

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Rancangan Penelitian

Metode penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah penelitian yang bersifat eksperimental yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh lama waktu rebusan daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius* Roxb) terhadap pertumbuhan *Candida albicans*. Adapun variabel yang diamati adalah pengaruh rebusan daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius* Roxb).

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, uji identifikasi fitokimia, pembuatan kontrol negative (aquadest), kontrol media, pembuatan suspensi mikroba, sterilisasi alat dan bahan, persiapan fungi uji *Candida albicans* yang ditumbuhkan dan diremajakan dimedia SDA, pengujian aktivitas antifungi dengan metode difusi sumuran menggunakan media SDA. Tahap akhir dalam penelitian ini adalah analisa data.

3.2. Sampel Dan Populasi

3.2.1 Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah rebusan daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius* Roxb) dengan perbedaan lama waktu rebusan (mendidih, mendidih 30 menit, mendidih 60 menit).

Sampel yang digunakan yaitu \pm 1 mL dari masing-masing rebusan daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius* Roxb).

3.3. Lokasi Dan Waktu Penelitian

3.3.1 Lokasi

Lokasi penelitian dilakukan di Laboratorium Akademi Farmasi Putra Indonesia Malang.

3.3.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada 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 lama waktu rebusan daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius* Roxb). Sedangkan variabel terikat pada penelitian ini adalah zona hambat yang terbentuk rebusan 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: Variasi waktu rebusan daun pandan wangi (<i>Pandanus amaryllifolius</i> Roxb)	cairan yang diperoleh dengan pemanasan daun pandan wangi dengan lampu spiritus, hingga mendidih dengan suhu $\pm 92^{\circ}\text{C}$ variasi rebusan yaitu mendidih, mendidih 30 menit, dan mendidih 60 menit	Gelas ukur	mL	Nominal
Terikat: Pertumbuhan <i>Candida albicans</i>	Zona hambat yang terbentuk disekitar sumuran yang telah diberi sampel dengan perbedaan lama waktu rebusan	Jangka sorong	mm	Nominal

3.5. Instrumen Penelitian

Instrumen penelitian adalah semua alat dan bahan yang digunakan untuk pegumpulan data. Adapun alat dan bahan yang digunakan adalah sebagai berikut:

3.5.1 Alat

Dalam penelitian ini alat yang digunakan adalah, beaker glass, gelas ukur, kaki tiga, kawat kasa, bunsen, enlemeyer, tabung reaksi, *blue tip*, *white tip*, jarum ose, mikro pipet, LAF (Moscote LH-M), inkubator (Memmert IN 30), termometer, jangka sorong, autoklaf (American 1925X), Oven (Memmert UN 30).

3.5.2 Bahan

Dalam penelitian bahan yang digunakan adalah daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius* Roxb), *sabouraud dextrose agar* (Merck), larutan NaCl 0,9% (Otsuka), Mg (Merck), HCl (Merck), H₂SO₄ (Merck), FeCl₃ (Merck), NaOH (Merck), kloroform (Merck), amonia (Merck), mayer (HgCl₂, KI), dragendrof (Bi, CH₃COOH, KI), wagner(I, KI), aquadest, *Candida albicans* yang diperoleh dari laboratorium mikrobiologi kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

3.6. Pengumpulan Data

3.6.1. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius* Roxb) dilakukan oleh UPT Materia Medica Batu dengan cara mencocokkan adanya kesamaan ciri tanaman pandan wangi sesuai dengan taksonominya.

3.6.2. Pengambilan Sampel Daun Pandan Wangi

1. Diambil 13 gram (setara dengan 2 lembar) daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius* Roxb) daun yang diambil adalah daun ke sepuluh sampai ke lima belas dari atas
2. Dibersihkan daun pandan wangi dari kotoran , dengan dicuci dengan air bersih mengalir kemudian ditiriskan (Nastiandari, 2016).

3.6.3. Pembuatan Sampel

1. Diambil 13 gram (setara dengan 2 lembar) daun pandan wangi segar yang sudah dibersihkan dan dicuci
2. Dipotong daun pandan wangi dengan ukuran ± 2 mm
3. Diukur 200 mL aquadest
4. Dimasukkan daun pandan yang sudah dipotong kedalam, 200 mL aquadest dalam beaker glass, kemudian ditutup dengan alumunium foil
5. Diukur suhu menggunakan termometer
6. Dipanaskan menggunakan lampu spiritus, hingga mendidih, mendidih 30 menit, dan mendidih 60 menit
7. Pembuatan sampel dilakukan pada LAF (Nastiandari, 2016).

3.6.4. Uji Identifikasi

3.6.4.1 Uji Flavonoid

1. Diambil sampel sebanyak 5 mL dimasukkan kedalam tabung reaksi I. Tabung I ditambahkan 3 tetes larutan NaOH, terbentuk warna kuning intens yang menjadi tidak berwarna dengan penambahan asam sulfat 2N (H_2SO_4) menunjukkan adanya flavonoid
2. Diambil sampel sebanyak 2 mL dimasukkan kedalam tabung reaksi II. Tabung II ditambahkan 0,5 mL HCL pekat dan 1 gram serbuk Mg. Adanya senyawa flavonoid ditandai dengan warna merah, orange dan hijau (Alfinda *et al.*, 2008).

3.6.4.2 Uji Alkaloid

1. Diambil sampel 5 gram dimasukkan kedalam enlemeyer, ditambahkan kloroform 2 mL, amonia 2 mL, ditambahkan 1 mL asam sulfat 2N, dan dikocok sampai terbentuk dua lapisan. Lapisan asam (atas) dipipet dimasukkan kedalam 3 tabung reaksi.
2. Tabung 1, diambil 1 bagian sampel ditambahkan 2-3 tetes larutan mayer
3. Tabung 2, diambil 1 bagian sampel ditambahkan 2-3 tetes larutan dragendorf
4. Tabung 3, diambil 1 bagian sampel ditambahkan 2-3 tetes larutan wagner
5. Adanya senyawa alkaloid ditandai dengan terbentuknya endapan putih pada tabung satu, dan timbulnya endapan berwarna coklat kemerahan pada tabung dua dan tiga (Alfinda *et al.*, 2008).

3.6.4.3 Uji Saponin

Diambil sampel sebanyak 5 mL dimasukkan kedalam tabung reaksi satu. Kemudian dikocok kuat-kuat selama 30 detik. Terbentuknya buih selama tidak kurang 10 detik setinggi 1 cm sampai 10 cm menunjukkan adanya saponin dan penambahan 1 tetes asam klorida 2N buih tidak hilang (Alfinda *et al.*, 2008).

3.6.4.4 Uji Tanin

Sebanyak 5 mL sampel dimasukkan kedalam 2 tabung reaksi, tabung pertama ditambahkan 3 tetes larutan FeCl_3 1% terbentuk warna hijau kecoklatan menunjukkan adanya tanin katekol dan biru kehitaman menunjukkan adanya tanin galat (Alfinda *et al.*, 2008).

3.6.5. Sterilisasi Alat Dan Bahan

1. Pemanasan Basah

Dimasukkan alat-alat dan bahan yang disterilkan ke dalam otoklaf dengan suhu 121°C hingga dicapai tekanan 1 atm selama 15 menit untuk alat-alat yang tidak tahan terhadap panas.

2. Pemanasan Kering

Menggunakan lampu spiritus untuk alat-alat seperti pinset, jarum ose, bibir tabung reaksi/ enlemeyer/ cawan petri. Cara lain menggunakan oven pada suhu 170°C selama 1-2 jam untuk alat-alat seperti cawan petri, botol, atau bahan seperti tepung, dan sebagainya (Wijayanti dan Rahayu, 2018).

3.6.6. Pembuatan Media

3.6.6.1 Pembuatan Media SDA

1. Ditimbang *Saboroud Dextrose Agar* 11,05 gram dan dilarutkan dengan 170 mL aquadest kedalam enlemeyer dipanaskan sampai mendidih
2. Media kemudian ditutup dengan kapas dan dibungkus dengan kertas coklat lalu disterilkan dalam autoklaf dengan tekanan 1 atm pada temperatur 121°C selama 15 menit
3. Setelah disterilisasi media dituangkan ke 5 tabung reaksi (7 ml) dan dimiringkan sampai memadat (untuk media pertumbuhan *Candida albicans*).
4. Untuk uji aktivitas antifungi media dituangkan ke 9 cawan petri (15 mL)

(Wijayanti dan Rahayu, 2018).

3.6.7. Peremajaan Fungi

1. Inokulasi 1 ose *Candida albicans* dari biakan murni kedalam 5 tabung reaksi yang berisi media *Saboroud Dextrose Agar*
2. Diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam (Wijayanti dan Rahayu, 2018).

Untuk memastikan bahwa mikroorganisme yang tumbuh adalah *Candida albicans*, maka perlu dilakukan identifikasi fungi dengan ditumbuhkan pada media selektif SDA

1. Satu ose fungi *Candida albicans* diambil dan diratakan dengan metode streak pada media SDA yang telah memadat
2. Selanjutnya diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C
3. Diamati koloni yang terbentuk
4. Diperoleh koloni mikroorganisme yang tampak seperti krim putih dan licin disertai bau khas/ *yeast odour* (Mutiawati, 2016).

3.6.8. Pembuatan Suspensi

1. Diambil dengan ose fungi *Candida albicans* dari kultur persediaan yang diinokulasi pada media agar miring
2. Dimasukkan kedalam tabung reaksi yang berisi NaCl 0,9% yang sudah disterilkan
3. Kemudian dicampur hingga homogen dan ditandai dengan cairan berubah menjadi keruh
4. Kekeruhan dari suspensi dengan spektrofotometri UV-Vis sesuai dengan panjang gelombang 530 nm hingga diperoleh %T 90 (Wijayanti dan Rahayu, 2018).

3.6.9. Pembuatan Kontrol

3.6.9.1 Kontrol Bakteri

1. Disiapkan dan disterilkan alat yang digunakan
2. Dimasukkan 1 mL suspensi bakteri kedalam cawan petri steril, diratakan dengan digoyang-goyang membentuk angka nol sampai merata.
3. Kemudian dimasukkan 15 mL media SDA lalu diratakan dan biarkan hingga memadat
4. Dibungkus dengan kertas coklat dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Rohadi, 2016).

3.6.9.2 Kontrol Media

1. Disiapkan dan disterilkan alat yang digunakan
2. Dimasukkan 15 mL media SDA yang sudah di steril, lalu digoyang-goyang membentuk angka nol sampai merata dan dibiarkan hingga memadat
3. Dibungkus dengan kertas coklat dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Rohadi, 2016).

3.6.10. Pengujian Antifungi

1. Disiapkan alat dan bahan
2. Dimasukkan 1 mL suspensi fungi kedalam cawan petri
3. Kemudian ditambahkan media SDA sebanyak 15 mL, digoyang-goyangkan media membentuk angka nol dan dibiarkan hingga memadat
4. Dibuat sumuran pada 9 cawan petri dengan menggunakan bor steril (Diameter 9 mm)

5. Dimasukkan sempel pada lubang sumuran sebanyak 20 μ l dengan perlakuan masing-masing yaitu rebusan mendidih 0 menit, mendidih 30 menit, mendidih 60 menit, dilakukan replikasi 3 kali
6. Diinkubasi pada inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam
7. Diamati dan diukur diameter zona hambat yang terbentuk (Wijayanti dan Rahayu, 2018).

3.7. Analisa Data

Dalam penelitian ini analisis data diambil menggunakan analisis deskriptif untuk mendeskripsikan ada atau tidaknya aktivitas antifungi rebusan daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius*) dengan variasi mendidih 0 menit, mendidih 30 menit, dan mendidih 60 menit terhadap pertumbuhan *Candida albicans*.