

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimen dengan desain penelitian yaitu *Statistic Group Comparison*, peneliti melakukan kegiatan pengumpulan data berdasarkan hasil pengamatan dan dokumentasi dari setiap proses penelitian yang dilakukan. Terdapat dua variabel yaitu variabel bebas yaitu media alternatif sukun (*Artocarpus altilis*) dengan konsentrasi 60%, 65%, 70% ,75%, 80% dan variabel terikat yaitu pertumbuhan jamur *Candida albicans*. Sebagai kontrol adalah media PDA (*Potato Dextrose Agar*). Pemeriksaan menggunakan metode *spread plate* dan melihat jumlah koloni pada media. Pengulangan dilakukan sebanyak 4 kali yang diperoleh dari perhitungan menggunakan rumus Federer, yaitu $(t-1)(r-1) \geq 15$.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikologi dan Laboratorium Bakteriologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Politeknik Kesehatan Tanjungkarang pada bulan April-Mei 2023

C. Subyek Penelitian

Subyek penelitian ini adalah media pertumbuhan jamur. Media yang digunakan yaitu media kontrol PDA (*Potato Dextrose Agar*) dan media alternatif sukun (*Artocarpus altilis*).

PDA (*Potato Dextrose Agar*) yang digunakan untuk penelitian ini adalah media PDA (*Potato Dextrose Agar*) instan MERCK memiliki nomor katalog 1.10130.0500 sedangkan media alternatif yang digunakan adalah media berasal dari sukun (*Artocarpus altilis*). Sukun (*Artocarpus altilis*) yang dipilih dengan yang bagus dan tua, dengan ciri-ciri kulit buah berwarna kuning kehijauan dan daging buah berwarna putih kekuningan (Widianawati, 2022) dengan ukuran diameter 54cm dan berat 700 gram dibuat menjadi tepung lalu buat media dengan konsentrasi 60%, 65%, 70% 75% dan 80%. Jamur *Candida albicans* didapatkan dari Laboratorium Parasitologi Falkutas Kedokteran di Universitas Indonesia.

D. Variabel dan Definisi Operasional Penelitian

Tabel 3.1 Definisi Operasional

No.	Variabel	Definisi	Alat Ukur	Cara Ukur	Hasil Ukur	Skala
1. Variabel bebas :						
a.	Media PDA	Media untuk pertumbuhan jamur <i>Candida albicans</i> .	Neraca elektrik	Penimbangan	Media dalam %	Rasio
b.	Media alternatif dari sukun	Media sukun yang terbuat dari tepung sukun dipilih yang bagus dan tua, dengan ciri-ciri kulit buah berwarna kuning kehijauan dan daging buah berwarna putih kekuningan (Widianawati, 2022) ukuran diameter 54 cm dan berat 700 gram lalu dicampurkan dengan dextrose dan agar dengan konsentrasi 60%, 65%, 70% , 75% dan 80%	Neraca Elektrik	Penimbangan	Media dalam %	Rasio
2. Variabel terikat :						
	Pertumbuhan <i>Candida albicans</i>	Jamur yang tumbuh dimedia PDA dan media sukun berwarna putih, permukaan licin, berbentuk bulat atau lonjong disertai bau khas ragi.	Colony counter	Dihitung pertumbuhan koloni <i>Candida albicans</i> pada plate.	Jumlah koloni: CFU/ml	Rasio

E. Pengumpulan Data

1. Pendahuluan

- a. Pembuatan surat izin penelitian dan pemesanan strain jamur *Candida albicans* ke Laboratorium Parasitologi Falkutas Kedokteran di Universitas Indonesia.
- b. Melakukan persiapan peralatan dan bahan yang akan digunakan dalam penelitian.
- c. Menentukan jumlah sampel penelitian.

- d. Pengulangan dilakukan sebanyak 4 kali. Untuk menentukan jumlah pengulangan digunakan rumus Federer, yaitu:

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

Keterangan:

t : treatment (Perlakuan)

r : replikasi (Pengulangan)

2. Prosedur Pemeriksaan

- a. Batang pengaduk, Autoklaf, Aluminium foil, Cawan petri, Corong gelas, Erlenmeyer 250 ml, Gelas kimia 250 ml, Gelas ukur 100 ml, Blender, Hot plate, Indikator universal, Inkubator, Colony counter, Kaca Objek, Kaca penutup, Kain kasa, Kapas, Kertas kopi, Lakban, Lampu spiritus, Mikroskop, Neraca elektrik, Oven, Pengaduk L, Spidol.
- b. Koloni *Candida albicans*. Media PDA, Tepung Sukun, Dextrose, Agar-agar, Antibiotik Chloramphenicol, aquades, NaCl 0,90%, standar Mc. Farland 0,5

3. Metode Pemeriksaan

Metode spread plate

4. Prinsip Penelitian

Menumbuhkan mikroorganisme didalam media agar dengan menuangkan jamur dimedia agar yang telah padat.

5. Cara Kerja

a. Sterilisasi Alat

Peralatan gelas yang dipakai dalam penelitian ini dibersihkan dan dikeringkan secara menyeluruh, setelah itu peralatan dibungkus dengan kertas kopi dan disterilkan pada oven pada suhu 160°C selama 60 menit (Soemarno, 2000).

b. Pembuatan Larutan Standar Mc Farland 0,5

Dicampur 9,95 ml larutan H₂SO₄ 1% dengan 0,05 ml larutan BaCl₂·2H₂O 1% sehingga volume 10 ml. dikocok hingga homogen (Gesar dan Sasongkawat, 2015).

- c. Pembuatan NaCl 0,85 % dengan cara menimbang NaCl 0,85 gram, kemudian ditambahkan 100 ml aquadest steril, kemudian homogenkan.
- d. Pembuatan suspensi *Candida albicans* (kepadatan jamur 1×10^7 CFU/ml)
 - 1) Dambil koloni *Candida albicans* diambil menggunakan ose tumpul yang sudah dipanaskan .
 - 2) Disuspensikan ke dalam NaCl 0,90% steril (5 ml), lalu dibandingkan dengan standar kekeruhan 0,5 Mc Farland jika suspensi terlalu keruh tambahkan dengan NaCl 0,85% hingga memiliki tingkat kekeruhan sama.
 - 3) Dipipet suspensi jamur 1×10^7 tadi sebanyak 1 ml, lalu di campurkan ke dalam tabung yang telah di isi 9 ml NaCl 0,85% steril, sehingga didapatkan kepadatan 1×10^6 .
 - 4) Dipipet suspensi dari 1×10^6 sebanyak 1 ml, lalu di campurkan ke dalam tabung yang telah di isi 9 ml NaCl 0,85% steril, sehingga didapatkan kepadatan 1×10^5 .
 - 5) Dipipet suspensi dari 1×10^5 sebanyak 1 ml, lalu di campurkan ke dalam tabung yang telah di isi 9 ml NaCl 0,85% steril, sehingga didapatkan kepadatan 1×10^4 .
 - 6) Dipipet suspensi dari 1×10^4 sebanyak 1 ml, lalu di campurkan ke dalam tabung yang telah di isi 9 ml NaCl 0,85% steril, sehingga didapatkan kepadatan 1×10^3 (Jiwintarum dkk., 2017).
- e. Pembuatan Media Alternatif Sukun
 - 1) Dipilih sukun yang bagus dan tua, dengan ciri-ciri kulit buah berwarna kuning kehijauan dan daging buah bewarna putih kekuningan.
 - 2) Dikupas buah sukun, lalu mencuci bersih buah sukun.
 - 3) Kemudian sukun dipotong tipis, lalu dijemur menggunakan sinar matahari hingga kering.
 - 4) Setelah itu sukun digiling sampai halus menggunakan blender, jika sudah halus dilakukan diayak.

5) Sukun yang telah diayak ditimbang sebanyak :

Tabel 3.2 Total Berat Tepung Sukun Yang Ditimbang

Konsentrasi	60%	65%	70%	75%	80%
Sukun	0,60 g	0,65 g	0,70 g	0,75 g	0,80 g

Masukkan masing-masing kedalam erlenmeyer 250 ml

6) Kemudian masing-masing ditambahkan dextrose dan agar sebanyak:

Tabel 3.3 Total Berat Agar dan Dextrose yang ditimbang

Konsentrasi	60%	65%	70%	75%	80%
Agar	2,25 g	2,44 g	2,63 g	2,83 g	3,00 g
Dextrose	3,00 g	3,25 g	3,50 g	3,75 g	4,00 g

7) Tambahkan 250 ml aquades, kemudian direbus diatas hot plate hingga mendidih.

8) Kemudian mengukur pH menggunakan indikator universal, jika pH terlalu basa dapat menambahkan beberapa tetes HCl 0,01 N dan apabila pH terlalu asam dapat menambahkan beberapa tetes NaOH 0,01 N, diukur lagi pH hingga $\text{pH} \pm 5,5$.

9) Panaskan lagi sampai homogen, lalu diangkat dan erlenmeyer ditutup aluminium foil yang di isi dengan kapas.

10) Sterilisasi media ke dalam autoklaf di suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1,5 atm.

11) Biarkan dingin, tambahkan 2,5 ml antibiotik klorampenikol dan homogenkan.

12) Tuangkan media sukun ke dalam cawan petri steril masing-masing sebanyak 15 – 20 ml secara aseptis, didiamkan hingga media beku.

f. Pembuatan Media PDA

1) Ditimbang sebanyak 9,75 gram bubuk PDA lalu masukkan kedalam erlenmeyer.

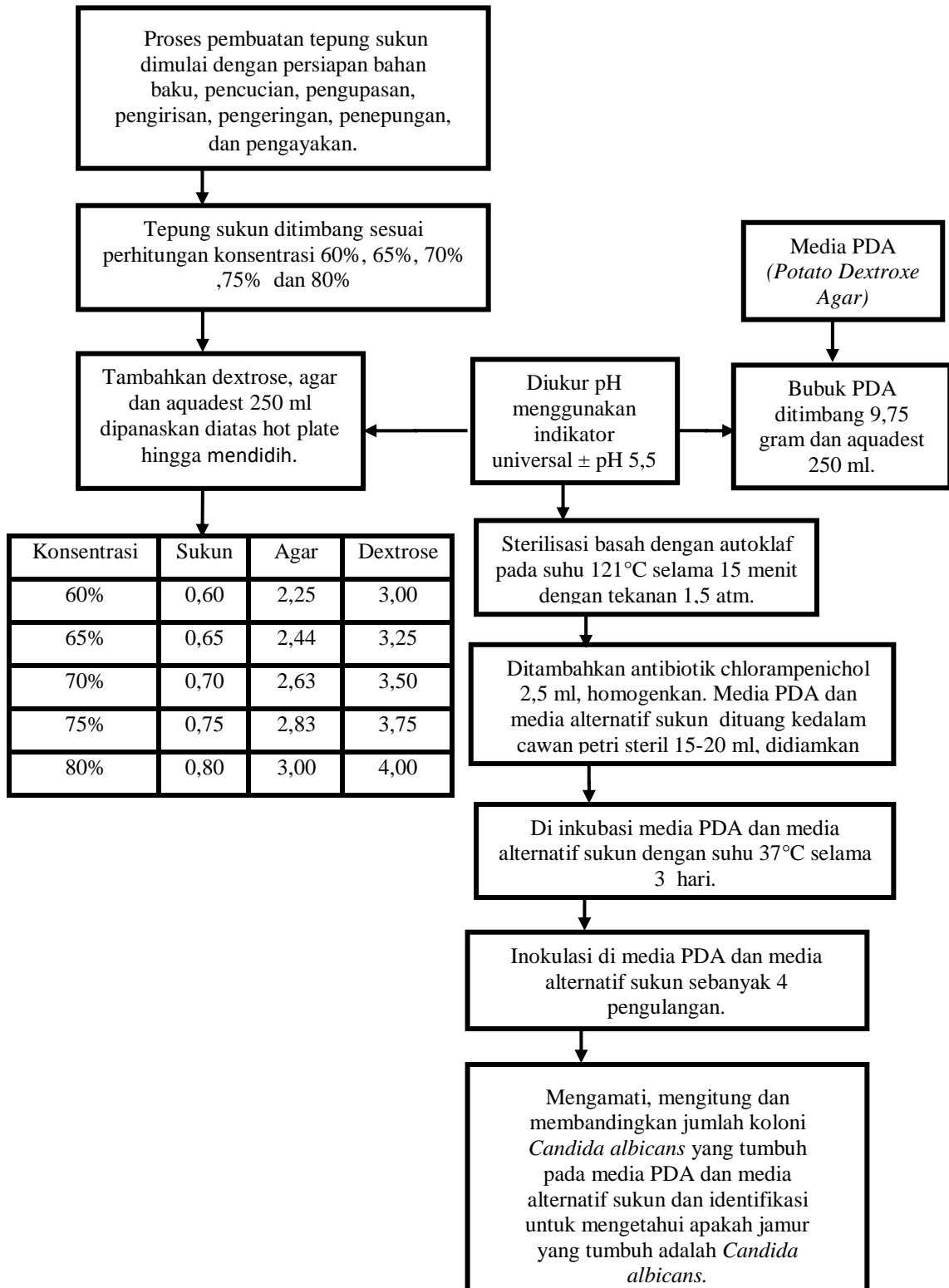
2) Kemudian ditambahkan 250 ml aquades.

3) Panaskan hingga mendidih dan aduk rata selama 1 menit.

- 4) disterilisasi didalam di autoklaf 15 menit pada suhu 121 °C, tekanan 1,5 atm.
 - 5) Larutan didiamkan hingga suhu menurun, lalu ditambah antibiotik chlorampenicol 2,5 ml, kemudian aduk rata.
 - 6) Tuang media PDA secara aseptik ke dalam cawan petri steril 15-20 ml dan simpan hingga beku (Safitri dan Novel, 2010).
- g. Uji Penelitian
- 1) Jamur *Candida albicans* diinokulasi pada media alternatif sukun dan media PDA secara aseptik dengan metode spread plate kemudian inkubasi di inkubator dengan suhu 37°C.
 - 2) Banyaknya koloni jamur *Candida albicans* pada media PDA dan media alternatif sukun dengan konsentrasi 60%, 65%, 70%,75% dan 80% di hitung menggunakan colony counter setiap 24 jam selama 3 hari.
- h. Uji Penegasan Pengecetan Gram
- 1) Menyiapkan 2 kaca objek glass.
 - 2) Diambil 1 ose koloni terpisah dari media alternatif sukun dan 1 ose koloni dari media PDA.
 - 3) Dilakukan pewarnaan gram dengan meneteskan gram A diamkan hingga 1 menit, kemudian dibilas dengan air yang mengalir. Teteskan gram B didiamkan selama 1 menit, lalu bilas dengan air mengalir. Kemudian teteskan gram C diamkan hingga 30 detik. Kemudian teteskan gram D didiamkan hingga 1 menit, lalu bilas dengan air mengalir.
 - 4) Kemudian melakukan pengamatan morfologi jamur dibawah mikroskop dimulai dari perbesaran 10x hingga 100x (Soemarno, 2000)
- i Uji Penegasan *Grem Tube*
- 1) Pipet 1 ml telur putih masukkan ketabung reaksi
 - 2) Ambil kolini 1 ose dari media alternatif lalu campurkan kedalam putih telur.

- 3) Tabung ditutup dengan kapas dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 2-3 jam.
- 4) Sediaan diperiksa di bawah mikroskop dengan pembesaran 100×(Mulyati, 2019)

1. Skema Kerja



F. Pengolahan dan analisis data

1. Pengolahan Data

Data diperoleh dengan cara:

- a. Menghitung koloni dihitung dalam satuan CFU/ml.
- b. Menghitung koloni ditentukan pada hari ke-tiga dengan menghitung koloni pada media.
- c. Dihitung jumlah jamur yang tumbuh dicawan petri masing-masing dengan menggunakan colony counter.
- d. Dihitung rata-rata jumlah koloni per cawan petri pada pengulangan 1-4.
- e. Mengolah dan menyajikan data yang diperoleh.

2. Analisis Data

Data yang digunakan berupa analisis univariat dan bivariat.

- a. Analisis univariat adalah data yang berupa jumlah koloni pertumbuhan jamur *Candida albicans* di media sukun (*Artocarpus altilis*) terhadap variasi konsentrasi 60%, 65%, 70%, 75% dan 80% dan media PDA (*Potato Dextrose Agar*) dengan pengulangan sebanyak 4 kali kemudian diakumulasikan dan dihitung rata-ratanya.
- b. Analisis bivariat adalah data yang berupa hasil rata-rata jumlah koloni *Candida albicans* dianalisis dengan uji *One Way Anova*. Apabila ada perbedaan yang signifikan rata-rata jumlah koloni *Candida albicans*, maka dilanjutkan dengan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) dengan taraf kesalahan 5%.

G. Ethical Clearance

Penelitian yang dilakukan atas izin komisi etik, sehingga perlu dilakukan proses secara etik dan menyerahkan naskah skripsi ke Komite Etik Poltekkes Tanjung Karang untuk dinilai kelayakannya.

Penelitian ini tidak akan menimbulkan bahaya bagi lingkungan, limbah yang dihasilkan dalam proses penelitian ini akan dikumpulkan dan dimusnahkan dalam penanganan limbah. Limbah larutan yang dihasilkan dari pembuatan media PDA (*Potato Dextrose Agar*) dan sukun (*Artocarpus altilis*) serta sisa dari air perebusan pembuatan media tersebut

diolah dengan cara pembuangan langsung pada saluran pembuangan limbah, dikarenakan limbah larutan tidak membahayakan lingkungan.

Limbah media plate PDA (*Potato Dextrose Agar*) dan media sukun (*Artocarpus altilis*) setelah melakukan observasi selama 3 hari dimusnahkan dengan melakukan perebusan plate pada suhu 100°C selama 30 menit, air bekas perebusan dibuang pada saluran pembuangan, lalu plate dicuci dengan sabun pada air mengalir.