

BAB III METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

Jenis dan desain penelitian ini eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Terdapat dua variabel yang digunakan yaitu variabel independent/bebas yaitu kontrol positif, kontrol negatif dan ekstrak daun mint (*Mentha piperita*) dengan konsentrasi 60%, 70%, 80%, 90% dan variabel dependent/terikat yaitu pertumbuhan jamur *Candida albicans*. Pemeriksaan ini menggunakan metode difusi cakram *Kirby Bauer* dengan melihat zona hambat yang terbentuk. Kontrol positif yang digunakan dalam penelitian ini adalah ketokonazol dan untuk kontrol negatif menggunakan aquadest steril. Pengulangan dilakukan sebanyak 4 kali yang didapat dari perhitungan menggunakan rumus Freederer yaitu $(t-1)(n-1) \geq 15$.

Keterangan :

t = Perlakuan

n = Pengulangan

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

Proses ekstraksi daun mint (*Mentha piperita*) dilakukan di Laboratorium Terpadu Fakultas MIPA Universitas Lampung. Pembuatan media Saboraud Dextrose Agar (SDA) dan pemeriksaan uji daya hambat ekstrak daun mint (*Mentha piperita*) terhadap jamur *Candida albicans* dilakukan di Laboratorium Parasitologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang pada bulan April - Mei 2024.

C. Subjek Penelitian

Subjek penelitian ini adalah daun mint (*Mentha piperita*) yang diambil di Desa Sekincau Kecamatan Sekincau Lampung Barat. Daun mint (*Mentha piperita*) yang digunakan berupa daun segar berwarna hijau yang memiliki karakteristik aroma mint dan rasa pedas seperti menthol (Arina et al., 2023). *Mentha piperita* dijadikan ekstrak dengan pelarut etanol 96%, kemudian diencerkan dengan konsentrasi 60%, 70%, 80%, 90% yang digunakan sebagai larutan uji dalam menghambat pertumbuhan jamur *Candida albicans*.

D. Variabel dan Definisi Operasional Penelitian

Tabel 3.1 Variabel dan Definisi Operasional Penelitian

No.	Variabel	Definisi	Cara Ukur	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala
1.	Variabel bebas : Ekstrak daun mint (<i>Mentha piperita</i>)	Daun mint (<i>Mentha piperita</i>) yang di ekstraksi menggunakan pelarut etanol 96% lalu ekstrak hasil maserasi diencerkan 60%, 70%, 80%, 90%	Ekstrak diencerkan dengan rumus $V_1 \times \%_1 = V_2 \times \%_2$	Pipet Ukur	Ekstrak daun mint (<i>Mentha piperita</i>) konsentrasi 60%, 70%, 80%, 90%	Interval
	Kontrol positif ketokonazol	Obat antijamur ketokonazol dengan dosis 200 mg	Mengukur diameter zona hambat dengan metode difusi cakram <i>Kirby Bauer</i>	Jangka sorong	mm	Rasio
	Kontrol negatif	Aquadest steril		Jangka sorong	mm	Rasio
2.	Variabel terikat : Pertumbuhan jamur <i>Candida albicans</i>	Pertumbuhan jamur <i>Candida albicans</i> yang dihambat oleh ekstrak daun mint (<i>Mentha piperita</i>)	Mengukur diameter zona hambat yang terbentuk dengan metode difusi <i>Kirby Bauer</i>	Jangka sorong	Diameter zona hambat dalam kategori : 1. <10 mm daya hambat lemah. 2. 10-15 mm daya hambat sedang. 3. 16-20 mm daya hambat kuat. 4. >20 daya hambat sangat kuat. (Yusran & Muhasbir, 2018).	Ordinal

E. Pengumpulan Data

1. Prosedur Penelitian

- a) Pengajuan permohonan izin dari Direktur Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang untuk dilakukan determinasi, pembuatan ekstrak daun mint (*Mentha piperita*) di Laboratorium Botani Jurusan Biologi Fakultas

MIPA Universitas Lampung serta pembelian strain jamur dari Balai Laboratorium Kesehatan Provinsi Lampung.

- b) Penyiapan bahan dan alat penelitian seperti strain jamur *Candida albicans*, media SDA, disk kosong dan daun mint (*Mentha piperita*).
 - c) Determinasi bahan uji daun mint (*Mentha piperita*) pada Laboratorium Fakultas MIPA Universitas Lampung.
 - d) Pembuatan simplisia daun mint (*Mentha piperita*).
 - e) Ekstraksi simplisia daun mint (*Mentha piperita*) di Laboratorium Fakultas MIPA Universitas Lampung.
 - f) Pengenceran larutan uji menjadi konsentrasi 60%, 70%, 80%, 90% dilakukan di Laboratorium Parasitologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang.
 - g) Pembuatan suspensi jamur *Candida albicans*.
 - h) Pengujian ekstrak daun mint (*Mentha piperita*) terhadap pertumbuhan jamur *Candida albicans* dan pengamatan zona hambat yang terbentuk pada masing – masing konsentrasi dan diukur dengan jangka sorong dalam satuan mm dilakukan di Laboratorium Parasitologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang.
2. Metode Pemeriksaan

Difusi cakram dengan cara *Kirby Bauer*.
 3. Prinsip Pemeriksaan

Cakram kertas yang mengandung sejumlah obat tertentu diletakkan diatas permukaan media padat yang telah diinokulasikan pada permukaan organisme uji. Setelah diinkubasi, diameter zona hambat sekitar cakram diukur sebagai ukuran kekuatan daya hambat obat melawan organisme uji tertentu (Jawetz dkk, 2008).
 4. Prosedur kerja
 - a. Persiapan alat dan bahan pemeriksaan.
 - 1) Alat : cawan petri, gelas ukur 100 ml, Erlenmeyer 100 ml, neraca analitik, inkubator, autoklaf, pipet ukur, karet penghisap, disk cakram steril, pinset, lidi kapas steril, kapas, botol gelap, kertas kopi, alumunium foil, hotplate, gelas objek, mixer vortex, thermometer,

waterbath, korek api, oven, evaporator, corong gelas, tabung reaksi, lampu spirtus, ose dan jangka sorong.

2) Bahan : aquadest steril, NaCl 0,9%, standar Mc. Farland 0,5, kloramfenikol, ketokonazol, daun mint (*Mentha piperita*) media *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA), dan strain jamur *Candida albicans* didapat dari Balai Laboratorium Kesehatan Provinsi Lampung.

b. Determinasi bahan uji tumbuhan daun mint (*Mentha piperita*) dilakukan untuk memastikan tumbuhan yang akan digunakan jelas. Bahan uji daun mint (*Mentha piperita*) di determinasi di Laboratorium Botani Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Lampung.

c. Pengujian ekstrak daun mint (*Mentha piperita*) terhadap pertumbuhan jamur *Candida albicans* dengan prosedur kerja sebagai berikut:

1) Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat gelas yang digunakan dalam penelitian ini dibersihkan dan dikeringkan terlebih dahulu, kemudian dibungkus menggunakan kertas kopi. Lalu disterilkan menggunakan oven pada suhu 160 °C selama 60 menit. Seluruh media, lidi kapas disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm (Soemarno, 2000).

2) Pembuatan Larutan Kloramfenikol

Setiap 1000 ml media *Saboroud Dextrose Agar* (SDA) memerlukan 400 mg kloramfenikol. Setiap 250 mg kloramfenikol dilarutkan dalam 10 ml NaCl 0,9% dengan perhitungan

$$\frac{400 \text{ mg}}{250 \text{ mg}} \times 10 \text{ ml} = 16 \text{ ml}$$

, sehingga untuk melarutkan 400 mg kloramfenikol diperlukan NaCl 0,9% sebanyak 16 ml (Soemarno, 2000).

3) Pembuatan Larutan Standar Mc. Farland 0,5

Dicampurkan 9,95 ml larutan asam sulfat (H₂SO₄) 1% dengan 0,05 ml larutan *Barium chloride dihydrate* (BaCl₂ 2H₂O) 1% sehingga menjadi 10 ml, dikocok hingga homogen. Larutan harus dikocok tiap akan digunakan untuk membandingkan dengan suspensi jamur (Soemarno, 2000).

4) Pembuatan NaCl 0,9%

Ditimbang 0,9 gram NaCl lalu dilarutkan dalam 100 ml aquadest steril, kemudian dihomogenkan.

5) Pembuatan Media Agar dari *Saboraud Dextrose Agar* (SDA)

Pembuatan media dilakukan berdasarkan petunjuk pembuatan pada botol media yaitu 65 gram serbuk media *Saboraud Dextrose Agar* (SDA) dalam 1000 ml aquadest dikalikan dengan volume yang dibutuhkan. Lalu ditimbang, diaduk dan dipanaskan diatas hotplate sampai larut dengan sempurna. Kemudian, media disterilisasi di autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm. Kemudian, didinginkan sampai mencapai suhu 50°C, ditambahkan larutan kloramfenikol. Setelah itu, media dituang kedalam cawan petri yang telah disterilisasi dengan ketebalan \pm 4 mm dan dibiarkan mengeras (Soemarno, 2000).

6) Uji Sterilisasi Media

Media yang telah dibuat, diambil beberapa plate kemudian diinkubasi pada suhu 35-37 °C selama 3 hari. Apabila terdapat pertumbuhan 2 koloni per plate, maka dianggap tidak steril (Soemarno, 2000).

7) Identifikasi Jamur *Candida albicans*

a) Pemeriksaan Makroskopis

Ditanam jamur *Candida albicans* pada media SDA, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 3x24 jam lalu diamati koloni jamur *Candida albicans* yang tumbuh.

Interpretasi hasil :

Pada media SDA *Candida albicans* didapatkan koloni berwarna putih dengan permukaan licin, menonjol di sertai bau khas ragi (Siregar, 2004).

b) Pemeriksaan Mikroskopis

1) Diambil koloni jamur biakan media SDA yang telah ditanam sebelumnya, kemudian diletakkan pada permukaan objek glass,

dibuat preparat dan ditambah NaCl 0,85%, lalu dihomogenkan lalu difiksasi.

- 2) Diletakkan objek glass pada rak cat, kemudian dilakukan pengecatan gram. Ditetaskan Gram A didiamkan selama 1 menit, lalu dibilas dengan air mengalir. Ditetaskan Gram B didiamkan selama 1 menit, lalu dibilas dengan air mengalir. Ditetaskan Gram C didiamkan selama 30 detik, lalu dibilas dengan air mengalir. Ditetaskan Gram D didiamkan selama 1 menit, lalu dibilas dengan air mengalir.
- 3) Keringkan dan diamati dengan mikroskop perbesaran 40x dan 100x (Yusmuniar dkk, 2017).

Interpretasi hasil :

Pada pewarnaan Gram *Candida albicans* menyerap warna ungu bersifat Gram positif dan memiliki bentuk bulat lonjong (Siregar, 2004).

c) Pemeriksaan Germ Tube

- 1) Koloni *Candida albicans* dimasukkan kedalam tabung yang berisi 1 ml putih telur hangat. Kemudian dihomogenkan perlahan sehingga koloni *Candida* tercampur.
- 2) Kemudian tabung biakan ditutup dengan kapas lemak lalu inkubasi di suhu 37°C dengan waktu 2-3 jam.
- 3) Setelah diinkubasi di putih telur, diambil satu tetes diatas object glass kemudian tutup dengan cover glass.
- 4) Lalu diperiksa di mikroskop dengan perbesaran 100x (Mulyati & Jannah, 2019).

Interpretasi hasil :

Terlihat pertumbuhan hifa seperti kecambah yang berbentuk raket (Mulyati & Jannah, 2019).

8) Pembuatan Suspensi Jamur *Candida albicans*

Koloni jamur *Candida albicans* diambil 1 ujung ose dan disuspensikan ke dalam larutan NaCl 0,9% pada tabung reaksi, kemudian dihomogenkan dengan alat mixer vortex hingga

kekeruhannya sama dengan standar Mc. Farland 0,5. Koloni jamur yang telah dibuat suspensi dibandingkan dengan tabung reaksi yang berisi kekeruhan Mc. Farland (Carter dkk, 1990).

9) Pembuatan Larutan Kontrol Positif

Dihaluskan 200 mg obat ketokonazol lalu ditambahkan dengan 10 ml aquadest steril dan dihomogenkan. Kemudian rendam disk blank ke dalam larutan tersebut selama 15 menit (Alfiah, 2015).

10) Pembuatan Larutan Uji Ekstrak daun mint (*Mentha piperita*)

a) Identifikasi bahan uji daun mint (*Mentha piperita*) di Laboratorium Botani Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Lampung.

b) Pembuatan Simplisia

Sampel daun mint (*Mentha piperita*) sebanyak ± 3 kg diambil dalam kondisi yang segar dan berwarna hijau, kemudian dicuci dengan air mengalir dan ditiriskan. Daun mint (*Mentha piperita*) dikeringkan (pengeringan dilakukan secara tidak langsung menggunakan wadah yang ditutup dengan kain hitam atau gelap) hal ini dilakukan karena sinar ultra violet dari matahari dapat menimbulkan kerusakan pada kandungan kimia bahan yang dikeringkan (Manu, 2013). Simplisia yang telah kering dihaluskan dengan cara diblender, kemudian diayak agar didapatkan simplisia yang halus, lalu ditimbang 300 gram dan disimpan dalam wadah yang kering.

c) Pembuatan Ekstrak daun mint (*Mentha piperita*)

Simplisia yang telah dihaluskan sebanyak 300 gram dimasukkan kedalam wadah lalu ditambahkan etanol 96% sebanyak 2000 ml dan diaduk menggunakan batang pengaduk lalu didiamkan selama 3 hari. Ekstrak disaring menggunakan penyaring. Diperoleh filtrat I, ditampung didalam botol dan ampas I ditambah etanol 96% 2000 mL lagi, diaduk dengan batang pengaduk lalu di amkan selama tiga malam. Kemudian ekstrak disaring dengan kertas saring sehingga diperoleh filtrat II. Selanjutnya proses yang sama dilakukan hingga diperoleh filtrat

III. Seluruh filtrat yang diperoleh dari proses maserasi I, II, III digabung, disaring dan dipisahkan dengan Vacum Rotary Evaporator pada suhu 40°C hingga diperoleh ekstrak kental, kemudian dilakukan pengenceran ekstrak dengan konsentrasi 60%, 70%, 80%, 90% dari larutan induk menggunakan rumus pengenceran (Kausar, 2023).

$$V_1 \times \%1 = V_2 \times \%2$$

Keterangan :

V1 = Volume larutan uji yang dipipet (ml)

%1 = Konsentrasi larutan uji (100%)

V2 = volume larutan uji yang akan dibuat dengan aquadest steril

%2 = Konsentrasi yang akan dibuat (%)

11) Pelaksanaan Uji Daya Hambat

- a) Disiapkan media *Saboraud Dextrose Agar* (SDA) yang telah mengeras.
- b) Dichelupkan lidi kapas steril kedalam suspensi jamur *Candida albicans* yang telah dibandingkan kekeruhannya dengan standar Mc. Farland 0,5, ditunggu sebentar agar suspensi jamur *Candida albicans* meresap kedalam kapas, kemudian lidi kapas diangkat dan diperas di dalam dinding tabung dengan cara menekannya sambil diputar.
- c) Dipulaskan lidi kapas pada permukaan media *Saboraud Dextrose Agar* (SDA) sampai seluruh permukaan tertutup rapat dengan pulasan.
- d) Dibiarkan media *Saboraud Dextrose Agar* (SDA) diatas meja selama 15 menit agar suspensi jamur *Candida albicans* meresap kedalam media.
- e) Disk kosong direndam ekstrak daun mint (*Mentha piperita*) kontrol positif dan kontrol negatif masing masing 15 menit.
- f) Dilakukan penempelan disk diatas permukaan media *Saboraud Dextrose Agar* (SDA) menggunakan pinset dengan cara sedikit ditekan sehingga cakram menempel pada media dengan masing – masing berisi 2 cakram pada media dengan jarak antar cakram \pm 15 mm.
- g) Lempeng agar SDA diinkubasi pada suhu 25°C selama 3x24 jam (Jawetz dkk, 2008).
- h) Zona jernih yang terbentuk disekitar disk lalu diukur menggunakan

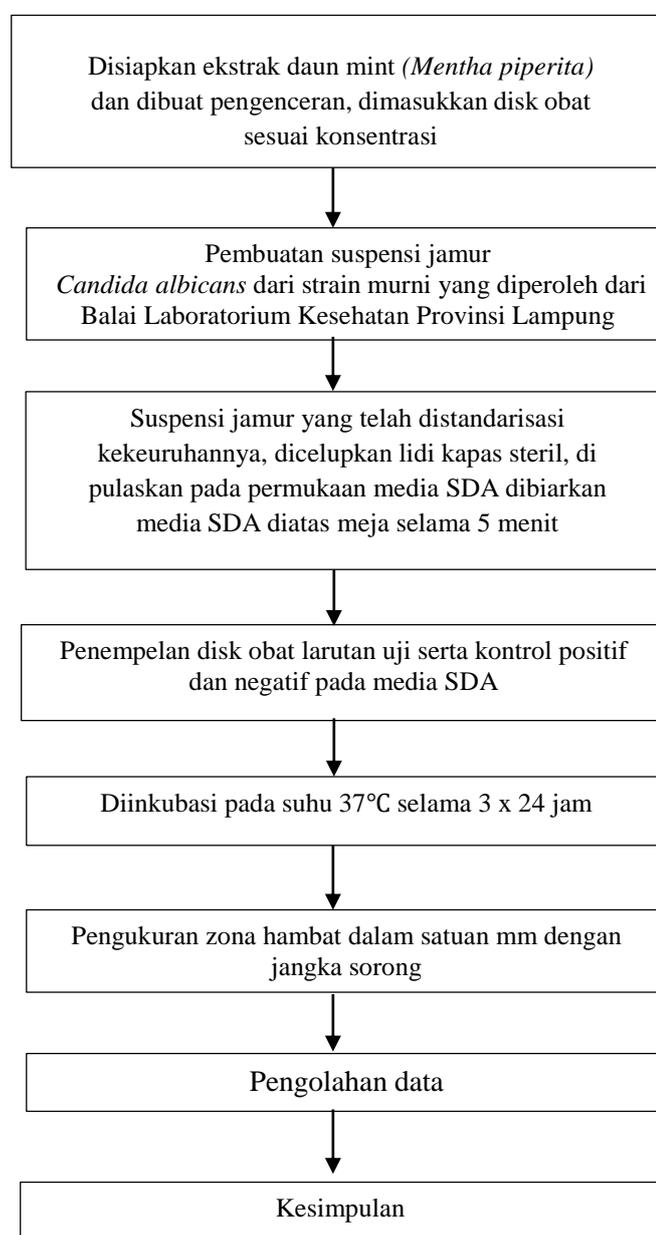
jangka sorong sebagai diameter daya hambat ekstrak daun mint (*Mentha piperita*) terhadap pertumbuhan jamur *Candida albicans*.

i) Interpretasi hasil pengukuran zona hambat dapat di lihat pada Tabel 3.2

Tabel 3.2. Kategori Diameter Zona Hambat (Yusran & Muhasbir, 2018).

Diameter Zona Hambat	Kategori Zona Hambat
< 10 mm	Lemah
10-15 mm	Sedang
16-20 mm	Kuat
>20 mm	Sangat kuat

5. Alur Penelitian



F. Pengolahan Data dan Analisa Data

Data yang berupa diameter zona hambat dianalisis menggunakan uji ANOVA (*Analysis Of Variance*) untuk melihat perbedaan diameter zona hambat antar perlakuan, jika terdapat perbedaan diameter zona hambat (nilai $p = 0,000$ ($0,05$) maka dilanjutkan ke uji BNT (Beda Nyata Terkecil). Uji dilakukan dengan menggunakan aplikasi Statistical Program for Social Science (SPSS).

G. Ethical Clearance (Persetujuan Etik)

Penelitian ini dilakukan atas izin komisi etik Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang No. 363/KEPK-TJK/III/2024. Penelitian ini tidak menimbulkan bahaya bagi lingkungan, karena limbah yang dihasilkan kemudian dikumpulkan dan dimusnahkan dalam penanganan limbah. Limbah media plate serta limbah suspensi jamur pada tabung dimusnahkan dengan Autoclave dengan suhu 120°C dalam waktu 60 menit dengan tekanan 1 atm. Kemudian plate dan tabung dicuci dengan menggunakan detergen pada air mengalir. Limbah larutan uji ditangani dengan cara langsung dibuang pada saluran pembuangan, dikarenakan limbah larutan uji tidak membahayakan lingkungan.