

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

Penelitian bersifat eksperimen dengan desain Statistic Group Comparison. Variabel bebas yaitu media bekatul beras putih (*Oryza sativa l*) dengan konsentrasi 50%, 55%, 60%, 65%, 70% dan sebagai kontrol adalah media PDA (*Potato dextrose agar*). Variabel terikat yaitu pertumbuhan jamur *Candida albicans*. Penanaman jamur menggunakan metode *Spread Plate* untuk menghitung jumlah koloni pada media. Pengulangan dilakukan sebanyak 4 kali yang didapatkan dari perhitungan menggunakan rumus Federer, yaitu $(t-1)(r-1) \geq 15$.

Keterangan :

t : treatment (perlakuan)

r : replikasi (pengulangan)

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Parasitologi dan Bakteriologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Tanjungkarang.

2. Waktu

Penelitian ini dilakukan pada bulan Mei-Juni 2023.

C. Subyek Penelitian

Subjek penelitian ini adalah media alternatif bekatul beras putih (*Oryza sativa l*) dan media PDA (*Potato dextrose agar*). Pengambilan sampel dengan random sampling memilih sampel secara acak tanpa memperhatikan jenis bekatul yang diambil dari tempat penggilingan padi. Jamur *Candida abicans* didapatkan dari strain murni Laboratorium Parasitologi Klinik Universitas Indonesia yang dilakukan peremajaan di Laboratorium Parasitologi Politeknik Kesehatan Tanjungkarang.

D. Variabel dan Definisi Operasional

Tabel 3.1 Definisi Operasional

No.	Variabel	Definisi	Alat Ukur	Cara Ukur	Hasil	Skala Ukur
1.	Variabel Bebas	Media yang digunakan untuk pertumbuhan jamur <i>Candida albicans</i> . komposisi media PDA yaitu, Potato, Dextrose, Agar				
	a. Media PDA (<i>Potato dextrose agar</i>)		Neraca analitik	Penimbangan	Media PDA	Nominal
	b. Media bekatul beras putih (<i>Oryza sativa l</i>)	Media yang digunakan sebagai media pertumbuhan jamur <i>Candida albicans</i> yang terbuat dari Bekatul Beras Putih, Dextrose dan Agar, dengan variasi konsentrasi 50%, 55%, 60%, 65%, 70%	Neraca analitik	Penimbangan	Media BDA Konsentrasi 50%, 55%, 60%, 65%, 70%	Ordinal
2.	Variabel terikat Pertumbuhan <i>Candida albicans</i>	Jamur <i>Candida albicans</i> yang tumbuh pada media PDA dan bekatul berasputih	Colony counter	Menghitung jumlah koloni yang tumbuh dengan colony counter	Jumlah Koloni Cfu/ml	Ratio

E. Pengumpulan Data

1. Prosedur Penelitian

- a. Pengajuan Kode etik
- b. Pembuatan surat izin penelitian di Laboratorium Parasitologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis
- c. Pemesanan strain jamur *Candidaalbicans* di Laboratorium Parasitologi Klinik Universitas Indonesia
- d. Mempersiapkan peralatan dan bahan yang digunakan dalam penelitian.

e. Menentukan pengulangan menggunakan rumus Federer

Keterangan:

t : treatment (perlakuan)

r : replikasi (pengulangan)

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

$$(6-1)(r-1) \geq 15$$

$$(5)(r-1) \geq 15$$

$$5 \geq 15+5$$

$$r \geq 20/5$$

$$r \geq 4$$

f. Peremajaan strain jamur *Candida albicans*

- 1) strain jamur *Candida albicans* diremajakan dimedia PDA.
- 2) Diambil 1 ose stok *Candida* goreskan secara zig-zag inkubasi pada suhu 37 °C selama 48 jam
- 3) Melakukan pewarnaan gram pada koloni, kemudian diamati morfologi *Candida albicans* dibawah mikroskop dimulai dari perbesaran rendah (10x10) sampai perbesaran tinggi (10x100).

Hasil: *Candida albicans* dengan pewarnaan gram tampak sel dengan sifat gram positif, berbentuk oval dan ditemukan blastospora.

- 4) Uji Germ Tube
 - a) Pipet Putih Telur ± 1ml masukan ke dalam tabung
 - b) Masukan 1 ose Koloni *Candida albicans* kedalam tabung kocok perlahan agar koloni tercampur
 - c) Tutup tabung dengan kapas, Inkubasi dengan suhu 37C selama 2-3 jam.
 - d) Setelah diinkubasi diambil 1 ose lalu letakan ke kaca objek glass kemudan tutup dengan deck glass lalu amati dibawah mikroskop perbesaran 100x

Hasil : + Bila ditemukan pertumbuhan hifa seperti kecambah yang berbentuk raket (Mulyati & Wahyuningsih, 2019).

2. Metode Pemeriksaan

Metode pemeriksaan menggunakan metode *Spread Plate*

3. Prinsip Pemeriksaan

Diinokulasikan suspensi jamur pengenceran 10^3 dengan cara menuangkan 0,1 ml kedalam media lalu disebar menggunakan batang L (drigalski).

4. Cara Kerja

a. Tahap persiapan Alat dan Bahan

- 1) Alat : Autoklaf, Batang pengaduk, Cawan Petri, Alumunium foil, Pipet ukur, Corong glass, Erlenmeyer 250 ml, Beaker Glass 250ml, Tabung reaksi, Gelas ukur 100 ml, Mikropipet 1000ul dan 100ul, pipet ukur 1 ml, pipet volume 10 ml, Hotplate, Colony Counter, inkubator, Objek glass, Kain kasa, Deck glass, objek glass, pipet tetes, Kapas, spatula, Drigalski, Kertas kopi, Lakban, Oven, Lampu spritus, Korek api, Ose jarum, Mikroskop, Neraca elektrik, Spidol dan Label.
- 2) Bahan : jamur *Candida albicans* yang sudah diremajakan di media PDA, media PDA (*Potato dextrose agar*), Bekatul beras putih (*Oryza sativa l*), Dextrose, Agar batang, NaCl 0,85%, H₂SO₄ 1%, BaCl₂ 1%, Pewarna Gram, Antibiotik chloramphenicol.

b. Sterilisasi alat

Alat-alat yang akan digunakan disiapkan, dibungkus menggunakan kertas kopi, disterilisasikan dalam oven menggunakan suhu 160°C selama 60 menit (Soemarno, 2000).

c. Pembuatan media alternatif Bekatul dextrose agar

- 1) Menyiapkan alat dan bahan yang akan digunakan
- 2) Bekatul beras putih, dextrose dan agar ditimbang sesuai konsentrasi 50%, 55%, 60%, 65%, 70%

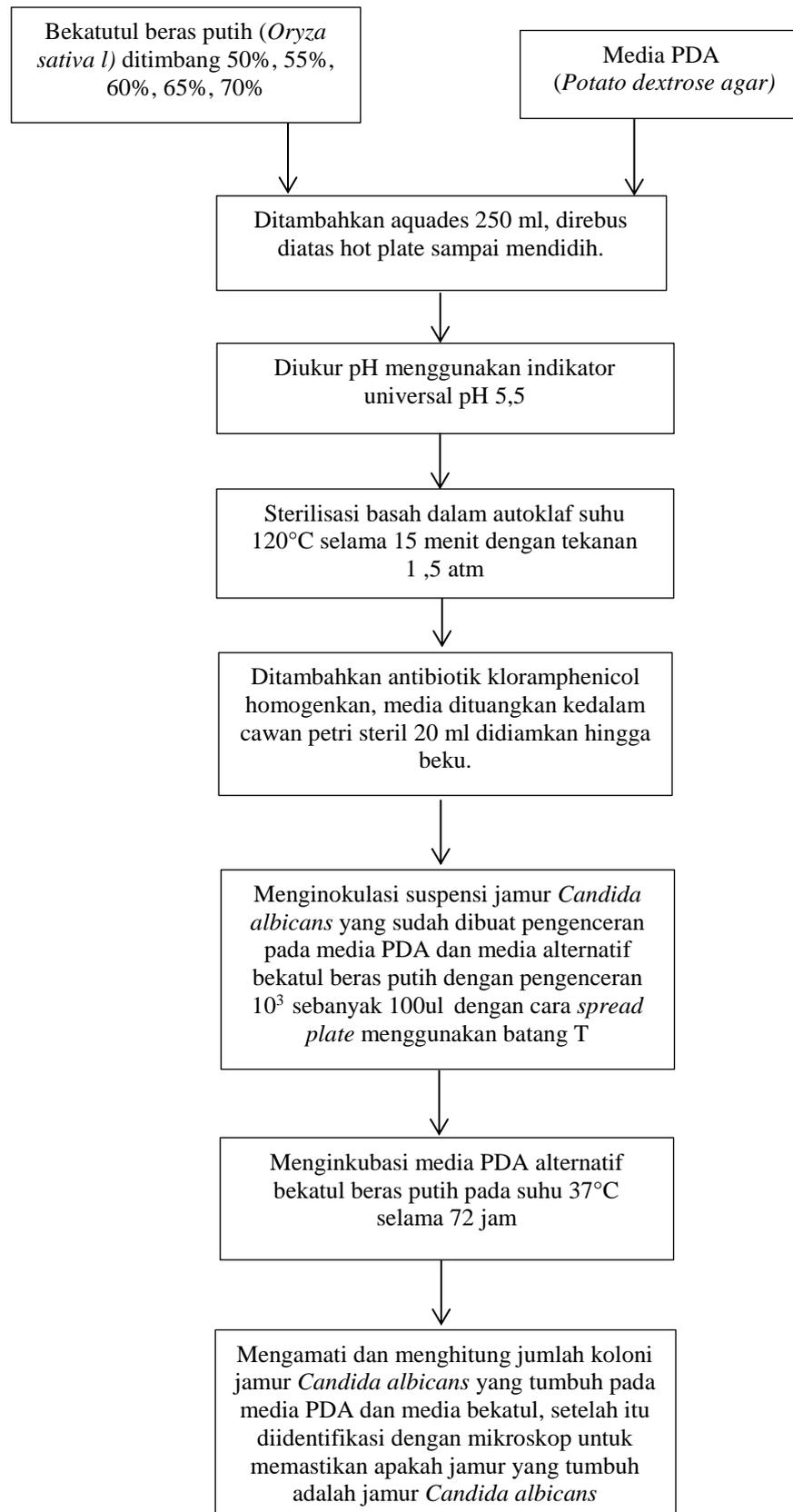
Tabel 3.2 Komposisi berat media Bekatul Dextrose Agar

No	Konsentrasi (gr)	Bekatul beras putih (gr)	Dextrose (gr)	Agar (gr)
1.	50%	0,5	2,5	1,875
2.	55%	0,55	2,75	2,062
3.	60%	0,6	3	2,25
4.	65%	0,65	3,25	2,437
5.	70%	0,7	3,5	2,625

- 3) Ditambahkan aquades sebanyak 250 ml, lalu direbus diatas hot plate hingga mendidih.
 - 4) Lalu diukur pH nya menggunakan indikator universal, $\text{pH} \pm 5,5$.
 - 5) Dipanaskan kembali hingga homogen, kemudian diangkat dan erlenmeyer ditutup dengan menggunakan kapas yang telat dibungkus alumunium foil.
 - 6) Media disterilisasi basah dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1,5 atm.
 - 7) Didiamkan hingga suhunya turun, kemudian ditambahkan antibiotik kloramfenikol kemudian dihomogenkan.
 - 8) Media BDA (*Bekatul dextrose agar*) dituangkan ke dalam cawan petri steril masing-masing 20 ml secara aseptis, didiamkan hingga beku.
 - 9) Inkubasi 24 jam dengan suhu 37°C .
- d. Pembuatan media PDA (*Potato dextrose agar*).
- 1) Menyiapkan alat dan bahan yang akan digunakan
 - 2) Ditimbang bubuk PDA menggunakan neraca analitik sebanyak 9,75 gram masukan ke dalam erlenmeyer, lalu ditambah 250 ml aquades.
 - 3) Media dipanaskan sampai mendidih agar tercampur dengan sempurna dan diukur pH nya menggunakan indikator universal, $\text{pH} \pm 5,5$.
 - 4) Media disterilisasi di dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1,5 atm.
 - 5) Larutan didiamkan hingga suhu turun kemudian ditambah antibiotik kloramfenikol lalu dihomogenkan.
 - 6) Dituangkan media PDA kedalam cawan petri steril 20 ml secara aseptis dan homogenkan.
 - 7) Inkubasi 24 jam dengan suhu 37°C .
- e. Pembuatan larutan standar kekeruhan 0,5 unit Mc Farland.
- 1) Menyiapkan alat dan bahan yang akan digunakan.
 - 2) Disiapkan 1 tabung reaksi steril.
 - 3) Dipipet larutan BaCl_2 1% sebanyak 0,05 ml ke dalam tabung.
 - 4) Ditambahkan larutan H_2SO_4 1% 99,5 ml, homogenkan dengan Vortex.

- 5) Ditunggalkan rapat agar tidak menguap, jika ingin disimpan maka disimpan di ruang gelap dengan suhu kamar, jika ingin digunakan secara langsung dikocok terlebih dahulu (Soemarno, 2000).
- f. Pembuatan NaCl 0,85%
- NaCl sebanyak 0,85 gram ditimbang kemudian dilarutkan dalam aquades steril sebanyak 100 ml lalu dihomogenkan. (Suhartati & Virgianti, 2015)
- g. Pembuatan suspensi jamur *Candida albicans*
- 1) Diambil 1 ose koloni dari media subkultur
 - 2) Disuspensikan jamur ke dalam NaCl steril lalu dibandingkan kekeruhannya dengan standar Mc Farland
- h. Pengenceran dan penanaman jamur *Candida albicans*
- 1) Dengan pipet steril dipipet suspensi sebanyak 1000ul lalu dimasukkan ke dalam tabung yang berisi 9 ml NaCl sehingga didapatkan pengenceran 10^1 , Homogenkan.
 - 2) Dipipet 1000ul dari tabung pengenceran 10^1 kemudian dipindahkan ke dalam tabung 10^2 didapatkan pengenceran 10^2 .
 - 3) Lakukan pengenceran sampai pengenceran 10^3 .
 - 4) Penanaman/inokulasi pengenceran 10^3 diambil sebanyak 100ul dengan mikropipet kemudian diteteskan di atas permukaan media dan disebar dengan menggunakan drigalski/batang L.
 - 5) Diinkubasi selama 72 jam pada suhu 37°C dalam inkubator (Ramadhani, 2020).
- i. Perhitungan koloni
- 1) Dilakukan perhitungan jumlah koloni yang tumbuh pada media PDA dan media alternatif Bekatul Dextrose Agar disetiap pengulangan dengan konsentrasi 50%, 55%, 60%, 65%, 70% dihitung menggunakan Colony Counter pada hari ke 3.
 - 2) Catat hasil jumlah koloni PDA dan media alternatif bekatul konsentrasi 50%, 55%, 60%, 65%, 70% pada setiap pengulangan sebanyak 4x.

5. Skema



F. Pengolahan dan Analisis Data

a. Pengolahan Data

Data diperoleh dengan cara :

1. Menghitung jumlah koloni *Candida albicans* yang tumbuh pada media kontrol PDA dan media bekatul beras putih 50%, 55%, 60%, 65%, 70% menggunakan colony counter.
2. Dihitung rata-rata jumlah koloni yang tumbuh pada setiap pengulangan 1- 4.

b. Analisis Data

Analisis data yang digunakan adalah analisis data univariat dan bivariat.

1. Analisis Univariat berupa data jumlah koloni pertumbuhan jamur *Candida albicans* terhadap variasi konsentrasi 50%, 55%, 60%, 65%, 70% dan PDA (*Potato dextrose agar*) sebagai kontrol dengan pengulangan sebanyak 4 kali kemudian diakumulasikan dan dihitung rata-ratanya.
2. Analisis Bivariat berupa data hasil rata-rata jumlah koloni yang dianalisis dengan *One Way Anova*. Jika ada perbedaan yang signifikan maka dilanjutkan dengan uji BNT beda nyata dengan taraf kesalahan 5%.

G. Ethical Clearence

Penelitian ini dilakukan atas izin komisi etik dengan No.240/KEPK-TJK/III/2023. Penelitian ini tidak akan menimbulkan bahaya bagi lingkungan, limbah dari proses penelitian dikumpulkan dan dimusnahkan dalam penanganan limbah.

Limbah dari pembuatan media PDA (*Potato dextrose agar*) dan Bekatul beras putih (*Oryza sativa l*) maupun sisa dari perebusan pembuatan media ditangani dengan cara langsung di buang pada saluran pembuangan, karena tidak membahayakan lingkungan. Limbah media setelah dilakukan pengamatan selama 3 hari serta limbah suspensi jamur *Candida albicans* pada tabung dimusnahkan dengan cara perebusan pada suhu 100°C selama 30 menit, air bekas rebusan limbah dibuang pada saluran pembuangan, lalu plate dan tabung sehabis penelitian dicuci dengan deterjen di air mengalir.