

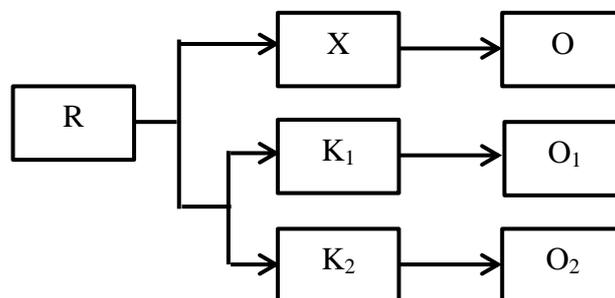
BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimen laboratorium dimana peneliti dapat melakukan kontrol dan mengobservasi subyek penelitian (Sugiyono, 2013).

Desain penelitian yang digunakan adalah *Post Test Only Control Group Design*, dimana dua kelompok yang dipilih secara random dianggap homogen sebelum diberi perlakuan, sehingga tidak dilakukan pengukuran awal. Kelompok pertama adalah kelompok eksperimen yang diberi perlakuan kemudian dilakukan pengukuran. Kelompok kedua adalah kelompok kontrol yang tidak mendapat perlakuan dimana digunakan sebagai pembanding dan hanya dilakukan pengukuran saja. Perbandingan hasil dari kedua kelompok menunjukkan efek dari adanya perlakuan yang diberikan (Notoatmodjo, 2005).



Gambar 5. Desain Penelitian
Sumber: Sugiyono, 2013.

Keterangan :

- R : Randomisasi
- X : Kelompok eksperimen diberi perlakuan minyak atsiri bunga cengkeh dengan konsentrasi 0,5%, 1,0%, 1,5% dan 2,0% pada media SDA
- K₁ : Kelompok kontrol positif menggunakan ketokonazol 1% pada media SDA
- K₂ : Kelompok kontrol negatif menggunakan CMC 1% pada media SDA
- O : Pengukuran diameter zona hambat jamur *Candida albicans* dengan variasi konsentrasi minyak atsiri bunga cengkeh pada media SDA
- O₁ : Pengukuran diameter zona hambat jamur *Candida albicans* dengan ketokonazol 1% sebagai kontrol positif pada media SDA
- O₂ : Pengukuran diameter zona hambat jamur *Candida albicans* dengan CMC 1% sebagai kontrol negatif pada media SDA

Menurut Hanafiah (2014), penentuan banyaknya pengulangan pada penelitian ini digunakan rumus Federer sebagai berikut:

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

dimana r adalah banyaknya pengulangan dan t adalah jumlah kelompok perlakuan.

Berdasarkan rumus Federer, maka dapat dihitung banyaknya pengulangan yang dapat dilakukan yaitu:

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

$$(r - 1)(4 - 1) \geq 15$$

$$(r - 1)3 \geq 15$$

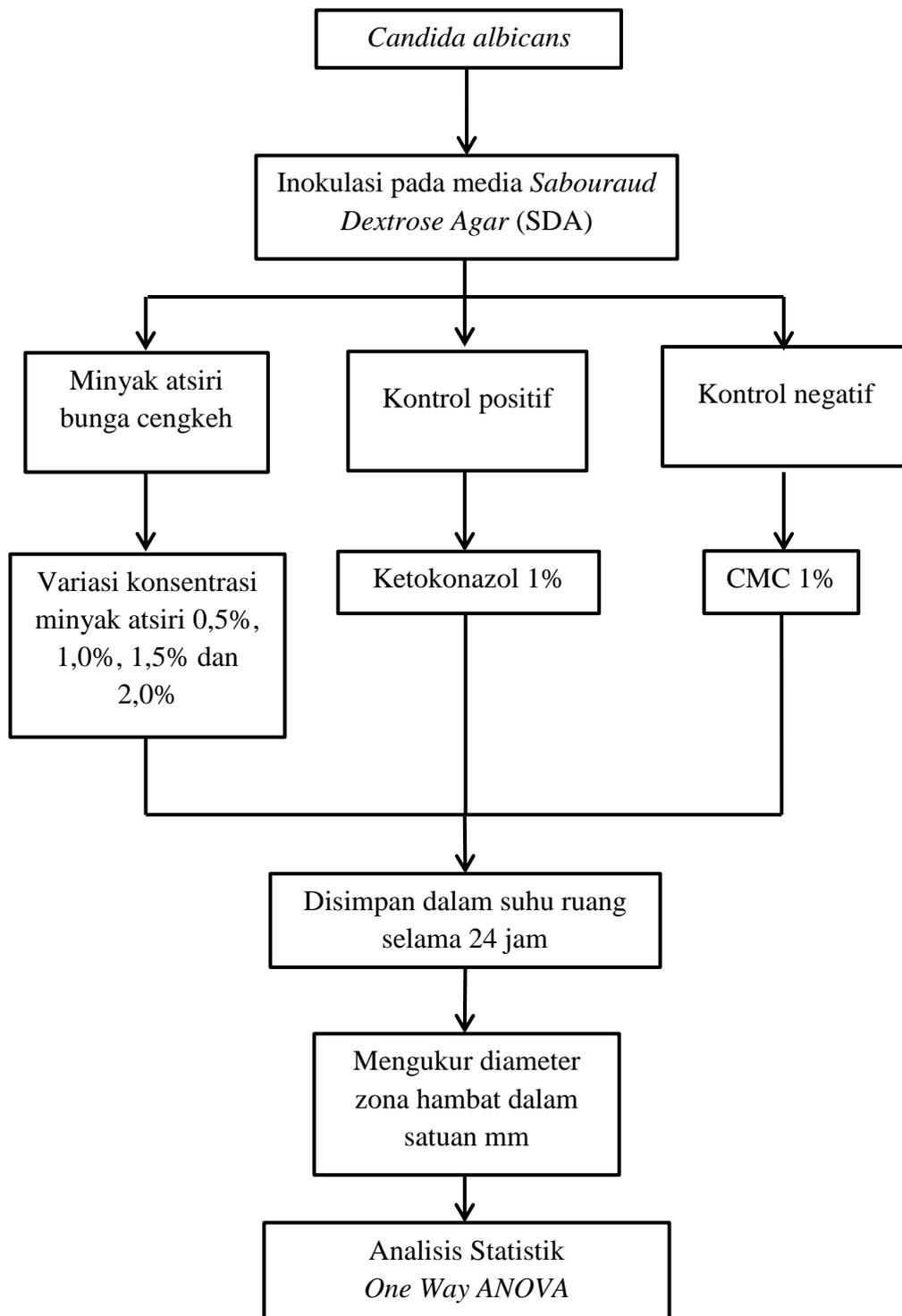
$$3r - 3 \geq 15$$

$$3r \geq 18$$

$$r \geq 6$$

Hasil perhitungan menggunakan rumus Federer diatas, diperoleh banyaknya pengulangan minimal adalah enam kali. Pada penelitian ini peneliti akan melakukan pengulangan sebanyak delapan kali.

B. Rancangan Percobaan



Gambar 6. Rancangan Percobaan

C. Subyek dan Obyek Penelitian

1. Subyek Penelitian

Subyek dari penelitian ini adalah biakan murni jamur *Candida albicans* yang berumur 24 jam.

2. Obyek Penelitian

Obyek dalam penelitian ini adalah minyak atsiri bunga cengkeh (*Syzygium aromaticum* L.) dalam variasi konsentrasi 0,5%, 1,0%, 1,5% dan 2,0%.

D. Waktu dan Tempat Penelitian

1. Waktu Penelitian

Penelitian untuk mengetahui aktivitas minyak atsiri bunga cengkeh dalam menghambat pertumbuhan jamur *Candida albicans* secara *in vitro* ini dilakukan pada bulan Desember 2018.

2. Tempat Penelitian

- a. Pembuatan minyak atsiri bunga cengkeh dengan metode destilasi uap dan air oleh PT Lansida, Umbulharjo, Yogyakarta
- b. Uji kadar minyak atsiri bunga cengkeh dilakukan di LPPT Universitas Gadjah Mada
- c. Uji determinasi bahan bunga cengkeh dilakukan di Departemen Biologi Farmasi Unit II Universitas Gadjah Mada
- d. Uji aktivitas minyak atsiri bunga cengkeh dalam menghambat pertumbuhan jamur *Candida albicans* secara *in vitro* dilakukan di

Laboratorium Mikologi Jurusan Analis Kesehatan Poltekkes
Kemenkes Yogyakarta

E. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variasi konsentrasi minyak atsiri bunga cengkeh.

Skala : Ratio

Satuan : %

2. Variable Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah besarnya diameter zona hambat radikal pertumbuhan jamur *Candida albicans*.

Skala : Ratio

Satuan : mm

3. Variabel Pengganggu

- a. Kontaminan
- b. Suhu dan kelembapan
- c. Kepadatan koloni jamur
- d. Ketebalan media

F. Definisi Operasional Variabel Penelitian

1. Kosentrasi minyak atsiri bunga cengkeh adalah 1 kilogram bunga cengkeh yang mampu menghasilkan 155 ml minyak atsiri dengan konsentrasi 91% yang diperoleh dari metode destilasi uap dan air.

2. Diameter zona hambat adalah daerah jernih yang tidak memperlihatkan pertumbuhan jamur *Candida albicans* yang dapat diukur dengan jangka sorong dan dinyatakan dalam satuan mm.

Skala : Rasio

Satuan : mm

3. Kontaminan adalah jamur atau mikroba selain jamur *Candida albicans* yang dapat tumbuh pada media padat yang telah diberi variasi konsentrasi minyak atsiri bunga cengkeh sehingga dapat mempengaruhi hasil. Hal ini dapat dikendalikan dengan metode aseptik serta sterilisasi alat dan bahan.
4. Suhu adalah derajat angka yang menunjukkan panas atau dingin suatu benda atau ruang, sedangkan kelembapan adalah konsentrasi uap air di udara. Keduanya digunakan untuk menginkubasi media yang telah ditanami jamur *Candida albicans*, hal ini dapat diukur menggunakan termometer ruang dan higrometer.
5. Ketebalan media adalah tebalnya media SDA yang digunakan untuk menumbuhkan jamur *Candida albicans*. Dapat dikendalikan dengan menyamakan volume media saat dibuat yaitu memasukkan 20 ml media SDA pada setiap cawan petri.
6. Kepadatan koloni jamur adalah jarak antar koloni yang tumbuh pada media SDA dan pengendaliannya dilakukan dengan pembuatan suspensi jamur sesuai dengan standar kekeruhan *Mc Farland*.

G. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

Penelitian ini menggunakan data primer dimana hasil diperoleh dari pengukuran langsung yang dilakukan oleh peneliti terhadap diameter zona hambat pertumbuhan jamur *Candida albicans* setelah pemberian variasi konsentrasi minyak atsiri 0,5%, 1,0%, 1,5% dan 2,0% dan dengan menggunakan kelompok pembanding yaitu kontrol positif serta kontrol negatif yang seluruhnya berjumlah 48 data.

H. Alat dan Bahan Penelitian

1. Alat
 - a. Neraca analitik
 - b. Botol timbang
 - c. Labu erlenmeyer
 - d. Batang pengaduk
 - e. Cawan petri *disposable*
 - f. Rak dan tabung reaksi
 - g. Ose steril
 - h. Pipet ukur
 - i. Pipet pasteur
 - j. Mikropipet dan tip
 - k. Kapas
 - l. Lampu spirtus
 - m. Jangka sorong
 - n. Korek api

- o. *Autoclave*
- p. Gelas kimia
- q. Corong
- r. *Box container*

2. Bahan

- a. Bunga cengkeh
- b. Biakan jamur *Candida albicans*
- c. *Carboxymethyl cellulose* (CMC)
- d. Media *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA), dengan komposisi dalam satu liter :
 - 1) *Casein* 10,0 gram
 - 2) *Peptone* 10,0 gram
 - 3) *Glucose* 40,0 gram
 - 4) *Agar* 20,0 gram
- e. Akuades
- f. Disk cakram *plain*

I. Prosedur Penelitian

1. Tahap Persiapan

- a. Melakukan izin menggunakan Laboratorium Mikologi Jurusan Analis Kesehatan Poltekkes Kemenkes Yogyakarta
- b. Sterilisasi alat

Alat – alat yang akan digunakan perlu disterilisasi dengan cara mencuci alat kemudian mengeringkannya dan membungkusnya

dengan menggunakan kertas untuk kemudian di masukkan ke dalam oven selama 8 jam pada suhu 110°C.

c. Sterilisasi akuades

Memasukkan akuades ke dalam labu erlenmeyer kemudian ditutup menggunakan kapas dan kertas. Masukkan ke dalam *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit.

d. Pembuatan NaCl fisiologis

- 1) Alat dan bahan disiapkan
- 2) Serbuk NaCl 0,85% ditimbang sebanyak 2,125 gram
- 3) NaCl yang telah ditimbang dilarutkan dalam 250 ml akuades
- 4) Diatur pH larutan menjadi 7,0 setelah dilarutkan
- 5) Larutan NaCl disterilkan dengan *autoclave* 121°C selama 15 menit
- 6) Larutan NaCl dimasukkan ke dalam beberapa tabung reaksi untuk membuat suspensi jamur *Candida albicans*

e. Pembuatan media *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA)

- 1) Alat dan bahan disiapkan
- 2) Serbuk SDA ditimbang sebanyak 13 gram
- 3) Serbuk SDA yang telah ditimbang dilarutkan ke dalam 200 ml akuades
- 4) Media SDA disterilisasi dalam *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit

f. Pembuatan standar kekeruhan *Mc Farland*

1) Alat dan bahan disiapkan

2) Larutan BaCl₂ 1%

Serbuk BaCl₂ ditimbang 1 gram dan dilarutkan dalam akuades 100 ml

3) Larutan H₂SO₄ 1%

H₂SO₄ 96% dipipet sebanyak 1,04 ml dan dilarutkan dalam akuades 100 ml

4) Larutan BaCl₂ 1% 0,5 ml dicampurkan dengan 9,5 ml larutan H₂SO₄ 1% kemudian dihomogenkan

5) Standar kekeruhan *Mc Farland* harus dihomogenkan terlebih dahulu setiap akan digunakan

g. Pembuatan *Carboxymethyl cellulose* (CMC) 1%

1) Alat dan bahan disiapkan

2) Serbuk CMC ditimbang sebanyak 1 gram

3) Serbuk CMC yang telah ditimbang dilarutkan dengan akuades hangat 100 ml ke dalam labu erlenmeyer, homogenkan

h. Pembuatan kontrol positif ketokonazol 1%

1) Alat dan bahan disiapkan

2) Tablet ketokonazol dihaluskan sampai menjadi serbuk

3) Serbuk ketokonazol ditimbang sebanyak 0,5 gram

4) Serbuk ketokonazol yang telah ditimbang dilarutkan dengan 50 ml CMC 1%

i. Pembuatan Minyak Atsiri Bunga Cengkeh oleh PT Lansida Umbulharjo, Yogyakarta.

- 1) Alat dan bahan disiapkan
- 2) Bunga cengkeh ditimbang sebanyak 1 kg
- 3) Bunga cengkeh dimasukkan ke dalam dandang yang sudah ditambah akuades 350 ml di bawah dandang
- 4) Alat destilasi dirangkai
- 5) Dandang berisi air dan bunga cengkeh dididihkan diatas kompor listrik selama 6 jam
- 6) Destilat yang keluar ditampung dalam tabung, destilat tersebut terdapat dua lapisan yaitu air dan minyak atsiri
- 7) Air dan minyak atsiri dipisahkan dengan menggunakan corong pisah
- 8) Minyak atsiri yang dihasilkan ditutup rapat dan disimpan ditempat yang tidak terkena sinar matahari atau disimpan dalam almari es

j. Pembuatan konsentrasi bertingkat minyak atsiri bunga cengkeh

Tabel 1. Konsentrasi Minyak Atsiri Bunga Cengkeh

Konsentrasi (%)	Minyak atsiri Bunga cengkeh (μL)	CMC 1% (μL)
0,5	10	1990
1,0	20	1980
1,5	30	1970
2,0	40	1960

Sumber: Data Primer, 2018.

- 1) Alat dan bahan disiapkan
- 2) CMC 1% dipipet sebanyak 2 ml dengan pipet ukur

- 3) CMC 1% dikurangi volumenya dengan mikropipet berdasarkan konsentrasi yang akan dibuat (sesuai tabel 1)
 - 4) Minyak atsiri bunga cengkeh dipipet dengan mikropipet sesuai konsentrasi yang akan dibuat (sesuai tabel 1)
 - 5) Larutan dihomogenkan dengan menggunakan mixer
 - 6) Disk cakram direndam pada variasi konsentrasi minyak atsiri bunga cengkeh yang telah dibuat sampai jenuh
 - 7) Disk cakram ditiriskan agar tidak terlalu basah saat diletakkan di atas media inokulasi
 - 8) Pada kontrol positif disk cakram direndam sampai jenuh di dalam larutan ketokonazol 1%
 - 9) Pada kontrol negatif disk cakram direndam sampai jenuh di dalam larutan CMC 1%
- k. Peremajaan jamur *Candida albicans*
- 1) Alat dan bahan disiapkan
 - 2) Media SDA dituang ke dalam tabung reaksi besar yang telah disterilkan, kemudian diposisikan miring
 - 3) Media ditunggu hingga memadat
 - 4) Jamur *Candida albicans* diinokulasikan dalam media agar tersebut
 - 5) Media yang telah diinokulasi jamur *Candida albicans* disimpan dalam suhu ruang (22–26°C)

1. Pembuatan suspensi jamur *Candida albicans*
 - 1) Alat dan bahan disiapkan
 - 2) NaCl fisiologis dituang pada beberapa tabung reaksi dengan volume sekitar 3 ml
 - 3) Koloni jamur dari hasil peremajaan diambil 1 ujung ose dan disuspensikan ke dalam larutan NaCl fisiologis sampai kekeruhannya sama dengan standar *Mc Farland*
 - 4) Tabung kekeruhan *Mc Farland* dan tabung suspensi jamur diletakkan secara berhimpitan dengan latar belakang gelap untuk membandingkan kekeruhannya. Apabila kurang keruh, tambahkan koloni jamur dari media peremajaan
2. Tahap Pelaksanaan
 - a. Alat dan bahan disiapkan
 - b. Media SDA yang telah disterilkan dibiarkan dalam suhu kamar hingga suhunya menurun sekitar 45–50°C
 - c. Media SDA dipipet sebanyak 20 ml dan dimasukkan ke dalam cawan petri *disposable*
 - d. Suspensi jamur *Candida albicans* dalam larutan NaCl fisiologis dipipet sebanyak 1 ml masukkan ke cawan petri yang sama
 - e. Kedua larutan dihomogenkan dengan cara menggoyang – goyangkan cawan petri membentuk angka delapan
 - f. Ditunggu beberapa saat sampai media memadat

- g. Dilakukan langkah yang sama untuk membuat sejumlah media yang diperlukan
 - h. Disk cakram yang telah direndam pada variasi konsentrasi minyak atsiri bunga cengkeh, kontrol positif dan kontrol negatif masing – masing diletakkan diatas media yang telah diinokulasi jamur
 - i. Cawan petri berisi media dan disk cakram tadi dibungkus dengan kertas dan plastik
 - j. Cawan petri yang sudah dibungkus disimpan dalam *box container* selama 24 jam
3. Tahap Pengamatan
- a. Pengamatan diameter zona hambat yang terbentuk dilakukan setelah 24 jam
 - b. Diameter zona hambat diukur pada latar belakang gelap dan menggunakan jangka sorong
 - c. Diameter zona hambat yang diukur adalah daerah jernih disekitar disk cakram yang tidak ditumbuhi jamur, dan diukur dari ujung ke ujung lain melalui diameter cakram. Hasil dicatat dalam satuan mm
 - d. Diameter zona hambat pada tiap plate diukur termasuk pada kelompok kontrol dan data dimasukkan ke dalam tabel data primer

J. Manajemen Data

Data yang terkumpul dalam penelitian ini kemudian akan dianalisis menggunakan analisis deskriptif, analisis analitik dan analisis statistik. Analisis deskriptif dilakukan terhadap semua data yang diperoleh secara

keseluruhan, dan selanjutnya disajikan dalam bentuk diagram batang. Analisis statistik digunakan untuk menggeneralisasikan data sampel terhadap populasi.

1. Penyajian Data

Pengolahan data dilakukan setelah semua data terkumpul. Pengolahan data merupakan aspek yang paling penting untuk mendapatkan jawaban terhadap masalah yang diteliti sehingga dapat memberikan makna dan arti tertentu. Data yang diperoleh dari penelitian dimasukkan dalam tabel data primer.

2. Analisis Deskriptif

Data yang diperoleh disajikan dalam bentuk diagram batang dan dianalisis secara deskriptif untuk menggambarkan hasil pengukuran diameter zona hambat pertumbuhan jamur. Analisis deskriptif dilakukan terhadap semua data yang diperoleh secara keseluruhan dan selanjutnya disajikan dalam bentuk diagram batang untuk mengetahui dengan jelas diameter zona hambat yang terbentuk setelah pemberian minyak atsiri dengan berbagai konsentrasi.

3. Analisis Analitik

Analisis analitik dilakukan untuk mengetahui kekuatan aktivitas minyak atsiri bunga cengkeh dengan variasi konsentrasi 0,5%, 1,0%, 1,5% dan 2,0% terhadap diameter zona hambat yang dihasilkan. Pengelompokan kekuatan antifungi oleh Davis dan Stout terhadap diameter zona hambat yang dihasilkan ditunjukkan pada tabel

Tabel 2. Kekuatan Antifungi Berdasarkan Diameter Zona Hambat

Diameter Zona Hambat	Kekuatan
> 20 mm	Sangat kuat
10–20 mm	Kuat
5–10 mm	Medium
< 5 mm	Lemah

Sumber: Pintauli dan Hamada, 2008.

4. Analisis Statistik

Uji statistik dilakukan dengan menggunakan program SPSS 16.0 *for windows*. Analisis data dapat dilakukan dengan menggunakan uji *One Way Anova* atau uji *Kruscall Walis*. Uji *One Way Anova* digunakan apabila data berdistribusi normal dan data homogen, sehingga perlu dilakukan uji distribusi dan uji homogenitas terlebih dahulu. Uji *Kruscall Walis* digunakan apabila salah satu atau kedua syarat tersebut tidak terpenuhi.

a. Uji distribusi data

Data yang diperoleh dari pengukuran diameter zona hambat dari semua kelompok perlakuan dimasukkan dalam program SPSS 16.0. Uji distribusi data dilakukan menggunakan Shapiro Wilk dikarenakan data yang digunakan < 50. Uji ini bertujuan untuk mengetahui normal atau tidaknya distribusi data. H_0 diterima apabila $\text{asyp. sig.} \geq 0,05$

b. Uji Homogenitas

Data yang telah dilakukan uji distribusi data dan diketahui nilai $\text{asyp. Sig.} \geq 0,05$ selanjutnya dilakukan uji homogenitas. Uji ini

bertujuan untuk mengetahui homogen atau tidaknya kumpulan data yang tersebar. H_0 diterima apabila $\text{sig.} > 0,05$

c. Uji *One Way Anova*

Data yang telah diuji homogenitas dan diketahui memiliki nilai $\text{sig.} > 0,05$ atau data homogen selanjutnya dilakukan uji *One Way Anova*. Uji ini bertujuan untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan rerata pada tiap kelompok perlakuan. H_0 diterima apabila $\text{sig.} > 0,05$.

d. Uji *Post hoc LSD*

Data yang telah dilakukan uji beda selanjutnya dilakukan uji post hoc *Least Significance Different (LSD)* untuk mengetahui signifikansi perbedaan rerata diameter zona hambat yang terbentuk antara kelompok perlakuan. Data signifikan apabila nilai $\text{sig.} < 0,05$. Selanjutnya dilakukan uji hubungan untuk mengetahui ada tidaknya hubungan antara variabel terikat dengan variabel bebas. Jika diketahui ada hubungan maka dilanjutkan uji regresi linier untuk melihat kuatnya hubungan antara kedua variabel.

K. Etika Penelitian

Penelitian ini memiliki risiko bagi peneliti, namun risiko – risiko tersebut dapat diatasi dengan penggunaan alat pelindung diri (APD). APD yang digunakan penelitian ini antara lain: jas laboratorium, sarung tangan, sepatu tertutup dan masker wajah untuk melindungi peneliti dari kontaminasi jamur. Penelitian yang dilakukan telah mendapatkan

persetujuan dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan Poltekkes Kemenkes Yogyakarta dengan nomor surat LB.01.01/KE-01/XLV/908/2018 yang dapat dilihat pada Lampiran 8.