

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

Jenis penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium dengan rancangan penelitian yang terdiri atas rancangan kelompok kontrol dengan pengukuran setelah perlakuan (*post-test only control group design*). Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi minyak atsiri daun pala (*Myristica fragrans*) 10%, 20%, 30%, 40%, dan 50% dengan dua pelarut yaitu etanol 90% dan minyak kelapa. Variabel terikat adalah diameter zona hambatan pertumbuhan *Candida albicans*. Variabel kontrol adalah suhu dan waktu inkubasi, media yang digunakan, metode uji antijamur, kontrol positif antijamur sintetis yaitu *ketokonazole*, dan kontrol negatif. Pengulangan dilakukan sebanyak 3 kali.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medik dan Laboratorium Sediaan Steril Jurusan Farmasi Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang.

2. Waktu

Penelitian ini telah dilaksanakan pada tanggal 05-24 Mei 2025 di Jurusan Teknologi Laboratorium Medik dan tanggal 26 Mei sd. 05 Juni 2025 di Jurusan Farmasi Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang.

C. Subyek Penelitian

Subjek penelitian ini adalah kultur murni jamur *Candida albicans* yang diperoleh dari Laboratorium Kesehatan Daerah UPTD Provinsi Lampung. Minyak atsiri daun pala (*Myristica fragrans*) diperoleh melalui proses penyulingan di perkebunan pala di Kabupaten Pesawaran, Provinsi Lampung tempat atau lokasi penyulingan tercantum pada lampiran 10 dan dibuat dalam konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40% dan 50%.

Penelitian ini mencakup lima variasi konsentrasi minyak atsiri daun pala (10%, 20%, 30%, 40%, dan 50%), dua pelarut (etanol 90% dan minyak kelapa dengan merk Barco), kontrol positif (*Ketokonazole* 2%), dan kontrol negatif (Etanol 90% dan Minyak Kelapa). Sehingga jumlah total perlakuannya adalah sebanyak 12 perlakuan, dihitung menggunakan rumus di bawah ini:

$$t = (\text{variasi konsentrasi} \times \text{jenis pelarut}) + \text{kontrol positif/negatif} \\ = (5 \times 2) + 2 = 12 \text{ perlakuan}$$

Banyaknya jumlah pengulangan yang akan dilakukan dapat dihitung menggunakan rumus Federer yaitu :

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

Keterangan :

t = perlakuan

n = pengulangan

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

$$(12 - 1)(n - 1) \geq 15$$

$$11(n - 1) \geq 15$$

$$11n - 11 \geq 15$$

$$11n \geq 15 + 11$$

$$n \geq 26/11$$

$$n \geq 2,367$$

Hasil perhitungan menggunakan rumus Federer menunjukkan bahwa setiap sampel yang diuji diulang sebanyak tiga kali.

D. Variabel dan Definisi Operasional

Tabel 3.1 Variabel dan Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Cara Ukur	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala
Variabel Bebas :					
1. Konsentrasi minyak atsiri daun pala (<i>Myristica fragrans</i>)	Sejumlah minyak atsiri daun pala yang diencerkan dengan pelarut dalam konsentrasi persen yaitu 10%, 20%, 30%, 40% dan 50%.	Pemipetan	Pipet Volume	Persen (%) 10%, 20%, 30%, 40% dan 50%.	Rasio
2. Jenis Larutan Pengencer	Pelarut yang digunakan untuk mengencerkan minyak atsiri daun pala (<i>Myristica fragrans</i>) yaitu etanol 90% dan minyak kelapa menjadi beberapa konsentrasi yaitu 10%, 20%, 30%, 40% dan 50%	Observasi	Pengamatan	Etanol 90% dan minyak kelapa (Minyak Barco)	Rasio
Variabel Terikat :					
Diameter zona hambat pertumbuhan <i>Candida albicans</i>	Zona jernih yang membentuk lingkaran di sekitar sumuran. Zona jernih ini menunjukkan efektivitas minyak atsiri dalam menghambat pertumbuhan <i>Candida albicans</i>	Pengukuran dilakukan secara langsung pada medium pertumbuhan, dengan menentukan jarak dari tepi zona bening ke tepi yang berlawanan melalui titik pusat sumuran.	Jangka Sorong	Diameter (mm) Kategori Diameter Zona Hambat (Davitt and Stout, 1971) a. <5 mm : lemah b. 5 – 10 mm : sedang c. 10 – 20 mm : kuat d. >20 mm : sangat kuat	Rasio

E. Pengumpulan Data

Data dikumpulkan melalui pengukuran diameter zona hambat (dalam satuan mm) setelah minyak atsiri daun pala diaplikasikan ke sumuran pada media agar yang telah diinokulasi dengan *Candida albicans*. Pengukuran dilakukan menggunakan jangka sorong pada zona hambat yang terbentuk (zona transparan) setelah masa inkubasi.

Pengumpulan data dilakukan dengan tahapan sebagai berikut:

1. Dilakukan penelusuran pustaka dan diskusi langsung dengan narasumber untuk mendapatkan pandangan ilmiah tentang penelitian.
2. Dilakukan pra-survei lokasi perkebunan pala di Tegal Rejo Desa Gunung Rejo Kecamatan Way Ratai Kabupaten Pesawaran Provinsi Lampung.
3. Membuat permohonan surat pengantar yang diajukan ke Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang, yang akan digunakan untuk izin pembelian biakan murni *Candida albicans* di Laboratorium Kesehatan Daerah UPTD Provinsi Lampung
4. Membuat pengajuan surat ijin tempat penelitian ke Jurusan Teknologi Laboratorium Medis dan Jurusan Farmasi Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang untuk dapat menggunakan Laboratorium Mikrobiologi Jurusan TLM dan Laboratorium Sediaan Steril Jurusan Farmasi.
5. Selanjutnya peneliti membeli minyak atsiri daun pala (*Myristica fragrans*) dan dibuat variasi konsentrasi yaitu 10%, 20%, 30%, 40% dan 50%, digunakan untuk uji aktivitas dan efektivitas antijamur *Candida albicans*.
6. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan untuk penelitian ini adalah : Neraca Analitik Elektrik, Hot Plate, Inkubator, Oven, BSC (*Biological Safety Cabinet*), Autoclave, Inkubator, Mikroskop, Mixer Vortex, Erlemeyer 250 ml, Baekerglass 250 ml, Gelas Ukur 250 ml, Cawan Petri, Cawan Arloji, Tabung Reaksi, Rak Tabung, Spatula, Batang Pengaduk, Jarum Ose, Lampu Spirtus, Kapas Swab Steril, Vacuum Pump, Pipet Volume 10,0 ml, Corong Glass, Objek Glass, Penggaris/Jangka Sorong, Tip kuning, Mikropipet 5-50 μ l, Kertas Kopi, Aluminium Foil, Kapas, Benang Kasur.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah : Minyak Atsiri Daun Pala (*Myristica fragrans*), media *Potato Dextrose Agar* (PDA), media *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA), strain jamur *Candida albicans*, putih telur, kontrol positif (+) antijamur sintesis tablet *Ketokonazole*, dan kontrol negatif (-) pelarut tanpa minyak atsiri, H_2SO_4 1%, $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1,175%, NaCl 0,9%, Etanol 70%, Etanol 90%, Etanol 96%, Minyak Kelapa (Merek Barco), *Aquadest* dan Spirtus.

7. Identifikasi *Candida albicans* dengan metode Uji *Germ Tube*

Putih telur ayam ras adalah media yang digunakan untuk uji *Germ tube*. Putih telur ayam ras dimasukan dalam inkubator pada suhu 37°C selama 30 menit. Setelah di inkubasi putih telur siap untuk digunakan pada uji *germ tube*. Ambil ± 2 ml putih telur lalu dimasukan ke dalam tabung reaksi. Selanjutnya diinokulasikan dengan isolat *Candida albicans* yang berumur 48 - 72 jam. Inkubasi pada suhu 37°C selama 2-3 jam. Kemudian setelah diinkubasi dilanjutkan dengan pemeriksaan mikroskopis, dengan cara diambil satu tetes biakan dan ditetaskan pada *objek glass* lalu ditutup dengan *deck glass*. Diperiksa di bawah mikroskop menggunakan lensa objektif 40x. Pemeriksaan mikroskopis ditemukan bentuk sel yang berkecambah seperti raket atau *germ tube* dikatakan positif *Candida albicans* (Shopia, 2021). Adapun hasil uji *Germ Tube* terdapat pada Lampiran 9.

8. Uji Aktivitas Antijamur

a. Sterilisasi Alat

Semua alat yang akan digunakan dan terbuat dari kaca dicuci bersih dan dikeringkan, setelah itu dibungkus dengan kertas buram. Sterilisasi dilakukan dengan oven pada suhu 180 °C selama 30 jam, sedangkan jarum *ose* dan pinset disterilkan dengan cara pemijaran. Untuk bahan seperti media dan *aquadest* setelah dilarutkan, lalu dimasukan ke dalam *Erlenmeyer*, ditutup dengan kapas dan alumunium foil, lalu dimasukan *autoclave* dan disterilkan pada suhu 121 °C tekanan 1 atm selama 15 menit (Soemarno, 2000).

b. Pembuatan Media

1. *Potato Dextrose Agar (PDA)*

Ditimbang serbuk PDA sebanyak 0,975 gram masukan kedalam Erlenmeyer. Tambahkan 25 ml *aquadest*, aduk lalu panaskan diatas hotplate sampai larut sempurna. Dituangkan media ke dalam tabung reaksi sebanyak 5 ml, tutup tabung reaksi dengan kapas yang sudah dibungkus dengan aluminium foil. Sterilkan media menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit pada tekanan 1 ATM (*Oxoid Quality Assurance*, 2017).

2. *Saboraud Dextrose Agar* (SDA)

Ditimbang serbuk SDA sebanyak 19,5 gram masukkan kedalam Erlenmeyer. Tambahkan 300 ml aquadest, aduk lalu panaskan diatas hotplate sampai larut sempurna. Tutup erlenmeyer dengan kapas yang telah dibungkus dengan aluminium foil. Sterilkan media menggunakan *autoclave* pada suhu 121⁰C selama 15 menit pada tekanan 1 ATM (*Oxoid Quality Assurance*, 2017).

Setelah media SDA disterilkan kemudian didinginkan hingga mencapai suhu $\pm 44^{\circ}\text{C}$, tambahkan antibiotik kloramfenikol sebanyak 3 ml ke dalam 300 ml media SDA, lalu homogenkan. Setelah homogen, media SDA dituang kedalam cawan petri dengan ketebalan 3-4 mm biarkan mengeras disuhu ruang (Basarang, 2020).

c. Uji Sterilisasi Media

Diambil 1 cawan petri media SDA yang sudah dibuat, lalu diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 2x24 jam. Jika terdapat pertumbuhan 2 koloni pada plate, maka media dianggap tidak steril. (Soemarno, 2000)

d. Kontrol Positif

Ditimbang satu per satu sebanyak 10 Tablet Ketokonazole, hitung bobot rata-rata lalu gerus menggunakan mortir dan stamper sampai halus. Kemudian ditimbang secara seksama sejumlah serbuk tablet Ketokonazole yang setara dengan lebih kurang 200 mg baku Ketokonazole. Dilarutkan dalam 10,0 ml Alkohol 96%, kocok kuat dengan menggunakan vortex selama kurang lebih 10 menit atau sampai dengan homogen. Setelah homogen larutan kontrol positif siap digunakan. Perhitungan pembuatan kontrol positif terlampir pada Lampiran 5

e. Kontrol Negatif

Larutan kontrol negatif (-) yang digunakan adalah pelarut yang digunakan untuk melarutkan minyak atsiri ada 2 jenis pelarut yang berbeda yaitu etanol 90% dan minyak kelapa (Wisnianti, 2024).

f. Pembuatan Standar *McFarland* 0,5

Dibuat dari 0,5 ml $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1,175% ditambah 99,5 ml H_2SO_4 1% kemudian dihomogenkan. Dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 5 ml, kemudian tutup rapat. Sebelum menggunakan kocok terlebih dahulu dengan vortex agar larutan homogen (Soemarno, 2000).

g. Pembuatan Suspensi Jamur

Pembuatan suspensi jamur dengan cara mengambil 1-2 mata ose biakan *Candida albicans* yang telah diremajakan di media *Potato Dextrose* Agar (PDA) berumur 24 jam kemudian dimasukkan kedalam tabung reaksi yang berisi larutan NaCl 0,9% steril, dikocok menggunakan vortex sampai homogen, kemudian kekeruhannya disamakan dengan larutan standar *McFarland* 0,5.

Jika suspensi terlalu keruh, maka ditambahkan larutan NaCl 0,9% steril. Sebaliknya, jika suspensi terlalu jernih, maka ditambahkan biakan jamur hingga mencapai tingkat kekeruhan yang sesuai dengan standar *McFarland* 0,5 (Setyati, 2022). Cara menyamakan antara larutan suspensi dan standar *McFarland* 0,5 terdapat pada lampiran 11 bagian (f).

h. Pembuatan Varisai Konsentrasi Minyak Atsiri Daun Pala

Variasi Konsentrasi Minyak Atsiri Daun Pala (*Myristica fragrans*) Larutan minyak atsiri dibuat konsentrasi persen (%) dalam volume per volume (v/v) masing - masing sebanyak 5 ml. Perhitungan pembuatan variasi konsentrasi minyak atsiri daun pala menggunakan pelarut etanol 90% dan minyak kelapa tercantum pada lampiran 7.

i. Inokulasi Jamur *Candida albicans*

Disiapkan media SDA yang telah mengeras. Dichelupkan lidi kapas steril ke dalam suspensi *Candida albicans*. Didiamkan sejenak agar suspensi meresap ke dalam kapas, kemudian diangkat dan diperas pada dinding tabung dengan cara menekannya sambil diputar. Dipulaskan lidi kapas tersebut ke permukaan media SDA hingga seluruh permukaan tertutup dengan merata. Dibiarkan media SDA tersebut di atas meja selama 5-15 menit agar suspensi jamur dapat meresap ke dalam media.

j. Pembuatan Sumuran

Dibuat sumuran pada media SDA yang telah dipulas dengan suspensi *Candida albicans* menggunakan tip kuning steril atau menggunakan pangkal pipet dengan diameter lubang berkisar antara 6–8 mm. Pembuatan sumuran dilakukan sampai dasar agar. Setiap sumuran diletakkan dengan jarak yang cukup antar sumuran serta dari tepi cawan petri untuk mencegah interferensi atau tumpang tindih zona hambat yang dapat memengaruhi hasil pengamatan (Dewi, 2023).

k. Sampel Uji

Larutan uji atau minyak atsiri daun pala (*Myristica fragrans*) yang telah dibuat dalam beberapa konsentrasi yaitu 10%, 20%, 30%, 40% dan 50% dengan 2 pelarut yang berbeda (etanol 90% dan minyak kelapa) dimasukkan ke dalam masing-masing sumuran yang telah dibuat pada media SDA dengan volume sebanyak 50 μ L untuk setiap sumuran. Kontrol positif antijamur ketokonazol, dan kontrol negatif 2 jenis pelarut yang berbeda (etanol 90% dan minyak kelapa), dimasukkan ke dalam sumuran yang telah dibuat pada media SDA dengan volume sebanyak 50 μ L untuk setiap sumuran (Andriani, 2024).

l. Inkubasi

Media yang telah diberi sampel uji kemudian diinkubasi pada suhu 35°C selama 24-48 jam dalam kondisi aerob. Inkubasi ini dilakukan untuk memungkinkan pertumbuhan optimal *Candida albicans* (Andriani, 2024).

m. Pengamatan dan Pengukuran

Setelah masa inkubasi selesai, zona hambat yang terbentuk di sekitar sumuran diamati. Pengukuran diameter zona hambat, termasuk diameter sumuran, dilakukan menggunakan alat pengukur jangka sorong yang memiliki ketelitian tinggi (Soemarno, 2000). Cara mengukur diameter zona hambat terlampir pada lampiran 11.

F. Pengolahan dan Analisis Data

1. Pengolahan Data

Pengolahan data dan Analisis Data menurut Notoatmodjo, 2012 sebagai berikut:

a. *Editing*

Pengecekan kembali data yang di dapat dari hasil pengamatan. Pengecekan dilakukan terhadap semua lembar pengujian yang meliputi Uji aktivitas antijamur dengan memeriksa kelengkapan data untuk proses lebih lanjut.

b. *Coding*

Setelah data diedit, kemudian dilakukan pengkodean yaitu merubah bentuk kalimat atau huruf menjadi bentuk angka/bilangan guna untuk memudahkan dalam melakukan analisis.

c. *Entrying*

Data yang telah selesai diedit dan diberi kode kemudian data dimasukkan ke dalam program komputer untuk dilakukan pengolahan tabel.

d. *Tabulasi*

Membuat tabel-tabel data, sesuai dengan tujuan penelitian. Setelah data dianalisis, hasil yang diperoleh dibuat dalam bentuk tabel dan grafik. Data pada program komputer pengolah tabel data dibuat dalam bentuk tabel guna mempermudah dalam menganalisis. Kemudian data disajikan dalam bentuk grafik guna untuk mempermudah pemahaman yang lebih dalam.

2. Analisis Data

Analisis data yang akan digunakan adalah :

a. Statistik Deskriptif (Univariat)

Menghitung rata-rata (mean) dan standar deviasi (SD) dari diameter zona hambat pada setiap kelompok perlakuan.

Menampilkan data dalam bentuk tabel atau diagram batang untuk membandingkan efektivitas setiap perlakuan.

b. Statistik Inferensial (Bivariat)

Untuk mengetahui apakah ada perbedaan signifikan antara kelompok perlakuan, dilakukan analisis sebagai berikut:

1. Uji Normalitas (*Shapiro-Wilk Test*)

Untuk mengetahui apakah data berdistribusi normal ($p > 0,05$ = data normal).

2. Uji Homogenitas (*Levene's Test*)

Untuk memastikan varians antar kelompok homogen ($p > 0,05$ = data homogen).

3. Uji ANOVA Satu Arah (*One-Way ANOVA*)

Jika data normal dan homogen, dilanjutkan ANOVA untuk melihat perbedaan signifikan antara kelompok perlakuan.

Jika $p < 0,05$, maka ada perbedaan signifikan antara kelompok.

4. Uji *Post-Hoc*

Jika hasil ANOVA signifikan, dilakukan uji lanjut untuk melihat kelompok mana yang berbeda secara signifikan dengan Uji *Games-Howell*.

G. *Ethical Clearance*

Penelitian ini telah memperoleh persetujuan dari Komite Etik Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang setelah melalui proses kaji etik, dengan surat keterangan layak etik nomor: 140/KEPK-TJK/IV/2025 tanggal 22 April 2025. Penelitian ini menggunakan biakan murni jamur *Candida albicans* sebagai subyek dengan menggunakan metode eksperimen laboratorium untuk mengetahui aktivitas dan efektifitas variasi konsentrasi minyak atsiri daun pala (*Myristica fragrans*) sebagai antijamur alami. Dalam proses penelitian, terdapat potensi limbah laboratorium berupa sisa suspensi jamur *Candida albicans*, larutan minyak atsiri daun pala (*Myristica fragrans*), etanol 90% dan minyak kelapa. Limbah ini akan dikelola sesuai dengan prosedur pengelolaan limbah laboratorium untuk mencegah pencemaran lingkungan. Penelitian ini tidak melibatkan data pribadi atau identitas manusia yang memerlukan kerahasiaan, namun prosedur penelitian akan tetap mengikuti prinsip-prinsip etika laboratorium. Peneliti menanggung sepenuhnya seluruh biaya yang dibutuhkan dalam penelitian ini.