



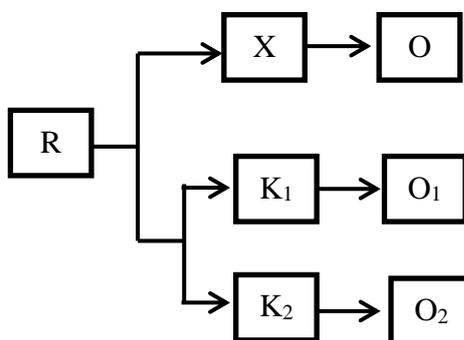
## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Jenis dan Desain Penelitian**

Penelitian ini merupakan eksperimental murni laboratorium karena peneliti dapat melakukan modifikasi subyek penelitian, seperti mengontrol, melakukan observasi dan memanipulasi subyek penelitian (Sugiyono, 2013).

Desain penelitian yang digunakan adalah *Post Test Only with Control Group Design*. Ada dua kelompok yang dipilih secara acak dan dianggap homogen sebelum diberikan perlakuan, dan tidak dilakukan pengukuran awal. Kelompok pertama adalah kelompok yang diberikan perlakuan kemudian dilakukan pengukuran dan merupakan kelompok eksperimen. Sedangkan kelompok dua adalah kelompok pembanding atau kontrol, kelompok ini digunakan sebagai pembanding dan tidak diberikan perlakuan, tetapi hanya dilakukan pengukuran. Hasil perbandingan dari kedua kelompok tersebut merupakan efek dari perlakuan yang diberikan (Notoatmodjo, 2010).



Gambar 9. Desain Penelitian

Sumber : Sugiyono, 2013.

Keterangan :

- R :Randomisasi
- X :Penggunaan variasi konsentrasi minyak atsiri kayu manis 0,5 %, 1,0 %, 1,5 %, 2,0 % sebagai zat antifungi.
- K<sub>1</sub> :Penggunaan ketokonazol dengan konsentrasi 1% sebagai kontrol positif.
- K<sub>2</sub> :Penggunaan CMC 1% sebagai kontrol negatif.
- O :Pengukuran diameter zona hambat jamur *Candida albicans* pada media SDA yang diberi minyak atsiri dalam berbagai konsentrasi.
- O<sub>1</sub> :Pengukuran diameter zona hambat pada media SDA yang diberi kontrol positif dengan ketokonazol 1%.
- O<sub>2</sub> :Pengukuran diameter zona hambat pada media SDA yang diberi CMC 1% sebagai kontrol negatif.

Menurut Hanafiah 2014, rumus untuk menentukan pengulangan adalah sebagai berikut :

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

t : Jumlah kelompok perlakuan

r : Jumlah replikasi yang dilakukan

Jumlah pengulangan pada penelitian ini diperoleh berdasarkan hasil perhitungan dengan rumus Federer diatas, sebagai berikut :

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

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

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

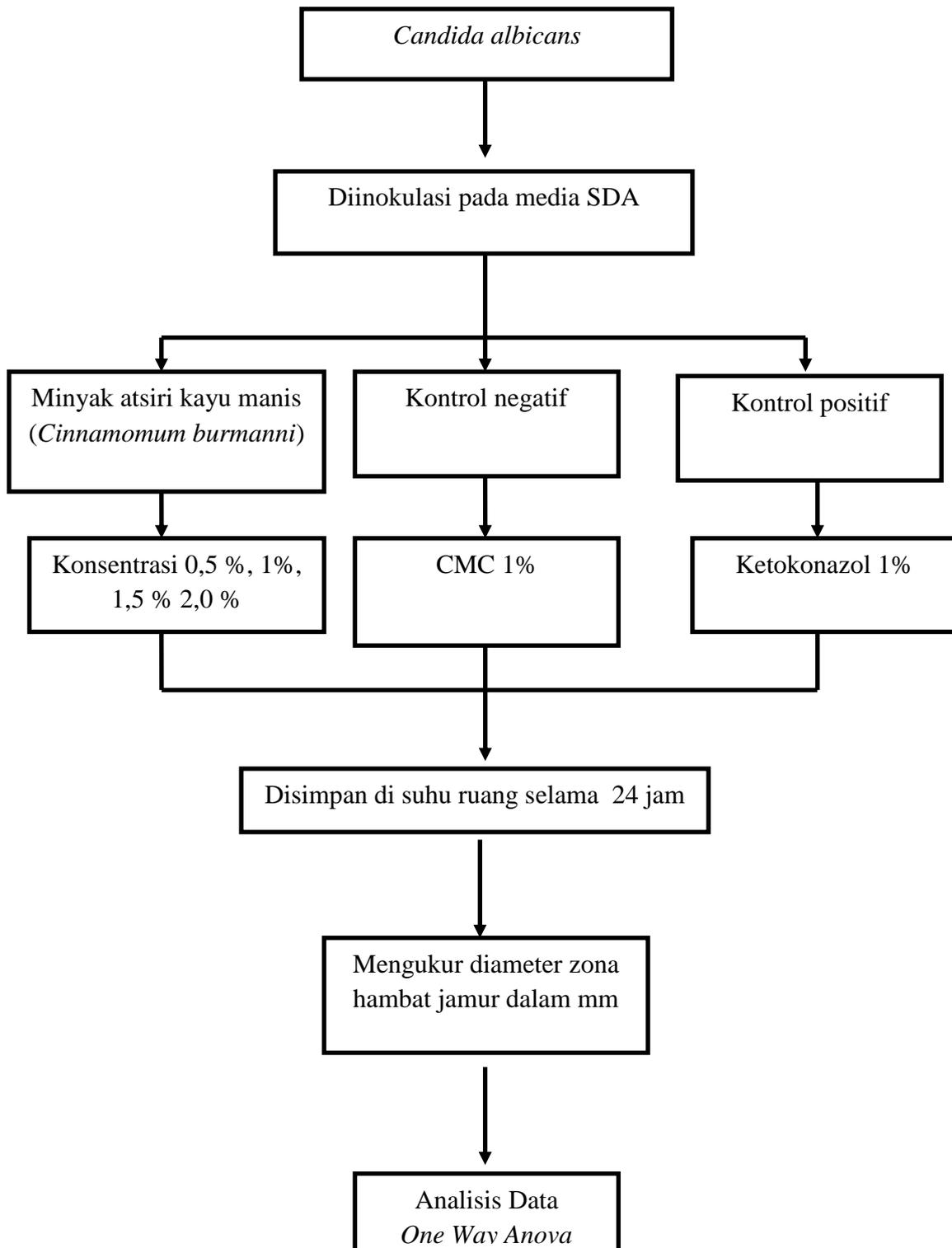
$$3r - 3 \geq 15$$

$$3r \geq 18$$

$$r \geq 6$$

Berdasarkan perhitungan pengulangan tersebut, diperoleh jumlah pengulangan minimal sebanyak enam kali. Pada penelitian ini, peneliti melakukan pengulangan sebanyak delapan kali.

## B. Rancangan Percobaan



Gambar 10. Rancangan Percobaan

### **C. Subyek dan Obyek Penelitian**

#### 1. Subyek Penelitian

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

#### 2. Obyek Penelitian

Obyek penelitian ini adalah minyak atsiri kayu manis (*Cinnamomum burmanni*) dengan konsentrasi 0,5 %, 1,0 %, 1,5 %, dan 2,0 %.

### **D. Tempat dan Waktu Penelitian**

#### 1. Tempat Penelitian

- a. Pembuatan minyak atsiri kayu manis dengan metode destilasi uap dan air dilakukan oleh PT Eksotik Aromatika Yogyakarta.
- b. Uji kadar minyak atsiri kayu manis dilakukan di LPPT Universitas Gadjah Mada.
- c. Uji determinasi bahan kayu manis dilakukan di Laboratorium Departemen Biologi Farmasi Unit II Universitas Gadjah Mada.
- d. Uji potensi antifungi minyak atsiri kayu manis dilakukan di Laboratorium Mikologi Poltekkes Kemenkes Yogyakarta Jurusan Analisis Kesehatan.

#### 2. Waktu Penelitian

Penelitian Potensi Minyak Atsiri Kayu Manis (*Cinnamomum burmanni*) sebagai Antifungi terhadap Jamur *Candida albicans* ini dilakukan pada bulan Desember 2018.

## **E. Variabel Penelitian**

### 1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah berbagai konsentrasi minyak atsiri kayu manis.

### 2. Variabel Terikat

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

### 3. Variabel Pengganggu

- 1) Kontaminan
- 2) Ketebalan media
- 3) Kepadatan koloni jamur
- 4) Suhu dan kelembapan.

## **F. Definisi Operasional Variabel Penelitian**

1. Variasi konsentrasi minyak atsiri kayu manis yang dihasilkan dari proses destilasi uap air memiliki konsentrasi 62% kemudian dibuat pengenceran dalam konsentrasi 0,5%, 1,0%, 1,5%, dan 2,0% dalam satuan % dan skala variabel rasio.
2. Diameter zona hambat adalah daerah yang tidak memperlihatkan adanya pertumbuhan jamur *Candida albicans* yang dapat diukur dengan jangka sorong dalam satuan mm dan skala variabel rasio.
3. Kontaminan adalah jamur dan bakteri selain *Candida albicans* yang dapat tumbuh pada media padat yang telah berisi berbagai konsentrasi minyak atsiri kayu manis sehingga dapat mempengaruhi hasil.

Pengendaliannya adalah dengan metode *aseptic* serta sterilisasi alat dan bahan.

4. Ketebalan media adalah tebalnya media SDA yang digunakan untuk menumbuhkan jamur *Candida albicans*. Dikendalikan dengan dengan menuang 20 ml SDA pada setiap cawan petri, sehingga volume media padat sama.
5. Kepadatan koloni jamur *Candida albicans* dikendalikan dengan membuat suspensi jamur sesuai dengan standar *Mc Farland* dan menuang 1 ml suspensi jamur pada setiap cawan petri.
6. Suhu merupakan derajat angka yang menunjukkan dingin atau panasnya suatu benda dan ruangan. Sedangkan kelembapan adalah konsentrasi uap air di udara. Suhu dan kelembapan ini digunakan untuk menginkubasi media yang telah ditanam jamur *Candida albicans*.

#### **G. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data**

Penelitian ini menggunakan data primer yaitu hasil pemeriksaan nyata yang dilakukan sendiri oleh peneliti. Data didapatkan dari pengukuran diameter zona hambat pertumbuhan jamur *Candida albicans* setelah diberi minyak atsiri kayu manis konsentrasi 0,5 %, 1 %, 1,5 %, 2 % dan pada kelompok pembanding yaitu kontrol positif dan kontrol negatif yang masing – masing menggunakan 8 pengulangan. Sehingga keseluruhan data yang diperoleh berjumlah 48.

## H. Alat dan Bahan Penelitian

### 1. Alat

- a. Neraca analitik
- b. Labu erlenmeyer
- c. Cawan petri *disposable*
- d. Gelas kimia
- e. Labu ukur
- f. Ose steril
- g. Pipet ukur
- h. Pipet pasteur
- i. Mikropipet
- j. Kapas
- k. Lampu spritus
- l. Korek api
- m. Tabung rekasi dan rak
- n. Corong
- o. Jangka sorong
- p. Botol timbang
- q. *Autoclave*
- r. *Box container*

### 2. Bahan

- a. Minyak atsiri kayu manis
- b. Biakan jamur *Candida albicans*

- c. Media *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA), komposisi per liter :
  - 1) *Casein* ..... 10,0 gr
  - 2) *Peptone* .....10 ,0 gr
  - 3) *Glucose* .....40,0 gr
  - 4) *Agar* .....20,0 gr
- d. CMC (*Carboxymethyl cellulose*)
- e. Akuades
- f. *Blank disc* (kertas cakram steril)

## 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 untuk pemeriksaan disterilkan dengan cara mencuci alat kemudian dibungkus kertas dan dimasukkan ke dalam oven selama 8 jam suhu 110 ° C.
  - c. Sterilisasi Akuades

Akuades dimasukan 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 2,125 gram

- 3) NaCl yang telah ditimbang, dilarutkan ke dalam 250 ml akuades.
  - 4) pH larutan diatur menjadi 7,0 setelah dilarutkan.
  - 5) Larutan NaCl disterilkan dengan *autoclave* 121 °C selama 15 menit.
  - 6) NaCl dimasukkan kedalam beberapa tabung reaksi untuk membuat suspensi jamur *Candida albicans*.
- e. Pembuatan Media *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA)
- 1) Alat dan bahan yang akan digunakan, disiapkan.
  - 2) Serbuk SDA sebanyak 13 gram ditimbang.
  - 3) Serbuk SDA yang sudah ditimbang dilarutkan ke dalam 20 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 yang akan digunakan, disiapkan.
  - 2) Larutan BaSO<sub>4</sub> 1% dibuat dengan cara menimbang serbuk BaSO<sub>4</sub> 1 gram dan melarutkannya dalam akuades 100 ml.
  - 3) Larutan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1% dibuat dengan cara memipet H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 96% sebanyak 1,04 ml dan melarutkannya dalam akuades 100 ml.
  - 4) Kekeruhan *Mc Farland* dibuat dengan mencampurkan 0,5 ml larutan BaSO<sub>4</sub> 1% dengan 9,5 ml larutan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1%, homogenkan.

- 5) Standar kekeruhan *Mc Farland* harus dihomogenkan terlebih dahulu, sebelum digunakan.
- g. Pembuatan *Carboxymethyl Cellulose* (CMC) 1%
- 1) Alat dan bahan yang akan digunakan, disiapkan.
  - 2) Serbuk CMC ditimbang sebanyak 1 gram.
  - 3) Serbuk CMC yang telah ditimbang, dilarutkan dengan akuades hangat sebanyak 100 ml ke dalam labu erlenmeyer.
  - 4) Larutan dihomogenkan dalam kondisi hangat.
- h. Pembuatan Minyak Atsiri kayu manis dilakukan oleh PT Eksotika Aromatika Yogyakarta
- 1) Alat dan bahan yang akan digunakan, disiapkan.
  - 2) Akuades dimasukkan di bagian bawah dandang hingga 1/3 bagian dandang.
  - 3) Kayu manis dimasukkan ke dalam dandang.
  - 4) Alat destilasi dirangkai.
  - 5) Dandang 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.

i. Pembuatan Konsentrasi Bertingkat Minyak Atsiri Kayu manis

1) Tabung reaksi kecil dan rak disiapkan untuk pengenceran minyak atsiri.

2) Minyak atsiri kayu manis 62% diencerkan menjadi 0,5%, 1,0%, 1,5% dan 2,0%, dengan cara memipet minyak atsiri kayu manis dan CMC 1% dengan volume berbeda-beda pada masing – masing konsentrasi, kemudian dihomogenkan.

Berikut adalah formulasi campuran minyak atsiri kayu manis dengan CMC 1% :

Tabel 2 . Konsentrasi Minyak Atsiri Kayu Manis

Konsentrasi (%)	Minyak Atsiri Kayu Manis (µL)	CMC 1% (µL)
0,5	25	2975
1,0	50	2950
1,5	75	2922
2,0	100	2900

Sumber : Data Primer, 2018.

j. Pembuatan kontrol positif ketokonazol 1 %

1) Ketokonazol tablet ditumbuk (digerus) hingga halus, kemudian ditimbang sebanyak 500 mg menggunakan neraca analitik.

2) Ketokonazol yang sudah ditimbang dilarutkan dengan 50 ml CMC 1 %, kemudian dihomogenkan.

k. Peremajaan jamur

1) Alat dan bahan yang akan digunakan, disiapkan.

2) Media SDA dituangkan kedalam 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 sudah diinokulasi jamur *Candida albicans* disimpan selama 24 jam dalam suhu ruang
1. Pembuatan Suspensi Jamur *Candida albicans*
    - 1) Alat dan bahan yang akan digunakan, disiapkan.
    - 2) Koloni jamur dari hasil peremajaan diambil 1 ujung ose dan disuspensikan ke dalam larutan NaCl fisiologis yang telah dibagi kedalam beberapa tabung reaksi sampai kekeruhannya sama dengan standar *Mc Farland*.
    - 3) Koloni jamur yang telah dibuat suspensi dibandingkan dengan tabung reaksi yang berisi kekeruhan *Mc Farland* dengan latar belakang putih atau gelap. Apabila kurang keruh tambahkan koloni jamur.
  2. Tahap Pelaksanaan
    - a. Uji potensi antifungi
      - 1) Media SDA yang telah di sterilisasi diletakkan pada suhu kamar hingga suhunya menurun sekitar 45–50 °C.
      - 2) Media SDA yang telah disterilkan dituangkan kedalam cawan petri *disposable* sebanyak 20 ml.

- 3) Jamur *Candida albicans* 1 ml yang telah disuspensikan dalam larutan NaCl fisiologis sesuai standar *Mc Farland*, dituangkan ke dalam cawan petri yang sama.
  - 4) Kedua larutan dihomogenkan dengan menggoyang – goyangkan cawan petri membentuk angka 8, tunggu hingga media memadat.
  - 5) Kertas cakram direndam hingga jenuh ke dalam minyak atsiri dengan konsentrasi masing – masing 0,5 %, 1,0 %, 1,5 % dan 2,0 % selama kurang lebih 5 menit, ditiriskan kemudian diletakkan di atas media yang telah diinokulasikan jamur.
  - 6) Kertas cakram juga direndam hingga jenuh pada kontrol positif dan kontrol negatif selama kurang lebih 5 menit, ditiriskan, kemudian diletakkan di atas media yang telah diinokulasikan jamur.
  - 7) Cawan petri ditutup rapat – rapat, kemudian dibungkus dengan kertas dan plastik.
  - 8) Cawan petri yang sudah dibungkus disimpan di *box container* selama 24 jam.
- b. Tahap pengamatan
- 1) Cawan petri dari tempat penyimpanan.
  - 2) Pembacaan hasil dan pengukuran dilakukan dengan menggunakan latar belakang gelap.

- 3) Zona hambat jamur *Candida albicans* diukur dengan menggunakan jangka sorong .
- 4) Diameter zona hambat yang diukur yaitu daerah jernih disekitar cakram (tidak ada pertumbuhan jamur), diukur dari ujung hingga ke ujung lainnya. Hasilnya dicatat dengan satuan mm.

## **J. Manajemen Data**

Data yang terkumpul kemudian dianalisis menggunakan teknik analisis deskriptif, dan analisis statistik. Analisis deksriptif dilakukan terhadap semua data yang diperoleh secara keseluruhan, dan selanjutnya disajikan dalam bentuk tabel. Analisis statistik digunakan untuk menggeneralisasikan data sampel terhadap populasi.

### **1. Penyajian Data**

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

### **2. Analisis Deskriptif**

Data yang diperoleh disajikan dalam bentuk diagram batang dan dianalisis secara deskriptif untuk menggambarkan perbedaan hasil pengukuran diameter zona hambat pertumbuhan jamur yang terbentuk setelah pemberian minyak atsiri dengan berbagai konsentrasi. Analisis

deskriptif dilakukan terhadap semua data yang diperoleh secara keseluruhan.

### 3. Analisis Analitik

Analisis analitik dilakukan untuk mengetahui kriteria kekuatan potensi minyak atsiri kayu manis dengan variasi konsentrasi 0,5 %, 1,0 %, 1,5 %, 2,0 % terhadap diameter zona hambat yang dihasilkan. Pengelompokan kriteria kekuatan antifungi oleh Davis and Stout terhadap diameter zona hambat yang dihasilkan ditunjukkan pada tabel berikut ini :

Tabel 3. Kriteria Kekuatan Antifungi terhadap Diameter Zona Hambat

Diameter Zona Hambat	Kriteria kekuatan
< 5 mm	Lemah
5 – 10 mm	Sedang
10 – 20 mm	Kuat
>20 m	Sangat kuat

Sumber : Davis dan Stout( 1971) dalam Ernawati dan Hasmila (2015).

### 4. Analisis Statistik

Analisis Statistik dilakukan dengan menggunakan program SPSS 16.0 *for windows*. Analisis data dapat dilakukan dengan menggunakan uji *One Way Anova*. Uji *One Way Anova* digunakan apabila data berdistribusi normal dan data homogen, sehingga perlu dilakukan uji distribusi dan uji homogenitas terlebih dahulu.

#### 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  $\leq 50$ . Uji ini bertujuan untuk mengetahui normal atau tidaknya distribusi data.  $H_0$  diterima apabila asymp. sig.  $\geq 0,05$ .

$H_0$  : data berdistribusi normal

$H_a$  : data tidak berdistribusi normal

b. Uji homogenitas

Data yang telah dilakukan uji distribusi data dan diketahui nilai asymp. Sig  $\geq 0,05$  selanjutnya dilakukan uji homogenitas. Uji ini dilakukan untuk mengetahui homogen atau tidaknya kumpulan data yang tersebar.  $H_0$  diterima apabila sig  $> 0,05$ .

$H_0$  : data homogen

$H_a$  : data tidak homogen

c. Uji *One Way Anova*

Data yang telah diuji homogenitas dan diketahui memiliki nilai sig.  $> 0,05$  atau data homogen selanjutnya diuji *one way anova*. Uji ini dilakukan untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan rerata pada kelompok perlakuan.  $H_0$  diterima apabila sig.  $> 0,05$ .

d. Uji *post hoc* LSD

Data yang telah dilakukan uji beda (*Anova*) selanjutnya dilakukan uji *Least Significance Different* (LSD) untuk mengetahui signifikansi perbedaan rerata zona hambat yang terbentuk antar kelompok perlakuan. Data signifikan apabila nilai sig.  $< 0,05$ .

## **K. Etika Penelitian**

Penelitian ini memiliki risiko bagi peneliti, namun risiko – risiko tersebut dapat diatasi dengan pemakaian 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 yang dilakukan juga telah mendapatkan pembebasan persetujuan etik (*exempted*) **No. LB.01.01/KE-01/XLV/909/2018** dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan Poltekkes Kemenkes Yogyakarta. Persetujuan diperoleh setelah peneliti mengirimkan berkas dan proposal skripsi kepada Komisi Etik.