

BAB III METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

Jenis penelitian bersifat deskriptif analisis laboratorium. Terdapat dua variabel yang digunakan yaitu variabel independen/bebas yang merupakan air belerang Natar Merak Batin Kabupaten Lampung Selatan dan air Way belerang Kalianda Kabupaten Lampung Selatan serta variabel dependen/terikat adalah Pertumbuhan jamur *Trichophyton mentagrophytes*. Pemeriksaan ini menggunakan metode difusi Kirby Bauer dengan melihat zona hambat yang terbentuk. Kontrol positif yang digunakan dalam pengujian yaitu ketokonazol dan kontrol negatif yang digunakan yaitu aquadest steril. Pengulangan dilakukan sebanyak 6 kali yang dapat dihitung dengan menggunakan rumus Freederer yaitu $(t-1)(n-1) \geq 15$.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Analisis Kesehatan Poltekkes Tanjung Karang pada bulan Mei sampai dengan bulan Juni 2021.

C. Subjek Penelitian

Subjek penelitian ini adalah air belerang, yang diambil di Kecamatan Natar Kabupaten Lampung Selatan dan Kecamatan Kalianda Kabupaten Lampung Selatan, setelah itu dilakukan pemeriksaan kadar di balai penelitian dan pengembangan industri balai riset dan standarisasi industri Bandar Lampung. Air belerang diambil dibagian tengah kolam pemandian air belerang. Obyek dalam penelitian ini adalah jamur *Trichophyton mentagrophytes*, biakan murni yang dibeli langsung di Universitas Indonesia.

D. Variabel dan Definisi Operasional

Tabel 3.1 Variabel dan Definisi Operasional

No.	Variabel	Definisi	Cara Ukur	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala
1.	Variabel bebas :	Air yang mengandung	Observasi	Gelas	1. Air	Ordinal

	Air belerang	belerang dari air panas Natar dan Way Belerang Kalianda.		ukur	belerang Natar 2. Air belerang Kalianda	
2.	Kadar air belerang	Perbandingan kadar belerang Natar dengan Way belerang Kalianda	Panjang gelombang	HPLC	1. Kadar belerang/ sulfur sebagai H ₂ S di dalam pemandian air panas Natar 2. Kadar belerang/ sulfur sebagai H ₂ S di dalam pemandian air panas Kalianda.	Ordinal
3.	Variabel terikat: <i>Trichophyton mentagrophytes</i> .	Pertumbuhan jamur <i>Trichophyton mentagrophytes</i> . yang dihambat oleh air belerang Natar dan Way belerang Kalianda.	Mengukur diameter zona hambat dengan metode difusi Kirby Bauer	Jangka sorong	Diameter zona hambat dalam kategori : 1. ≥ 22 mm daya hambat sangat kuat. 2. 11-21 mm daya hambat kuat. 3. 5-10 mm daya hambat sedang. 4. 0-4 mm daya hambat lemah (Kumalasari didalam Tanti.2019)	Ordinal

E. Teknik Pengumpulan Data

Penelitian ini adalah data primer, yang diperoleh dengan melakukan obsevasi secara langsung ke pemandian air panas Natar dan air panas Way belerang Kalianda.

1. Pengambilan Sampel

Peneliti terlebih dahulu menyiapkan alat dan bahan di Laboratorium Mikrobiologi di Jurusan Analis Kesehatan Poltekkes. Peneliti mulai melakukan pengambilan sampel dengan cara datang langsung ke Natar dengan jarak tempuh

dari Kota Bandar Lampung selama 22 menit, sedangkan Kalianda dengan jarak tempuh dari Kota Bandar Lampung selama 1 jam 30 menit, lalu sampel air belerang dimasukan kedalam botol kaca yang sudah disterilkan terlebih dahulu dan masing-masing diberi label dengan mencantumkan tanggal dan waktu pengambilan, selanjutnya di bawa ke Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Analis Kesehatan Poltekkes Tanjungkarang. Sampel air belerang dilakukan 6 kali pengulangan dengan menggunakan rumus Frederer $(t-1) (n-1) \geq 15$.

2. Metode Pemeriksaan

Metode yang digunakan yaitu Kirby Baruer.

3. Perinsip Pemeriksaan

Cakram kertas (paper disc) yang telah mengandung zat antimikroba diletakkan pada agar yang telah diinokulasi dengan mikroba uji, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C, diameter zona jernih disekitaran cakram diukur sebagai ukuran kekuatan inhibisi obat melawan organisme tertentu (Jawetz,2008).

4. Prosedur kerja

a. Persiapan alat dan bahan pemeriksaan

1) Alat :

Cawan petri, ose steril, inkubator, autoklaf, lampu spiritus, penggaris, tabung reaksi, rak tabung, pipet ukur, korek api, objek glass, kapas lidi steril, hot plate, blank disk, pinset ,jangka sorong, oven.

1) Bahan :

Aquades steril, kloramfenikol, ketokonazol, media Sabouroud Dextrose Agar (SDA), strain murni jamur *Trichopyton mentagrophytes*, air belerang Natar dan Kalianda.

2) Pembuatan antibiotik kloramfenikol

Dosis antibiotik kloramfenikol dalam larutan SDA adalah 0,4 gr/l dan dosis pelarut NaCl 0,9% dalam 250 mg kloramfenikol adalah 10 ml.

a. Satu kapsul kloramfenikol 250 mg dilarutkan ke dalam 10 ml NaCl 0,9%.

b. Sebanyak 1,6 ml campuran kloramfenikol dan NaCl 0,9% diambil sebagai dosis antibiotik pada larutan agar sabouraud (Bridson didalam Fajar, 2006).

3) Pembuatan media agar Sabouraud Dextrosa Agar (SDA)

Pembuatan media dilakukan berdasarkan petunjuk pembuatan pada botol media yaitu 65 gram serbuk media Sabouraud Dextrose Agar dalam 1000 ml aquadest dikalikan dengan volume yang dibutuhkan. Kemudian ditimbang, diaduk, lalu dipanaskan diatas hotplate sampai larut sempurna. Kemudian media disterilisasi di autoclave pada suhu 121⁰C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm. Kemudian didinginkan sampai mencapai suhu 50⁰C, ditambahkan larutan kloramfenikol. Setelah itu media dituang kedalam cawan petri yang telah disterilisasi dengan ketebalan ± 4 mm dan biarkan mengeras (Soemarno, 2000).

4) Pembuatan ketokonazol

Dihaluskan sebanyak 200 gram obat ketokonazol lalu ditambahkan dengan 10 ml alkohol dan dihomogenkan, kemudian rendam disk blank ke dalam larutan tersebut selama 15 menit, komposisi ketokonazol tiap tablet mengandung ketokonazol 200 mg (Alfiah, 2015).

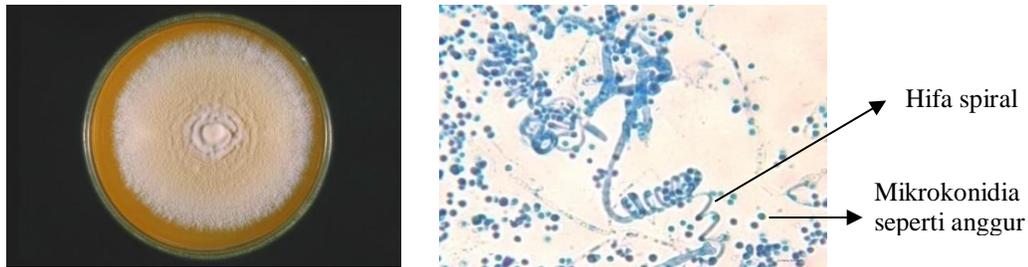
5) Uji sterilisasi media

Media yang sudah dibuat, diambil beberapa plate kemudian diinkubasi pada suhu 35-37⁰C selama 2 hari. Apabila terdapat pertumbuhan 2 koloni per plate, maka dianggap tidak steril (Soemarno, 2000).

6) Identifikasi jamur *Trichophyton mentagrophytes*

a. Pemeriksaan Makrokopis

Jamur yang sudah ditanam dimedia SDA, kemudian diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 2×24 jam lalu diamati koloni jamur *Trichophyton mentagrophytes* yang sudah tumbuh.



Sumber: 1. agefotostock.com
2. tekportal.net.

Gambar: 3.1 *Trichophyton mentagrophytes* pada media SDA dan hasil Mikroskopik *Trichophyton mentagrophytes*

Keterangan:

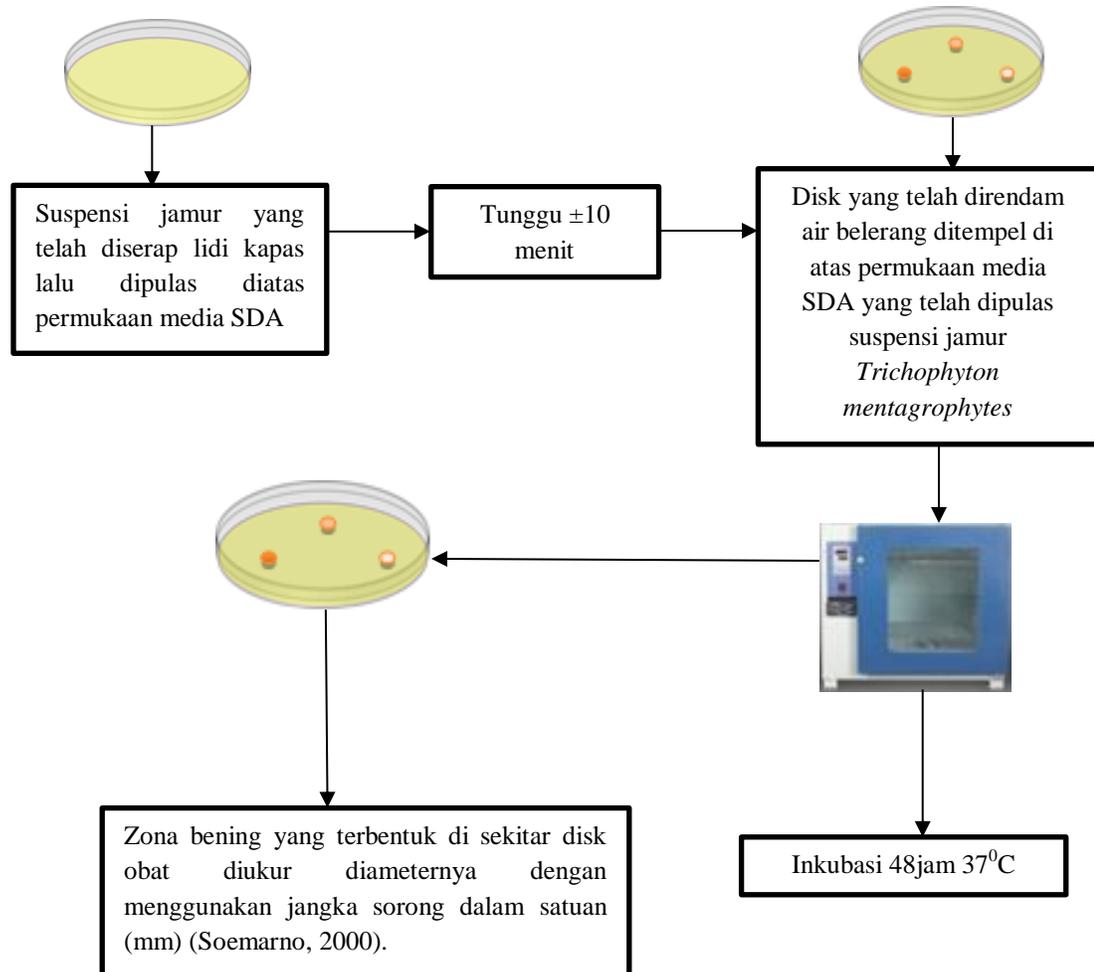
1. Koloni : Putih hingga krem dengan permukaan seperti tumpukan kapas pada PDA tidak muncul pigmen.
 2. Gambar Mikroskopik : Mikrokonidia yang bergerombol , bentuk cerutu yang jarang , terkadang hifa spiral (Eriza. 2012).
- b. Pemeriksaan Mikroskopis
- a) Diambil koloni jamur biakan media SDA yang telah ditanam sebelumnya, kemudian diletakkan pada permukaan objek glass, dibuat preparat dan ditambah NaCl 0,85% dan dihomogenkan. Kemudian di fiksasi.
 - b) Objek glas yang sudah disediakan diletakkan di rak pengecatan, lalu dilakukan pengecatan gram dengan cara Gram A ditetaskan dan didiamkan selama 1 menit, lalu dibilas dengan air mengalir, selanjutnya ditetaskan kembali dengan Gram B dan didiamkan selama 1 menit lalu dibilas dengan air mengalir, selanjutnya ditetaskan kembali dengan Gram C dan didiamkan selama 30 detik , lalu ditetaskan kembali dengan Gram D dan didiamkan selama 1 menit lalu dibilas kembali dengan air mengalir.
 - c) Keringkan dan diamati dengan mikroskop perbesaran 40x dan 100x (Yusmaniar dkk, 2017).
- 7) Pembuatan Larutan Standar Mc Farland 0,5
Dicampurkan 9,95 ml larutan H₂SO₄ 1% dengan 0,05 ml larutan BaCl₂.2H₂O 1% sehingga volume menjadi 10 ml. dikocok hingga homogen. (Soemarno, 2000).
 - 8) Pembuatan Suspensi Jamur *Trichophyton mentagrophytes*

Pembuatan suspensi jamur dilakukan di dalam LAF untuk menghindari kemungkinan terjadinya kontaminasi jamur *Trichophyton mentagrophytes* dari kontaminan yang tidak dikehendaki. Suspensi dibuat dengan cara mengambil biakan jamur *Trichophyton mentagrophytes* dari media SDA tabung miring menggunakan ose steril kemudian disuspensikan dengan 10 mL NaCl 0,9% sampai mencapai kekeruhan yang ekuivalen dengan larutan standart 0,5Mc. Farland (Volk dan Wheeler, 1993).

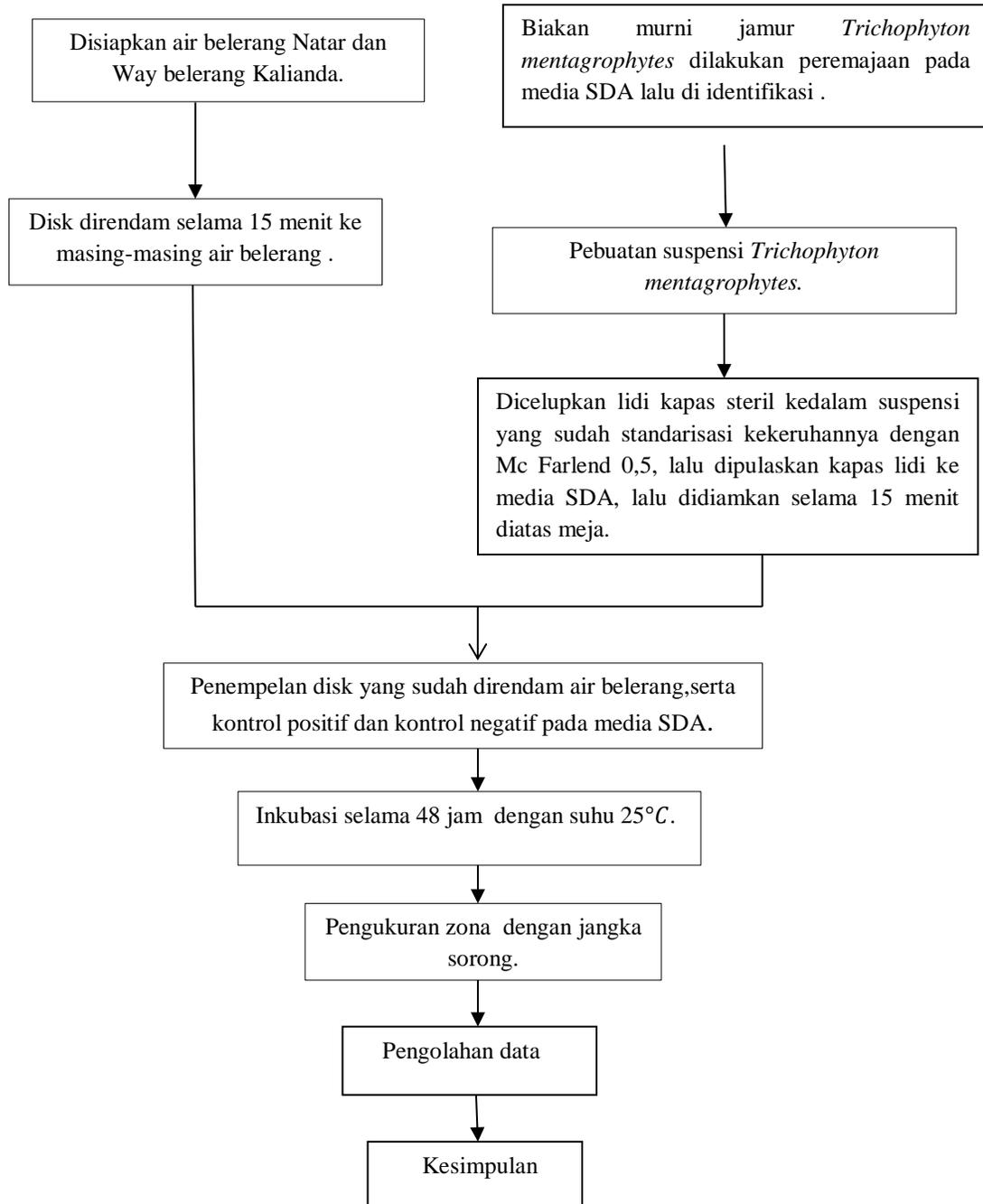
9) Pelaksanaan Uji Daya Hambat

- a) Disiapkan media agar SDA (Sabaroud Dextrose Agar) yang telah mengeras.
- b) Lidi kapas steril dicelupkan kesuspensi jamur *Trichophyton mentagrophytes* yang telah dibandingkan kekeruhannya dengan McFarland 0,5, lalu ditunggu sebentar agar jamur meresap ke dalam kapas lalu lidi kapas diangkat dan diperas kedinding tabung dengan cara menekan secara perlahan dengan diputar.
- c) Dipulaskan lidi kapas kepermukaan media SDA (Sabaroud Dextrose Agar) sampai permukaan tertutup rata dengan pulasan jamur.
- d) Media SDA (Sabaroud Dextrose Agar) dibiarkan selama 15 menit supaya jamur menyerap ke dalam media.
- e) Dist kosong direndam dengan air belerang Natar dan air belerang Kalianda, lalu kontrol positif dan kontrol negatif.
- f) Dilakukan penempelan disk di atas permukaan media SDA menggunakan pinset dengan cara sedikit ditekan sehingga cakram menempel pada media dengan masing-masing media berisi 4 cakram dengan jarak antar cakram adalah kurang lebih 15 mm.
- g) Lempeng agar diinkubasi pada suhu 25⁰C selama 3x24 jam (Jawetz, 2008).
- h) Zona jernih yang terbentuk di sekitaran disk diukur menggunakan jangka sorong sebagai diameter daya hambat air belerang Natar dan air belerang kalianda terhadap pertumbuhan jamur *Trichophyton mentagrophytes*.

Skema 3.1 Uji difusi



Skema 3.2 Alur penelitian



F. Pengolahan Data dan Analisis Data

1. Pengolahan Data

Data yang diperoleh dengan cara:

- a. Dilakukan dengan cara pengambilan air belerang di Kecamatan Natar Kabupaten Lampung Selatan dan Kecamatan Kalianda Kabupaten Lampung Selatan., terhadap daya hambat jamur *Trichophyton mentagrophytes*.
- b. Dilakukan pengukuran zona hambat dari masing masing air belerang dengan menggunakan alat ukur jangka sorong dan dengan satuan mm.
- c. Zona hambat yang diperoleh disajikan dalam bentuk tabel.

2. Analisis data

Data berupa diameter zona hambat pada masing-masing air belerang dianalisis menggunakan uji T dengan melihat perbedaan nilai rata-rata zona hambat pada masing-masing air panas Natar dan Way Belerang Kalianda. Data yang diperoleh kemudian diolah menggunakan Uji T Independen, untuk melihat apakah ada atau tidaknya perbedaan yang signifikan pada kedua variabel tersebut , dengan kontrol negatif Aquades dan kontrol positif Ketokonazol .

G. Ethical Clearance

Penelitian ini menggunakan tempat wisata air belerang, sehingga perlu secara etik dengan menyerahkan naskah skripsi ke komite Etik Politeknik Kesehatan Tanjungkarang untuk dinilai kelayakannya. Subyek tempat wisata air belerang diberikan penjelasan mengenai maksud dan tujuan penelitian, hal tersebut dalam bentuk lisan maupun tertulis. Limbah yang dihasilkan dari proses penelitian akan dikumpulkan dan dimusnakan dalam penanganan limbah. Limbah media plate serta limbah suspense jamur *Trichophyton mentagrophytes* pada tabung dimusnakan dengan cara perebusan pada suhu 100°C selama 30 menit, limbah suspense jamur *Trichophyton mentagrophytes* yang telah direbus dibuang pada saluran pembuangan, lalu plate dan tabung direbus kembali dengan penambahan detergen, setelahh itu air bekas rebusan plate dan tabung dibuang pada saluran pembuangan, plate dan tabung dicuci menggunakan detergen pada air mengalir. Seluruh biaya penelitian ditanggung oleh peneliti.