

BAB III METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah eksperimental, dengan desain penelitian Rancangan Acak Lengkap (RAL). Variabel bebas dalam penelitian ini yaitu suhu, waktu perebusan daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) serta kontrol positif (*ketokonazole* 2%). Suhu yang digunakan yaitu 70°C dan 100°C dan dengan variasi waktu perebusan 5, 10, 15 dan 20 menit, sedangkan variabel terikat pada penelitian ini yaitu zona hambat jamur *Candida albicans*.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi penelitian

Tempat penelitian dilaksanakan di UPTD Balai Laboratorium Kesehatan Provinsi Lampung dan Laboratorium Botani Jurusan FMIPA Biologi Universitas Lampung (untuk determinasi sampel)

2. Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan April-Mei 2022

C. Subyek Penelitian

Subyek dalam penelitian ini adalah daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.). Sampel daun sirih merah dipilih daun yang berusia tua (daun berwarna hijau tua dengan garis keperakan dan bagian belakang daun berwarna merah hati tua dan bertekstur agak kaku). Kemudian sampel diberi 8 perlakuan dan pengulangan sampel dilakukan sebanyak 3 kali dengan rumus $(t-1)(n-1) \geq 15$, dimana t adalah banyaknya kelompok variasi perlakuan dan n adalah jumlah replikasi, sehingga didapatkan hasil:

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

$$(8-1)(n-1) \geq 15$$

$$8n \geq 23$$

$$n \approx 3$$

D. Variabel dan Definisi Operasional

Tabel 3.1 Variabel dan Definisi Operasional

Variabel	Definisi	Alat Ukur	Cara Ukur	Hasil Ukur	Skala
Bebas					
Ekstrak Daun Sirih Merah	Daun sirih merah yang direbus dalam pelarut akuadest & digunakan sebagai larutan uji	Neraca analitik elektrik Beaker glass	sampel ditimbang, dimasukkan kedalam akuadest Pengukuran	Daun sirih merah (gram) Akuades (ml)	Rasio
Suhu Perebusan	Temperatur yang perebusan daun sirih merah mulai dari suhu ruang- 70°C dan suhu ruang-100°C	Termometer	langsung	(°C)	Interval
Waktu Perebusan Daun Sirih Merah	Waktu perebusan dimulai ketika telah tercapai suhu yang telah ditentukan, kemudian direbus dengan variasi waktu 5, 10, 15 dan 20 menit.	Stopwatch	Pengukuran langsung	(menit)	Rasio
Kontrol obat (<i>Ketokonazole</i>)	Merupakan obat yang digunakan sebagai kontrol positif	Jangka sorong	Pengukuran langsung	Diameter zona hambat satuan (mm)	Rasio
Terikat					
Pertumbuhan Jamur <i>Candida albicans</i>	Pertumbuhan jamur <i>Candida albicans</i> yang dihambat (Area jernih yang mengelilingi disc) oleh rebusan daun sirih merah yang telah diberi variasi perlakuan suhu dan waktu	Jangka sorong	Mengukur diameter zona hambat dengan metode difusi Kirby Bauer	zona hambat yang terbentuk dalam satuan (mm). ukuran diameter zona hambat termasuk diameter disc (6mm)	Rasio

E. Teknik Pengumpulan Data

1. Prosedur Penelitian

- a. Mengajukan permohonan izin penelitian kepada pihak kampus untuk melakukan izin penelitian yang akan dilaksanakan di UPTD Balai Laboratorium Kesehatan Provinsi Lampung serta melakukan uji determinasi bahan uji yaitu daun sirih merah di Fakultas MIPA Biologi Universitas Lampung.
- b. Alat yang digunakan adalah neraca analitik elektrik, autoclave, beaker glass, tabung reaksi, pipet ukur, filler rubber, lidi kapas steril, disc blank, pinset, cawan petri, kertas kopi, oven, corong gelas, blender, hot plate, waterbath, mortar, termometer, stopwatch, erlenmeyer, lampu spiritus, korek api, jangka sorong, handscoone dan inkubator. Bahan yang digunakan adalah aquadest steril, NaCl, media SDA, larutan H₂SO₄ pekat, BaCl₂.2H₂O, Ketokonazole, daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.), dan strain murni *Candida albicans*.

2. Metode Pemeriksaan

Difusi agar cakram dengan cara *Kirby Bauer*.

3. Prinsip Pemeriksaan

Prinsip kerja metode difusi adalah terdifusinya senyawa antimikroba (misalnya antibiotik) ke dalam media padat di mana mikroba uji telah diinokulasikan, Pada metode difusi secara paper disk, kertas disk yang mengandung antibiotik diletakkan di atas permukaan media agar yang telah ditanam mikroba uji, (Putri dkk, 2017).

4. Pengujian daun sirih merah terhadap jamur *Candida albicans*

a. Sterilisasi Alat

Alat-alat gelas yang digunakan dalam penelitian ini dibersihkan dan dikeringkan terlebih dahulu kemudian dibungkus dengan kertas pembungkus. Disterilkan dengan menggunakan oven pada suhu 160°C selama 60 menit (Soemarno, 2000).

b. Pembuatan Media Sabouround Dextrose Agar (SDA)

Formula SDA adalah 65 gram/liter akuades sehingga media Sabouround Dextrose Agar ditimbang sebanyak 65 gr kemudian dilarutkan dalam 1 Liter

akuades. Media dipanaskan di atas hot plate sampai larutan homogen. Setelah larut sempurna, media disterilkan di autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit pada tekanan 1 atm. Didinginkan pada suhu 50°C kemudian ditambahkan larutan antibiotik chlorampenicol media yang dibuat (250 mg chlorampenicol dalam 10 ml pelarut akuades). Setelah itu dituangkan media ke dalam cawan petri steril.

c. Pembuatan Larutan Standar Mac Farland 0,5

Pembuatan larutan standar mac farland 0,5 dengan cara dicampurkannya 9,95 ml larutan H₂SO₄ 1% dengan 0,05 ml larutan BaCl₂.2H₂O 1,175% sehingga volume menjadi 10 ml, dikocok sampai homogen. Larutan harus dikocok setiap akan digunakan untuk membandingkan suspensi jamur (Soemarno, 2000).

d. Pembuatan NaCl 0,85%

Ditimbang 0,85 gram NaCl dilarutkan dalam 100 ml aquadest steril, dihomogenkan.

e. Identifikasi jamur *Candida albicans*

- 1) Jamur ditanam pada media plate SDA (Sabouraud Dextrose Agar) lalu diamati koloni jamur *Candida albicans* yang tumbuh.
- 2) Koloni jamur diambil dari biakan SDA yang telah ditanam kemudian diletakkan pada permukaan objek glass.
- 3) Koloni yang telah diletakkan di atas objek glass dilakukan pewarnaan gram.
- 4) Diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran awal 10x kemudian dilanjutkan ke perbesaran 40x.

f. Pembuatan Suspensi *Candida albicans*

Dari biakan murni *Candida albicans*, dibuat suspensi dengan menambahkan larutan NaCl 0,85% di dalam tabung, dihomogenkan dengan alat vortex mixer sampai didapatkan kekeruhan yang disesuaikan dengan standar kekeruhan Mac Farland 0,5 (Soemarno,2000).

5. Pembuatan Larutan Uji

- a. Pembuatan larutan uji dengan cara menyiapkan daun sirih merah tua kemudian dilakukan pencucian dan ditiriskan. Daun sirih merah ditimbang sebanyak 20 gram lalu dipotong kecil dan diblender untuk memperkecil ukuran daun sirih sehingga luas permukaan sampel yang bersentuhan dengan cairan pelarut lebih

besar, dan diharapkan proses pelarutan lebih efektif. Hal ini disebabkan adanya kemudahan cairan penyari menembus sampel dan menyari senyawa kimia yang terdapat dalam sampel (Rollando, 2012). Setelah itu dimasukkan kedalam 200 ml akuades (merujuk pada penelitian Sartini, 2020 mengenai efek rasio daun-air daun sirih sebagai agen antijamur diperoleh rasio daun:air 1:10 menghasilkan senyawa aktif dengan kadar yang tinggi). Sampel dipanaskan hingga mencapai suhu yang telah ditentukan yaitu suhu 70°C dengan waterbath dan suhu 100°C menggunakan hotplate, kemudian dilakukan perebusan sesuai dengan waktu yang telah ditentukan dalam perlakuan. Kemudian disiapkan disk blank untuk dilakukan perendaman pada larutan uji.

6. Pelaksanaan Uji Daya Hambat

- a. Disiapkan media SDA yang telah mengeras.
- b. Kedalam suspensi jamur yang sudah di standarisasi kekeruhannya, dicelupkan lidi kapas steril. Kemudian lidi kapas dapat diangkat dan diperas dengan cara menenkannya pada dinding tabung bagian dalam sambil diputar-putar.
- c. Digoreskan lidi kapas tersebut pada permukaan media SDA sampai seluruh permukaan tertutup rapat dengan goresan, dilakukan 3x penggoresan pada permukaan media dengan membolak-balik lidi kapas pada setiap goresan.
- d. Kemudian dilakukan penempelan disc obat pada media SDA dengan masing-masing media berisi 4 disk obat, dengan cara menaruhkan disk dipermukaan media dengan pinset lalu ditekan sedikit sehingga disc obat menempel pada media SDA dengan jarak antar disc obat lebih kurang 15 mm.
- e. Lempeng agar diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 x 24 jam.

F. Pengolahan dan Analisis Data

1. Pengolahan Data Data diperoleh dengan cara :
 - a. Dilakukan pengujian efektivitas rebusan daun sirih merah dengan beberapa variasi suhu dan waktu terhadap zona hambat pertumbuhan *Candida albicans*.
 - b. Dilakukan pengukuran zona hambat dari masing-masing sampel menggunakan alat ukur dan satuan mm.
 - c. Data zona hambat yang diperoleh disajikan dalam bentuk tabel.
2. Analisis Data

Data berupa diameter zona hambat pertumbuhan jamur *Candida albicans* yang terbentuk dianalisis menggunakan uji *Two Way Anova* untuk menentukan apakah terdapat perbedaan yang signifikan dalam pemberian variasi suhu dan waktu terhadap pertumbuhan jamur *Candida albicans*. Pengambilan keputusan hasil uji yaitu dengan cara membandingkan nilai *p value* dengan α :

- a. Jika $p\ value < \alpha$ maka H_1 diterima yang artinya, variasi suhu dan waktu ekstrak rebusan daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) berbeda signifikan dalam menghambat pertumbuhan *Candida albicans*.
- b. Jika $p\ value > \alpha$ maka H_1 ditolak yang artinya, variasi suhu dan waktu ekstrak rebusan daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) tidak berbeda signifikan dalam menghambat pertumbuhan *Candida albicans*.

G. *Ethical Clearence* (Persetujuan Etik)

Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan etik dengan nomor surat: No.038/KEPK-TJK/X/2022 tanggal 11 April 2022. Penelitian ini tidak menimbulkan bahaya bagi lingkungan, karena limbah yang dihasilkan dari proses penelitian ini dikumpulkan dan dimusnahkan dalam penanganan limbah. Limbah media SDA dan limbah suspensi jamur *C.albicans* pada tabung dimusnahkan dengan cara perebusan pada suhu 100°C selama 30 menit, air bekas rebusan dibuang pada saluran pembuangan, plate dan tabung dicuci menggunakan detergen dan dibilas dengan air mengalir hingga bersih.

H. Alur Penelitian



