

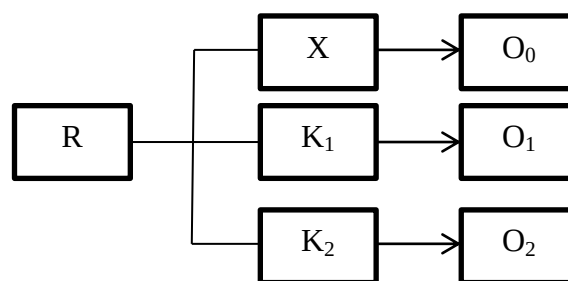
BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimen laboratorium karena peneliti dapat memodifikasi dan mengobservasi subyek penelitian (Sugiyono, 2013).

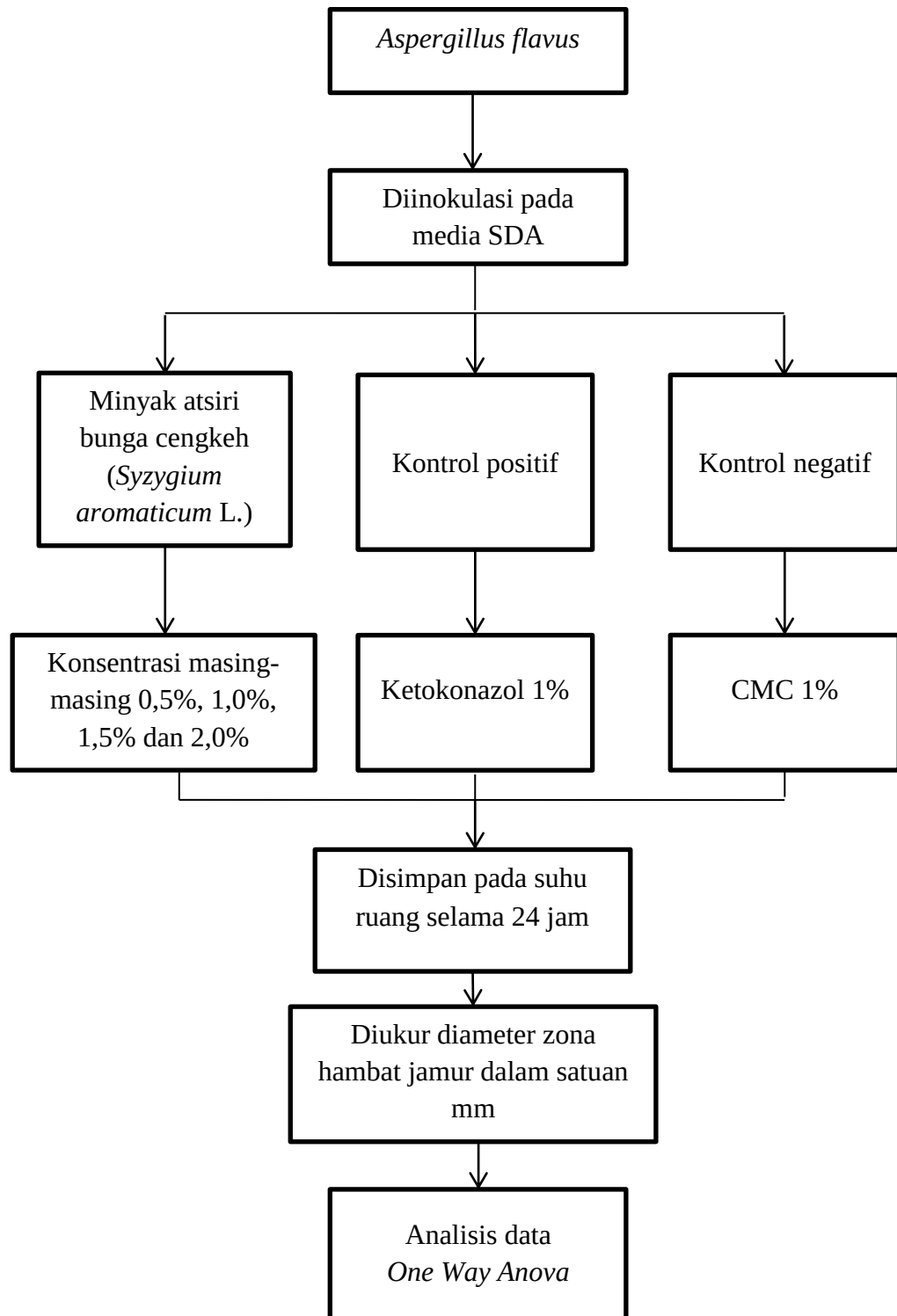
Desain penelitian yang digunakan adalah *Post Test Only Control Group Design*, di mana 2 kelompok yang dipilih secara acak dianggap sama (homogen) sebelum diberi perlakuan sehingga pengukuran awal (pre-test) tidak dilakukan. Kelompok pertama adalah kelompok eksperimen yang diberi perlakuan kemudian dilakukan pengukuran, sedangkan kelompok kedua adalah kelompok kontrol yang digunakan sebagai pembanding sehingga tidak diberi perlakuan tetapi hanya dilakukan pengukuran saja. Perbandingan hasil antara kedua kelompok menunjukkan efek dari perlakuan yang diberikan (Sugiyono, 2013). Bentuk desain penelitian ditunjukkan pada Gambar 9.



Gambar 9. Desain Penelitian
Sumber: Sugiyono, 2013.

Keterangan:

- R : Randomisasi
- X : Kelompok eksperimen dengan perlakuan menggunakan minyak atsiri bunga cengkeh konsentrasi 0,5%, 1,0%, 1,5% dan 2,0%
- K₁ : Kelompok kontrol positif menggunakan ketokonazol 1%
- K₂ : Kelompok kontrol negatif menggunakan CMC 1%
- O₀ : Pengukuran diameter zona hambat jamur *Aspergillus flavus* pada media SDA dengan berbagai variasi konsentrasi minyak atsiri bunga cengkeh
- O₁ : Pengukuran diameter zona hambat jamur *Aspergillus flavus* pada media SDA dengan ketokonazol 1% sebagai kontrol positif
- O₂ : Pengukuran diameter zona hambat jamur *Aspergillus flavus* pada media SDA dengan CMC 1% sebagai kontrol negatif

B. Rancangan Percobaan

Gambar 10. Rancangan Percobaan

C. Subyek dan Obyek Penelitian

1. Subyek Penelitian

Subyek penelitian ini adalah koloni murni jamur *Aspergillus flavus* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada dengan kriteria sudah diremajakan.

2. Obyek Penelitian

Obyek penelitian ini adalah minyak atsiri bunga cengkeh (*Syzygium aromaticum* L.) yang diperoleh dari hasil destilasi uap dan air bunga cengkeh yang berkualitas dengan kriteria kering dan berwarna merah kecoklatan dengan panjang 1–2 cm kemudian minyak atsiri dibuat pengenceran dengan konsentrasi 0,5%, 1,0%, 1,5% dan 2,0%.

Penentuan pengulangan menurut rumus Federer untuk memperoleh hasil yang dapat dipercaya (Hanafiah, 2014) adalah sebagai berikut :

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

Keterangan:

t = jumlah perlakuan

r = jumlah pengulangan atau replikasi

Jumlah pengulangan pada penelitian ini diperoleh berdasarkan hasil perhitungan menggunakan rumus di atas, dengan 4 variasi konsentrasi minyak atsiri bunga cengkeh masing-masing 0,5%, 1,0%, 1,5% dan 2,0% sebagai berikut:

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

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

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

$$3r-3 \geq 15$$

$$r \geq \frac{18}{3}$$

$$r \geq 6$$

Berdasarkan perhitungan pengulangan tersebut, diperoleh jumlah pengulangan minimal sebanyak 6 kali. Pada penelitian ini, peneliti melakukan pengulangan terhadap berbagai variasi konsentrasi minyak atsiri sebanyak 8 kali.

D. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat Penelitian

- a. Pembuatan minyak atsiri bunga cengkeh dilakukan di PT Lansida, Umbulharjo, Yogyakarta.
- b. Pembelian koloni jamur *Aspergillus flavus* dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada.
- c. Uji kadar minyak atsiri bunga cengkeh dilakukan di LPPT Universitas Gadjah Mada.
- d. Uji determinasi bahan bunga cengkeh dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada.

- e. Uji daya antifungi minyak atsiri bunga cengkeh dilakukan di Laboratorium Mikologi Poltekkes Kemenkes Yogyakarta.

2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Desember 2018.

E. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

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

2. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah diameter zona hambat jamur *Aspergillus flavus*.

3. Variabel Pengganggu

- a. Kontaminan
- b. Ketebalan media
- c. Kepadatan sel jamur
- d. Suhu
- e. Kelembapan

F. Definisi Operasional Variabel Penelitian

- 1. Konsentrasi minyak atsiri dibuat dari bunga cengkeh sebanyak 1 kg yang didestilasi uap dan air menghasilkan 155 ml minyak atsiri dengan konsentrasi 91% kemudian dibuat pengenceran dalam konsentrasi 0,5%, 1,0%, 1,5% dan 2,0%.

Satuan : %

Skala : rasio

2. Diameter zona hambat yang diukur adalah zona hambat radikal yaitu daerah yang tidak memperlihatkan adanya pertumbuhan jamur *Aspergillus flavus* dan diukur menggunakan jangka sorong.

Satuan : mm

Skala : rasio

3. Pertumbuhan adalah proses bertambahnya volume dan jumlah sel sehingga ukuran organisme bertambah besar. Pertumbuhan sel jamur ditandai dengan munculnya miselium atau adanya kekeruhan pada media.
4. Kontaminan adalah jamur dan bakteri selain *Aspergillus flavus* yang dapat tumbuh pada media SDA berisi berbagai variasi konsentrasi minyak atsiri bunga cengkeh dan kontrol sehingga dapat mempengaruhi hasil pemeriksaan. Kontaminan dapat dikendalikan dengan perlakuan *aseptic* serta sterilisasi alat dan bahan.
5. Ketebalan media adalah tebalnya media SDA yang digunakan untuk menumbuhkan jamur *Aspergillus flavus*. Ketebalan media dikendalikan dengan menyamakan volume pada saat pembuatan media, yaitu setiap petri berisi 20 ml media SDA dengan ketebalan media sekitar 4 mm.
6. Kepadatan sel jamur adalah jarak antar koloni yang tumbuh pada media SDA, dikendalikan dengan pembuatan suspensi jamur sesuai standar kekeruhan *Mc Farland* 0,5.

7. Suhu adalah derajat angka yang digunakan untuk menunjukkan panas atau dinginnya suatu ruangan yang digunakan untuk menyimpan media yang telah ditanami jamur *Aspergillus flavus*. Suhu tidak dapat dikendalikan tetapi hanya bisa diukur menggunakan termometer selama penelitian berlangsung.
8. Kelembapan adalah kadar uap air yang ada di udara yang digunakan untuk menyimpan media yang telah ditanami jamur *Aspergillus flavus*. Kelembapan tidak dapat dikendalikan tetapi hanya bisa diukur menggunakan higrometer selama penelitian berlangsung.

G. Alat dan Bahan

1. Alat
 - a. Neraca analitik
 - b. Gelas kimia
 - c. Botol timbang
 - d. *Autoclave*
 - e. Labu Erlenmeyer
 - f. Labu ukur
 - g. Cawan petri *disposable*
 - h. Pipet ukur
 - i. Tabung reaksi dan rak
 - j. *Box container*
 - k. Pipet Pasteur
 - l. Mikropipet dan tip

- m. Lampu spiritus
- n. Ose steril
- o. Kapas
- p. Korek api
- q. Corong
- r. Jangka sorong
- s. Kompor listrik

2. Bahan

- a. Minyak atsiri bunga cengkeh
- b. Suspensi jamur *Aspergillus flavus*
- c. Media *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) per liter akuades dengan komposisi sebagai berikut (Rijal, 2015):
 - 1) *Casein*..... 5,0 gr
 - 2) *Peptone*..... 5,0 gr
 - 3) *Dextrose* 40,0 gr
 - 4) *Agar* 15,0 gr
- d. Akuades
- e. Cakram kertas
- f. *Carboxymethyl Cellulose* (CMC)
- g. NaCl fisiologis
- h. Tablet ketokonazol
- i. Standar kekeruhan *Mc Farland* 0,5

H. Prosedur Penelitian

1. Tahap Persiapan

a. Perizinan

Perizinan menggunakan Laboratorium Mikologi Poltekkes Kemenkes Yogyakarta.

b. Persiapan alat dan bahan yang akan digunakan.

c. Sterilisasi alat

Alat-alat yang akan digunakan untuk pemeriksaan disterilkan dengan cara mencuci alat kemudian dibungkus kertas dan dimasukkan dalam oven selama 8 jam pada suhu 110°C.

d. Sterilisasi akuades

Akuades dituang ke dalam labu erlenmeyer, ditutup dengan kapas dan kertas kemudian dimasukkan ke dalam *autoclave* suhu 121°C selama 15 menit.

e. Pembuatan NaCl fisiologis

1) Kristal NaCl ditimbang sebanyak 2,125 gram

2) Kristal NaCl yang sudah ditimbang dilarutkan ke dalam labu erlenmeyer sampai volume 250 ml dengan akuades. Campur hingga homogen

3) pHnya larutan tersebut dibuat menjadi 7,0

4) Larutan NaCl disterilkan dengan *autoclave* suhu 121°C selama 15 menit

- f. Pembuatan *Carboxymethyl Cellulose* (CMC) 1%
 - 1) Serbuk CMC ditimbang sebanyak 1 gram
 - 2) Serbuk CMC yang sudah ditimbang dilarutkan ke dalam labu erlenmeyer sampai volume 100 ml dengan akuades steril
 - 3) Larutan dihomogenkan dalam kondisi hangat
- g. Pembuatan kontrol positif ketokonazol 1%
 - 1) Tablet ketokonazol dihaluskan kemudian ditimbang sebanyak 0,5 gram
 - 2) Tablet ketokonazol yang sudah ditimbang dilarutkan ke dalam 50 ml larutan CMC 1% dalam kondisi hangat
- h. Pembuatan standar kekeruhan *Mc Farland* 0,5 (Soemarno, 2000)
 - 1) Larutan H_2SO_4 pekat dipipet sebanyak 1,04 ml kemudian diencerkan dalam 100 ml akuades steril melalui dinding-dinding labu erlenmeyer. Campur hingga homogen
 - 2) Serbuk $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ditimbang sebanyak 1 gram kemudian dilarutkan ke dalam 100 ml akuades steril. Campur hingga homogen
 - 3) Standar kekeruhan *Mc Farland* 0,5 dibuat dengan mencampurkan 9,5 ml larutan H_2SO_4 1% dan 0,5 ml larutan $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1%
 - 4) Standar kekeruhan ini dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditutup rapat supaya tidak terjadi penguapan. Standar ini dapat disimpan di tempat gelap pada suhu ruang selama 6 bulan

- 5) Standar kekeruhan *Mc Farland* harus dikocok terlebih dahulu sebelum digunakan
- i. Pembuatan media *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA)
 - 1) Serbuk SDA ditimbang sebanyak 39 gram
 - 2) Serbuk SDA yang sudah ditimbang dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer kemudian dilarutkan sampai volume 600 ml dengan akuades dan dihomogenkan
 - 3) Media SDA disterilkan dengan *autoclave* suhu 121°C selama 15 menit
 - 4) Media dibiarkan hingga suhu sekitar 45–50°C sebelum digunakan
- j. Pemilihan dan pembuatan minyak atsiri bunga cengkeh oleh PT Lansida:
 - 1) Pemilihan bunga cengkeh

Bunga cengkeh dipilih sebanyak 1 kg dengan kriteria kering, berwarna merah kecoklatan dengan panjang 1-2 cm.
 - 2) Pembuatan minyak atsiri bunga cengkeh
 - a) Dandang diisi dengan akuades
 - b) Bunga cengkeh yang sudah dipilih dimasukkan ke dalam dandang yang dibawahnya sudah diisi akuades
 - c) Alat destilasi dirangkai
 - d) Dandang dididihkan diatas kompor listrik pada suhu 100°C selama 6 jam

- e) Destilat yang keluar ditampung dalam tabung, destilat tersebut terdiri dari 2 lapisan yaitu air dan minyak atsiri
 - f) Air dan minyak atsiri dipisahkan dengan menggunakan corong pisah
 - g) Minyak atsiri ditutup rapat dan disimpan ditempat yang tidak terkena sinar matahari atau disimpan dalam almari es
- k. Peremajaan jamur *Aspergillus flavus*
- 1) Media SDA yang sudah *di autoclave* dituang ke dalam tabung reaksi yang telah disterilkan, kemudian diposisikan miring
 - 2) Media ditunggu hingga memadat
 - 3) Koloni jamur *Aspergillus flavus* diambil satu ose kemudian diinokulasi ke dalam media SDA tabung dengan cara digoreskan
 - 4) Media disimpan dalam *box container* pada suhu ruang selama 24 jam
- l. Pembuatan suspensi jamur *Aspergillus flavus*
- 1) Koloni jamur dari media subkultur peremajaan jamur berusia 24 jam diambil 1 ujung ose dan disuspensikan ke dalam NaCl fisiologis 10 ml sampai kekeruhannya sama dengan standar kekeruhan *Mc Farland* 0,5
 - 2) Tabung kekeruhan *Mc Farland* dan tabung suspensi jamur diletakkan secara berhimpitan kemudian dibandingkan kekeruhannya dengan latar belakang hitam. Apabila kurang keruh, tambahkan koloni jamur dari media subkultur

m. Pembuatan variasi konsentrasi minyak atsiri bunga cengkeh

- 1) Tabung reaksi dan rak disiapkan untuk pengenceran minyak atsiri bunga cengkeh
- 2) Minyak atsiri bunga cengkeh 91% diencerkan menjadi konsentrasi 0,5%, 1,0%, 1,5% dan 2,0% menggunakan rumus pengenceran sehingga diperoleh volume minyak atsiri bunga cengkeh dan CMC 1% pada masing-masing konsentrasi yang disajikan dalam Tabel 1.

Tabel 1. Konsentrasi Minyak Atsiri Bunga Cengkeh

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

- 3) CMC 1% dipipet menggunakan pipet ukur kemudian volumenya dikurangi menggunakan mikropipet sesuai dengan volume pada masing-masing konsentrasi yang dibuat (tertera pada Tabel 1)
- 4) Minyak atsiri juga dipipet menggunakan mikropipet sesuai dengan volume pada masing-masing konsentrasi yang dibuat (tertera pada Tabel 1)
- 5) Kedua larutan dihomogenkan

2. Tahap Pelaksanaan

- a. Media SDA yang telah diautoclave diletakkan pada suhu ruang hingga suhu sekitar 45–50°C
- b. Media SDA hangat dituangkan ke dalam cawan petri *disposable* sebanyak 20 ml dengan ketebalan kurang lebih 4 mm

- c. Suspensi jamur *Aspergillus flavus* yang telah diremajakan ditambahkan pada media sebanyak 1 ml
 - d. Media dicampur hingga homogen dengan menggoyangkan media membentuk angka 8 dan ditunggu hingga memadat
 - e. Cakram kertas direndam hingga jenuh selama 5 menit ke dalam minyak atsiri dengan konsentrasi masing-masing 0,5%, 1,0%, 1,5% dan 2,0% kemudian ditiriskan dan diletakkan di atas media yang sudah diinokulasi jamur
 - f. Cakram kertas juga direndam hingga jenuh selama 5 menit pada larutan ketokonazol 1% sebagai kontrol positif dan larutan CMC 1% sebagai kontrol negatif kemudian ditiriskan dan diletakkan di atas media yang sudah diinokulasi jamur
 - g. Media yang telah diberi cakram kertas minyak atsiri dan larutan kontrol dibungkus dengan kertas dan plastik
 - h. Media disimpan dalam *box container* pada suhu ruang selama 24 jam
 - i. Lakukan pengamatan terhadap diameter zona hambat
3. Tahap pengamatan

Pengamatan dan pengambilan data dilakukan dengan mengukur diameter zona hambat jamur *Aspergillus flavus*, dengan cara:

- a. Pengamatan hasil menggunakan kertas berwarna gelap sebagai latar belakang kemudian mengukur diameter zona hambat jamur *Aspergillus sp* pada media menggunakan jangka sorong

- b. Diameter zona hambat yang diukur yaitu daerah jernih di sekitar cakram kertas, diukur dari ujung yang satu ke ujung yang lain melalui diameter cakram. Hasilnya dicatat dengan satuan millimeter (mm)
- c. Diameter zona hambat jamur pada masing-masing cawan petri diukur, baik pada kelompok eksperimen maupun kelompok kontrol

I. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

Penelitian ini menggunakan data primer yaitu hasil pemeriksaan yang dilakukan sendiri oleh peneliti. Data didapatkan dari hasil pengukuran diameter zona hambat pertumbuhan jamur *Aspergillus flavus* pada masing-masing cawan petri dengan berbagai variasi konsentrasi minyak atsiri bunga cengkeh dan pada kelompok pembanding yaitu kontrol positif dan kontrol negatif yang seluruhnya berjumlah 48 data.

J. Manajemen Data

Data yang terkumpul pada penelitian ini kemudian akan dianalisis menggunakan teknik analisis deskriptif, analisis analitik dan analisis statistik. Analisis deskriptif digunakan untuk menggambarkan data hasil pengamatan yang telah dilakukan. Analisis statistik digunakan untuk mengeneralisasikan data sampel terhadap populasi.

1. Penyajian Data

Pengolahan data dilakukan setelah data terkumpul secara keseluruhan. Data yang telah diperoleh akan disajikan dalam tabel data primer.

2. Analisis Deskriptif

Data yang diperoleh disajikan dalam bentuk diagram batang kemudian dianalisis secara deskriptif untuk menggambarkan rerata hasil pengukuran diameter zona hambat pertumbuhan jamur yang terbentuk pada media SDA setelah pemberian berbagai variasi konsentrasi minyak atsiri bunga cengkeh.

3. Analisis Analitik

Analisis analitik dilakukan untuk mengetahui kekuatan daya antifungi pada berbagai variasi konsentrasi minyak atsiri bunga cengkeh berdasarkan rerata hasil pengukuran diameter zona hambat jamur yang terbentuk pada media SDA. Penggolongan kriteria kekuatan antifungi menurut Davis dan Stout ditunjukkan pada Tabel 2.

Tabel 2. Kriteria Kekuatan Daya Antifungi terhadap Diameter Zona Hambat

Diameter Zona Hambat	Kekuatan Daya Antifungi
< 5 mm	Lemah
5 – 10 mm	Sedang
10 – 20 mm	Kuat
> 20 mm	Sangat Kuat

Sumber: Maulana, dkk., 2018.

4. Analisis Statistik

Analisis statistik pada penelitian ini menggunakan program SPSS 16.0 *for windows*. Analisis data dapat dilakukan menggunakan uji *One Way Anova* atau uji *Kruskall Wallis*. Syarat menggunakan uji *One Way Anova* yaitu harus melakukan uji normalitas dan uji homogenitas terlebih dahulu. Apabila salah satu syarat tersebut tidak terpenuhi maka tidak bisa

dilakukan uji *One Way Anova* melainkan harus menggunakan uji non parametrik *Kruskall Wallis*.

a. Uji normalitas data

Data hasil pengukuran terhadap diameter zona hambat jamur dilakukan uji normalitas data menggunakan *Saphiro-Wilk* dikarenakan jumlah sampel < 50 . Uji ini dilakukan untuk mengetahui sebaran data apakah berdistribusi normal atau tidak. Data berdistribusi normal (H_0 diterima) apabila nilai probabilitas (p) atau nilai signifikan (*Sig.*) $\geq 0,05$.

H_0 = data berdistribusi normal

H_a = data berdistribusi tidak normal

b. Uji homogenitas

Uji homogenitas dilakukan untuk menguji apakah setiap kelompok perlakuan mempunyai data yang homogen atau tidak. Data dikatakan homogen (H_0 diterima) apabila nilai probabilitas (p) atau nilai signifikan (*Sig.*) $> 0,05$.

H_0 = data homogen

H_a = data tidak homogen

Apabila kedua syarat terpenuhi yaitu hasil uji normalitas data berdistribusi normal dan uji homogenitas menunjukkan data homogen, maka dilanjutkan uji *One Way Anova*.

c. Uji *One Way Anova*

Uji *One Way Anova* dilakukan untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan rerata diameter zona hambat yang terbentuk pada berbagai konsentrasi minyak atsiri bunga cengkeh. Hipotesis dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

H_0 = tidak ada perbedaan rerata diameter zona hambat pada berbagai konsentrasi minyak atsiri bunga cengkeh

H_a = ada perbedaan rerata diameter zona hambat pada berbagai konsentrasi minyak atsiri bunga cengkeh

Dasar pengambilan keputusan berdasarkan penarikan kesimpulan dengan melihat *Sig* untuk mengetahui apakah uji *One Way Anova* diterima atau ditolak. Jika nilai $Sig < 0,05$ maka H_0 ditolak, dan apabila $Sig \geq 0,05$ maka H_0 diterima (Sugiyono, 2013).

d. Uji *post hoc* LSD

Data yang telah dilakukan uji *One Way Anova* kemudian dilakukan uji *post hoc* LSD untuk mengetahui besarnya signifikansi perbedaan rerata diameter zona hambat yang terbentuk antar konsentrasi perlakuan. Data signifikan apabila nilai $Sig < 0,05$.

e. Uji Regresi

Data yang telah diuji *post hoc* LSD selanjutnya dilakukan uji regresi. Uji regresi dilakukan untuk mengetahui besarnya persentase pengaruh berbagai konsentrasi minyak atsiri bunga cengkeh terhadap diameter zona hambat yang terbentuk dan faktor lain yang mempengaruhinya.

K. Etika Penelitian

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

Penelitian ini mengajukan permohonan kaji etik dan telah mendapatkan persetujuan dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Poltekkes Kemenkes Yogyakarta yang menyatakan bahwa penelitian ini memenuhi prinsip etis yang tertera pada Surat Persetujuan Komisi Etik dengan No. LB.01.01/KE-01/XLV/907/2018 tertanggal 26 Desember 2018 yang tertera pada Lampiran 2. Berdasarkan persetujuan dari Komisi Etik tersebut, maka penelitian ini dapat dilaksanakan.