan pseudohyphae dengan cluster di sekitar blastokonidia bulat bersepta panjang berukuran 3-7x3-14 µm. (Babic M, 2010).

3.6.8 Pembuatan Suspensi Fungi (Wijayanti dan Rahayu, 2018)

1. Diambil dengan jarum ose fungi *Candida albicans* dari kultur persediaan yang diinokulasi kan pada media agar miring.
2. Dimasukkan ke dalam enlemeyer yang berisi larutan NaCl 0,9% kemudian dicampur hingga homogeny dan ditandai dengan cairan berubah menjadi keruh.
3. Kekeruhan dari suspense diukur dengan spetofotometri vis sesuai dengan panjang gelombang 530nm hingga diperoleh %T90.
4. Jika nilai %T90 setara dengan jumlah sel 1×10^6 cfu.

3.6.9 Pembuatan Kontrol

3.6.9.1 Kontrol negative

1. Disiapkan aquadest sebagai kontrol negatif.
2. Dimasukkan suspensi fungi kedalam cawan petri.
3. Dimasukkan media SDA lalu digoyang-goyangkan sesuai angka delapan dan biarkan memadat.
4. Diberi lubang sumuran menggunakan bor (pelubang) dengan diameter 9mm
5. Diisi aquades pada lubang sumuran, lalu dibungkus dengan kertas coklat dan diinkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam.

3.6.9.2 Kontrol media

1. Disiapkan media SDA yang sudah disterilkan.
2. Dimasukkan SDA sebanyak 15 mL ke dalam cawan petri lalu digoyang-goyangkan sesuai angka delapan dan dibiarkan memadat.
3. Kemudian dibungkus dengan kertas coklat dan diinkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam.

3.6.10 Pengujian Antifungi Metode Sumuran (Pertiwi, 2008)

1. Disiapkan alat dan bahan
2. Dimasukkan suspensi fungi *Candida albicans* sebanyak 1 mL kedalam cawan petri
3. Ditambahkan media SDA sebanyak 15 mL, digoyang-goyangkan sesuai angka delapan dan biarkan memadat.
4. Dibuat lubang pada cawan petri menggunakan bor pelubang sumuran yang sudah steril dengan diameter sumuran 9 mm.

5. Dimasukkan sampel pada lubang sumuran sebanyak 20 μ l dengan perlakuan masing-masing yaitu seduhan dengan waktu penyeduhan 15menit, 30menit dan 45menit yang dilakukan didalam LAF (Laminar Air Flow)
6. Dilakukan replikasi sebanyak 3x pada masing-masing perlakuan.
7. Dibungkus dengan kertas coklat dan diinkubasi pada suhu 37^o C selama 24 jam
8. Dihitung zona yang terbentuk menggunakan jangka sorong dengan mengambil 3 titik zona bening yang terbentuk selanjutnya dirata-rata hasilnya.

3.7 Analisis Data

Dalam penelitian ini akan dianalisa dengan deskriptif untuk mendiskripsikan ada atau tidaknya aktivitas pemberian seduhan daun pandan wangi dengan variasi waktu penyeduhan 15menit, 30menit dan 45menit terhadap pertumbuhan *Candida albican*.