

## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### A. Jenis Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode *true experimental*, dimana peneliti dapat mengendalikan variabel pengganggu, sehingga pelaksanaan penelitian memiliki validitas internal yang tinggi (Hardani dkk. 2020). Desain penelitian yang digunakan yaitu *post test only control design*, dimana kelompok eksperimen dan kontrol tanpa diukur sebelum perlakuan, lalu kelompok eksperimen diberikan perlakuan. Pengaruh perlakuan ditentukan dengan membandingkan hasil setelah perlakuan antara kedua kelompok. Pemilihan kelompok dilakukan secara random sehingga diasumsikan memiliki karakteristik awal yang serupa (Arib dkk. 2024). Desain penelitian tersebut dapat dilihat pada table berikut :

Tabel 3  
Desain Penelitian *Post Test Only Control Design*

| Kelompok | Perlakuan | Post-test |
|----------|-----------|-----------|
| R1       | X         | O1        |
| R2       | Kontrol   | O2        |

Keterangan :

R1 (Random 1) : Kelompok eksperimen terdiri atas berbagai variasi konsentrasi ekstrak akar encok (*Plumbago zeylanica L.*) hasil *green extraction*, yaitu 15%, 7,5%, 3,75%, 1,88%, 0,94%, dan 0,47%.

R2 (Random 2) : Kelompok kontrol, yaitu suspensi jamur sesuai standar 0,5 McFarland yang ditambahkan antibiotik Nystatin 100.000 IU/ml sebagai kontrol positif, suspensi jamur sesuai standar

0,5 McFarland sebagai kontrol negatif, VCO murni sebagai kontrol pelarut.

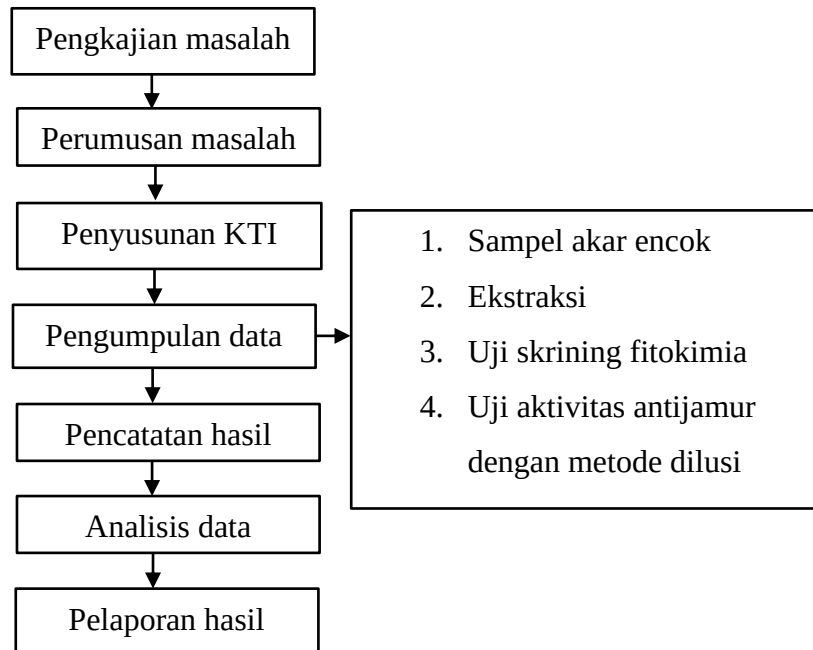
X (*Exposure*) : Kelompok perlakuan dalam penelitian ini adalah ekstrak akar encok (*green extraction*) menggunakan VCO.

O1 (Observasi 1) : Nilai absorbansi R1 setelah inkubasi.

O2 (Observasi 2) : Nilai absorbansi R2 setelah inkubasi.

## B. Alur Penelitian

Berikut merupakan bagan alur penelitian pada penelitian ini :



Gambar 5 Alur penelitian

## C. Tempat dan Waktu Penelitian

### 1. Tempat penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di beberapa tempat, yaitu pembuatan ekstrak akar encok dilakukan di Laboratorium Kimia Dasar dan Laboratorium Kimia Terapan Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Politeknik Kesehatan Denpasar. Pengujian

aktivitas antijamur dilakukan di Laboratorium Terpadu Politeknik Kesehatan Denpasar.

## **2. Waktu penelitian**

Penelitian ini telah dilaksanakan dari bulan Desember 2025 hingga bulan April 2026.

### **D. Unit Analisis**

Unit analisis dalam penelitian ini adalah nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) yang mempengaruhi pertumbuhan jamur *Candida albicans* pada berbagai tingkat konsentrasi 15%, 7,5%, 3,75%, 1,88%, 0,94%, dan 0,47%.

Sampel utama yang digunakan pada penelitian ini adalah ekstrak akar encok (*green extraction*) menggunakan VCO dengan konsentrasi 15%. Ekstrak ini dibuat menggunakan akar encok yang telah dikeringkan kemudian dihaluskan, selanjutnya di rendam dengan pelarut *Virgin Coconut Oil* (VCO). Uji aktivitas antijamur dilakukan dengan memilih akar encok menggunakan teknik purposive sampling, yaitu pemilihan sampel berdasarkan kriteria inklusi (akar encok yang segar, berusia cukup tua untuk memiliki kandungan metabolit optimal, dan tidak mengalami pembusukan seperti bercak putih di permukaan kulit), dan kriteria eksklusi (akar yang sudah lama disimpan, akar yang berjamur dan busuk, akar muda).

Uji aktivitas antijamur *green extraction* akar encok dilakukan dengan lima variasi konsentrasi sebagai perlakuan, yaitu 15%, 7,5%, 3,75%, 1,88%, 0,94%, dan 0,47%. Rentang konsentrasi ini dipilih berdasarkan standar penentuan konsentrasi dari CLSI M100 untuk mengidentifikasi Konsentrasi hambat Minimum (KHM) dari tiap perlakuan yang mampu menghambat pertumbuhan *Candida albicans*. Kelompok kontrol, yaitu suspensi jamur sesuai standar 0,5 McFarland yang

ditambahkan antibiotik Nystatin 100.000 IU/ml sebagai kontrol positif, suspensi jamur sesuai standar 0,5 McFarland sebagai kontrol negatif, dan VCO murni sebagai kontrol pelarut. Masing-masing perlakuan dilakukan pengulangan, pengulangan masing-masing seri konsentrasi dalam penelitian ini bisa ditentukan dengan persamaan Federer (Fauziyah, 2019), sebagai berikut:

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

$$(9 - 1)(n - 1) \geq 15$$

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

$$8n - 8 \geq 15$$

$$8n \geq 23$$

$$n \geq 3$$

p = jumlah perlakuan

n = jumlah pengulangan

Berdasarkan persamaan Federer diatas bisa dijelaskan bahwa dalam penelitian ini memerlukan pengulangan sejumlah 3 kali sehingga diperoleh 36 data perlakuan dan 18 data kontrol, sehingga total data yang dihasilkan sebanyak 54 data.

## **E. Alat, Bahan, dan Prosedur Kerja**

### **1. Alat**

Blender, neraca analitik, *ball* pipet, mikropipet, pipet ukur, gelas ukur, gelas beaker, rak tabung reaksi, tabung reaksi, ose bulat *disposable*, pinset, *magnetic stirrer*, *hotplate*, *biosafety cabinet* (BSC-1800 II B2-X), bunsen spritus, Mc Farland densitometer, inkubator, autoklaf, microtube, cawan petri, labu Erlenmayer, spektrofotometer UV-Vis, *refrigerator* dan *cool box*.

## **2. Bahan**

Akar encok, akuades steril, VCO, biakan jamur *Candida albicans* ATCC 10231, media RPMI 1640, *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA), Nystatin 100.000 IU/ml, NaCl 0,85%, blue tip, *syringe filter* 0,22 µm, aluminium foil, kertas saring, strip pH, tissue, reagen *dragendorff*, reagen *mayer*, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NaOH 10%, kloroform, FeCl<sub>3</sub> 10% dan alkohol 70%.

## **3. Prosedur kerja**

### **a. Persiapan sampel (pra-analitik)**

#### **1) Pembuatan simplisia akar encok**

Pembuatan simplisia dan ekstrak akar encok dengan metode maserasi sesuai dengan penelitian (Purwoko et al. 2022). Adapun prosedur kerja pembuatan simplisia, yaitu :

- a) Akar encok yang telah dikumpulkan yang memenuhi kriteria inklusi, dibersihkan dengan cara dicuci dengan air mengalir.
- b) Tiriskan akar encok untuk mengurangi sisa air, kemudian di potong menjadi ukuran yang lebih kecil.
- c) Akar encok yang telah dipotong dikeringkan dengan cara diangin-anginkan menggunakan bantuan kipas angin.
- d) Hancurkan akar encok yang sudah kering dengan blender hingga menjadi serbuk halus.

#### **2) Pembuatan media RPMI 1640**

- a) Media RPMI 1640 seberat 10.4 gram ditimbang menggunakan timbangan analitik.

- b) Setelah ditimbang, bubuk media dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer dan dilarutkan dengan menambahkan 1000 ml air suling (akuades) dan jangan dipanaskan.
- c) pH larutan diukur menggunakan stik pH, dan dipastikan berada dalam kisaran optimal, yaitu 7,0-7,4.
- d) Proses sterilisasi dilakukan dengan filter membran steril dengan porositas 0,22 mikron.
- e) Simpan media cair pada suhu 2-8°C dan dalam keadaan gelap sampai digunakan (EUCAST, 2003).

### 3) Pembuatan suspensi jamur *Candida albicans*

Proses pembuatan suspensi jamur *Candida albicans* menurut CLSI (2017) dengan beberapa modifikasi adalah sebagai berikut :

- a) Ambil sebanyak 2 ose jamur *Candida albicans* dari biakan murni dan dimasukan ke dalam tabung yang berisi 5 ml larutan NaCl 0,85% steril, kemudian dihomogenkan dengan *vortex* selama 15 detik.
- b) Kekeruhan suspense jamur diukur menggunakan McFarland densitometer, 0,5 Mc Farland yang setara dengan  $1-5 \times 10^6$  CFU/ml.

b. Tahap pelaksanaan (analitik)

1) Skrining fitokimia ekstrak akar encok

Skrining fitokimia ekstrak akar encok (Sri et al. 2021) dengan beberapa modifikasi adalah sebagai berikut :

a) Flavonoid

Sebanyak 1 ml ekstrak ditambahkan ke dalam tabung reaksi, kemudian tambahkan serbuk Mg 0,1 gram dan 2 tetes HCl pekat, jika terbentuk warna merah jingga sampai merah ungu menunjukkan adanya flavonoid.

b) Alkaloid

Siapkan 1 tabung reaksi, dimasukan 1 ml ekstrak ke dalam masing-masing tabung reaksi, dan tambahkan 1 ml *Dragendorff* pada tabung 1, jika terbentuk endapan coklat kemerahan menunjukkan adanya alkaloid.

c) Tannin

Sebanyak 1 ml ekstrak dicampurkan dengan 3 ml aquadest serta ditambahkan dengan  $\text{FeCl}_3$  10%. Terbentuk larutan berwarna biru kehijauan menunjukkan adanya tannin.

d) Terpenoid

Sebanyak 5 ml ekstrak dicampur dengan 2 ml kloroform dan 3 ml asam sulfat pekat. Terbentuk warna merah kecoklatan pada antar permukaan menunjukkan adanya triterpenoid.

e) Saponin

Masukan 1 ml ekstrak ke dalam masing-masing tabung reaksi, tambahkan 5 ml air panas, kosok kuat 10 detik dengan keadaan mulut tabung tertutup. Tabung

didiamkan selama beberapa menit dalam keadaan tegak, jika buih dengan tinggi kurang lebih 3 cm dari cairan. Hal ini menunjukkan positif mengandung saponin.

## 2) Uji aktivitas antijamur

Uji aktivitas antijamur metode dilusi cair yang diadaptasi dari CLSI (2017) dengan beberapa modifikasi adalah sebagai berikut :

- a) Siapkan 9 microtube reaksi steril dan beri label dari 2 sampai 6. Tabung 7 diberi label kontrol positif (+), tabung 8 sebagai kontrol negatif (-), tabung 9 sebagai kontrol pelarut.
- b) Masukkan 0,8 ml ekstrak akar encok dengan pelarut VCO (*green extraction*) konsentrasi 15% ke dalam tabung 1.
- c) Tambahkan 0,4 ml media RPMI 1640 ke dalam tabung 2 sampai 6.
- d) Tabung 7 diisi dengan suspensi *Candida albicans* yang telah disesuaikan dengan standar kekeruhan McFarland, kemudian ditambahkan dengan antibiotik Nystatin 100.000 IU/ml sebagai kontrol positif.
- e) Tabung 8 diisi dengan suspensi *Candida albicans* yang telah setara dengan standar McFarland sebagai kontrol negatif (tanpa ekstrak atau antibiotik)
- f) Tabung 9 diisi dengan 0,4 ml VCO yang ditambahkan suspensi *Candida albicans* yang telah setara dengan standar McFarland sebagai kontrol pelarut.
- g) Ambil 0,4 ml larutan ekstrak dari tabung 1, pindahkan ke tabung 2 dan homogenkan untuk mendapatkan konsentrasi 7,5 %. Lanjutkan proses pengenceran secara bertingkat hingga tabung ke-6 untuk mendapatkan konsentrasi 3,75%, 1,875%, 0,938%, dan 0,469%.



- h) Amati tingkat kekeruhan dan lakukan pengukuran awal menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 530 nm untuk mencatat nilai absorbansi sebelum inkubasi.
- i) Setelah pengukuran, masukkan semua tabung ke dalam inkubator dan inkubasi pada suhu 35°C selama 24 jam.
- j) Setelah proses inkubasi, ulangi pengamatan kekeruhan dan lakukan pengukuran nilai absorbansi kembali menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 530 nm, lalu catat hasil setelah inkubasi.

c. Tahap akhir (pasca analitik)

- 1) Lakukan pengamatan kekeruhan serta dilihat berbandingan nilai absorbansi sebelum dan setelah inkubasi.
- 2) Nilai absorbansi sebelum dan setelah inkubasi pada kelompok perlakuan digunakan untuk menghitung persentase inhibisi pertumbuhan *Candida albicans* pada setiap konsentrasi ekstrak, yang mencerminkan tingkat hambatan pertumbuhan jamur, dengan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{inhibisi} = \left( \frac{\text{Abs. sebelum inkubasi} - \text{Abs. setelah inkubasi}}{\text{Abs. sebelum inkubasi}} \right) \times 100\%$$

Keterangan :

%inhibisi : persentase penghambatan pertumbuhan *Candida albicans*

- 3) Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) ditentukan sebagai konsentrasi terendah ekstrak yang menunjukkan pertumbuhan *Candida albicans*.

## **F. Jenis, Teknik dan Instrumen Pengumpulan Data**

### **1. Jenis data**

Data primer yaitu data diperoleh secara langsung yang dilakukan oleh peneliti. Data primer dalam penelitian ini berupa konsentrasi hambat minimum (KHM) *Candida albicans* pada berbagai konsentrasi ekstrak akar encok (*green extraction*) yang diuji melalui metode dilusi cair.

### **2. Teknik pengumpulan data**

Pengumpulan data dilakukan melalui percobaan laboratorium dengan mengukur absorbansi sebelum dan sesudah inkubasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Pengukuran tersebut bertujuan melihat nilai absorbansi pada berbagai konsentrasi ekstrak akar encok (*green extraction*) melalui metode dilusi cair.

### **3. Instrumen pengumpulan data**

Pada penelitian ini, perangkat yang digunakan untuk pengumpulan data meliputi APD, spektrofotometer UV-Vis, alat tulis, serta kamera.

## **G. Teknik Pengolahan Data dan Analisis Data**

### **1. Teknik pengolahan data**

Hasil uji aktivitas antijamur *green extraction* akar encok (*Plumbago zeylanica* L.) terhadap *Candida albicans* diperoleh berupa data nilai absorbansi sebelum dan setelah inkubasi yang digunakan untuk menghitung persentase inhibisi pertumbuhan jamur pada setiap konsentrasi ekstrak. Berdasarkan hasil perhitungan persentase inhibisi tersebut, ditentukan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) yang dinyatakan dalam persen (%). Data tersebut diolah secara tabulasi yang

disajikan dalam bentuk tabel, kemudian dijelaskan melalui uraian naratif untuk menggambarkan hasil pengujian.

## **2. Analisis data**

Data yang diperoleh dari penelitian ini dianalisis dengan Uji *Shapiro-Wilk* sebagai uji normalitas dan Levene Test sebagai uji homogenitas. Apabila suatu data memiliki nilai  $p > 0,05$ , maka data itu bisa dikatakan memiliki distribusi normal dan homogen sehingga dapat dilanjutkan dengan Uji *One-Way ANOVA* dalam mengetahui rata-rata perbedaan nilai antar kelompok. Apabila nilai  $p < 0,05$  atau distribusi data tidak normal dan tidak homogen maka dapat dilanjutkan dengan Uji *Kruskall-Wallis*. Dilanjutkan dengan Uji *Post Hoc Games Howell* jika data tidak homogen, namun jika data yang diperoleh homogen digunakan Uji *Post Hoc LSD* untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara signifikan (Arib dkk. 2024).

## **H. Etika Penelitian**

Adapun etika pada penelitian ini antara lain, sebagai berikut (Haryani dan Setyobroto, 2022) :

### **1. Beneficence**

Penelitian ini berupaya memberikan manfaat sebesar mungkin serta meminimalkan kemungkinan terjadinya kerugian bagi pihak manapun yang terlibat.

### **2. Non-maleficence**

Penelitian ini berkomitmen untuk tidak menimbulkan bahaya serta memastikan bahwa subjek penelitian tidak diperlakukan semata sebagai objek dan tetap terlindungi dari tindakan yang dapat merugikan.

### 3. Kejujuran

Kejujuran dalam penelitian berarti menyampaikan secara terbuka kelemahan dan keterbatasan metode, pengumpulan data, serta proses penelitian, publikasi dan sebagainya. Data dilaporkan apa adanya tanpa manipulasi atau pemalsuan, dan mengubah data, serta tidak menyesatkan berbagai pihak manapun.

### 4. Objektivitas

Objektivitas dalam penelitian menekankan pelaksanaan penelitian yang bebas dari bias dan pengaruh subjektif melalui metode yang transparan, analisis data yang akurat, serta pengungkapan konflik kepentingan, sehingga hasil dan interpretasi data dapat dipertanggungjawabkan.

### 5. Kompetensi

Dalam hal ini kompetensi berarti peneliti harus mempunyai pengetahuan, serta keterampilan sesuai dengan bidang ilmiahnya. Penting untuk terus mengembangkan kemampuan, wawasan profesional melalui pendidikan serta pembelajaran berkelanjutan, serta mendorong peningkatan dalam ilmu pengetahuan secara umum.