

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian yang dilakukan oleh peneliti bersifat eksperimen dengan rancangan desain penelitian RAL (Rancangan Acak Lengkap). Peneliti melakukan pengumpulan data berdasarkan hasil pengamatan, kepustakaan, dan dokumentasi dari setiap hasil yang dilakukan oleh penelitian. Terdapat dua variabel yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu *jack bean* dengan konsentrasi 60%, 70% , 80%, 90%, dan 100% yang dicampur dengan *Sucrose* sebagai variabel bebas, serta pertumbuhan jamur *Candida albicans* yang ditandai dengan jumlah koloni yang tumbuh sebagai variabel terikat. Penanaman *Candida albicans* menggunakan metode *spread plate* dengan PDA sebagai kontrol positif. Pengulangan dilakukan sebanyak 4 kali yang didapatkan dari perhitungan rumus Federer, yaitu $(t-1)(r-1) \geq 15$.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Parasitologi dan Bakteriologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang, dan dilakukan determinasi di Laboratorium Botani II Jurusan F.MIFA Biologi Universitas Lampung pada bulan April 2024.

C. Subyek Penelitian

Subyek pada penelitian yang dilakukan peneliti adalah media alternatif JBSA dan PDA. Media PDA yang digunakan adalah media instan dengan nomor katalog. Sedangkan untuk media alternatif yang digunakan adalah *jack bean* yang sudah tua kering dari pohonnya, tidak busuk, tidak tengik, dan tidak berulat (Damayanti dkk, 2019) dan menggunakan alternatif *sucrose*. *Jack bean* dijadikan tepung, kemudian dibuat media alternatif dengan konsentrasi *jack bean* 60%, 70%, 80%, 90%, hingga konsentrasi 100% yang dicampur dengan *sucrose* dan agar. Jamur *Candida albicans* yang didapat dari UPTD Balai Laboratorium Kesehatan Provinsi Lampung dan dilakukan peremajaan di Laboratorium Parasitologi Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang.

D. Variabel Dan Definisi Operasional Penelitian

Tabel 3.1 Definisi Operasional

No.	Variabel	Definisi	Cara Ukur	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala ukur
1.	Variabel bebas :					
	a. Media PDA	Media yang digunakan untuk perkembangbiakan <i>Candida albicans</i> . Media alternatif	Penimbangan	Neraca analitik	Media PDA	Nominal
	b. Media alternatif JBSA	yang dibuat dari tepung <i>jack bean</i> konsentrasi 60% , 70%, 80%, 90%, hingga 100% yang dicampur dengan <i>sucrose</i> dan agar.	Penimbangan	Neraca analitik	Media JBSA konsentrasi <i>jack bean</i> 60% , 70%, 80%, 90%, dan 100%.	Ordinal
2.	Variabel terikat:					
	Pertumbuhan <i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i> yang tumbuh pada media alternatif JBSA dan konvensional PDA.	Dihitung jumlah koloni dengan <i>colony counter</i>	<i>Colony counter</i>	Jumlah koloni <i>Candida albicans</i> cfu/mL	Rasio

E. Pengumpulan Data

1. Pendahuluan

- a. Mengajukan kode etik ke komisi etik Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang.
- b. Membuat surat izin penelitian di Laboratorium Parasitologi dan Bakteriologi Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang.
- c. Mengajukan pesanan strain jamur *Candida albicans* di UPTD Balai Laboratorium Kesehatan Provinsi Lampung.
- d. Menyiapkan bahan-bahan dan peralatan yang digunakan dalam penelitian.
- e. Melakukan pengulangan sebanyak 4 kali. Jumlah pengulangan dihitung menggunakan rumus Federer. Berikut merupakan rumus Federer:

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

Keterangan:

t : treatment (Perlakuan)

r : replikasi (Pengulangan)

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

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

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

$$5r \geq 15 + 5$$

$$r \geq 20/5$$

$$r \geq 4$$

- f. Melakukan peremajaan *Candida albicans*
- 1) Menyiapkan alat dan bahan.
 - 2) Mengambil 1 ose *Candida albicans* dan menginokulasikan pada media PDA dengan cara digores zig-zag.
 - 3) Setelah menginokulasikan, media di inkubasi pada suhu 37°C, selama 2x24 jam (F. Rahmawati dkk, 2022).
- g. Melakukan identifikasi strain *Candida albicans*
- 1) Disiapkan alat dan bahan.
 - 2) Diambil 1 ose koloni dari media PDA.
 - 3) Diletakkan diatas objek glass.
 - 4) Dilakukan pewarnaan Gram
 - a) Digenangi dengan Gram A selama 1 menit dan dibilas dengan air mengalir.
 - b) Digenangi dengan Gram B selama 1 menit dan dibilas dengan air mengalir.
 - c) Digenangi dengan Gram C selama ± 30 detik dan melakukan pembilasan dengan air mengalir.
 - d) Digenangi dengan Gram D selama 30 detik dan dibilas menggunakan air mengalir kemudian tunggu hingga kering.
 - e) Melakukan pengamatan morfologi *Candida albicans* menggunakan mikroskop dimulai dari perbesaran 100 hingga perbesaran tertinggi 1000.

Hasil: Pewarnaan Gram *Candida albicans* akan menunjukkan adanya blastospora, sel yang berbentuk oval, dan memiliki sifat gram positif (Soemarno, 2000).

5) Melakukan uji *Germ Tube*

- a) Diambil 1 ose koloni *Candida albicans*.
- b) Dimasukan kedalam tabung reaksi yang berisi putih telur \pm 1 mL.
- c) Dilakukan pengocokan perlahan hingga koloni tercampur.
- d) Kemudian tabung ditutup menggunakan kapas dan di inkubasi selama 2 sampai 3 jam pada suhu 37°C.
- e) Setelah inkubasi suspensi diambil 1 ose.
- f) Suspensi diletakkan di atas objek glass dan ditutup dengan kaca penutup.
- g) Kemudian diamati dibawah mikroskop dimulai dari perbesaran 100 sampai perbesaran tertinggi 1000.

Hasil: uji *germ tube Candida albicans* akan menunjukkan adanya *blastospora* atau sel ragi yang berbentuk seperti kecambah (Mulyati dkk, 2019).

2. Metode Pemeriksaan

Spread plate atau metode sebar.

3. Prinsip pemeriksaan

Suspensi pengenceran 10^{-3} jamur diinokulasikan pada media dan dilakukan penyebaran menggunakan batang L.

4. Cara kerja

a. Menyiapkan Alat dan Bahan

- 1) Alat: Oven, Batang L, Gelas ukur 100 mL, Pipet volume 10 mL, Cawan petri, Pipet ukur 1 mL, Tabung reaksi, Kapas, Kertas kopi, Gelas kimia 250 mL, Batang pengaduk, Erlenmeyer 250 mL, Corong gelas, Mikropipet 100 uL, mikropipet 1000 uL, Neraca elektrik, Spatula, Hot plate, Aluminium foil, Autoklaf, Lakban, Ose loop, Inkubator, Lampu spiritus, Kaca obyek, Kaca penutup,

Colony counter, Pipet tetes, Korek api, Spidol permanen, Label, Mikroskop.

- 2) Bahan: Koloni *Candida albicans*, *Jack bean*, *Sucrose*, Agar-agar, Media PDA, Antibiotik *Chloramphenicol*, BaCl_2 (*Barium Clorida*) 1%, NaCl (*Natrium Clorida*) 0,85%, H_2SO_4 (asam sulfat) 1%, Pewarnaan Gram.

b. Sterilisasi alat

- 1) Menyiapkan alat yang akan di sterilisasi.
- 2) Membersihkan dan mengeringkan peralatan yang akan digunakan.
- 3) Melakukan pembungkusan alat menggunakan kertas kopi
- 4) Melakukan sterilisasi alat menggunakan oven, dengan suhu 160°C dalam 1 jam (Soemarno, 2000).

c. Pembuatan media alternatif JBSA (*Jack Bean Sucrose Agar*)

- 1) Menyiapkan *jack bean* sebanyak 400 g.
- 2) Mencuci bersih *jack bean*.
- 3) *Jack bean* yang sudah bersih direndam selama 3x24 jam dengan 9 kali penggantian air setiap 8 jam. Setelah direndam biji dan kulit *jack bean* akan terpisah.
- 4) Selanjutnya melakukan pemisahan biji *jack bean* dengan kulit *jack bean* dengan cara di ambil bijinya dan dibuang kulitnya.
- 5) Melakukan pengeringan *jack bean* dibawah terik matahari.
- 6) Jika sudah kering *jack bean* digiling menggunakan coper hingga menjadi tepung.
- 7) Dilakukan pengayakan tepung.
- 8) Jika sudah diayak dilakukan penimbangan media alternatif JBSA (*Jack Bean Sucrose Agar*), yang dimulai dari penimbangan konsentrasi 60% tepung *jack bean* 0,6 gram, kemudian ditambahkan 5 gram *sucrose*, dan 3,75 gram agar.
- 9) Menimbang konsentrasi 70% tepung *jack bean* 0,7 gram, 5 gram *sucrose*, dan 3,75 gram agar.
- 10) Menimbang konsentrasi 80% tepung *jack bean* 0,8 gram, 5 gram *sucrose*, dan 3,75 gram agar.

- 11) Menimbang konsentrasi 90% tepung *jack bean* 0,9 gram, 5 gram *sucrose*, dan 3,75 gram agar.
 - 12) Menimbang konsentrasi 100% tepung *jack bean* 1 gram, 5 gram *sucrose*, dan 3,75 gram agar.
 - 13) Kemudian ditambahkan 250 mL aquades kedalam erlen meyer pada masing-masing perlakuan dan kemudian dipanaskan diatas hot plate hingga media mendidih.
 - 14) Melakukan pengukuran tingkat keasaman (pH) dengan indikator universal. Lakukan pengukuran pH ulang hingga mencapai pH lingkungan $\pm 5,5$. Jika pH media terlalu asam (rendah), ditambahkan NaOH 0,01 N beberapa tetes. Jika pH terlalu basa (tinggi beberapa tetes HCl 0,01 N ditambahkan).
 - 15) Jika sudah erlenmeyer ditutup dengan kapas yang dilapisi aluminium foil.
 - 16) Melakukan sterilisasi basah menggunakan alat autoklaf dengan suhu 121°C dalam waktu 15 menit.
 - 17) Diamkan hingga suhu turun, lalu tambahkan antibiotik *cloramfenikol* dan homogenkan.
 - 18) Menyiapkan cawan petri steril dan bunsen
 - 19) Melakukan penuangan media JBSA secara aseptis ke dalam cawan petri, masing-masing dituang 15 mL hingga 20 mL, kemudian media didiamkan hingga membeku.
- d. Pembuatan media PDA
- 1) Menyiapkan alat dan bahan.
 - 2) Menimbang bubuk PDA sebanyak 9,75 gram.
 - 3) Menambahkan 250 mL aquades.
 - 4) Media dipanaskan hingga homogen sempurna.
 - 5) Melakukan pengukuran tingkat keasaman (pH) dengan indikator universal. Lakukan pengukuran pH ulang hingga mencapai pH lingkungan $\pm 5,5$. Jika pH media terlalu asam (rendah), ditambahkan NaOH 0,01 N beberapa tetes. Jika pH terlalu basa (tinggi beberapa tetes HCl 0,01 N ditambahkan).

- 6) Melakukan sterilisasi media menggunakan alat autoklaf dengan suhu 121°C dalam waktu 15 menit, dengan tekanan 1 hingga 2 atm.
 - 7) Media yang sudah steril didiamkan hingga suhu turun, kemudian ditambahkan antibiotik *cloramfenikol* dan dilakukan penghomogenan pada media.
 - 8) Menyiapkan cawan petri steril dan bunsen.
 - 9) Melakukan penuangan media PDA secara aseptis ke dalam cawan petri, masing-masing dituang 15 mL hingga 20 mL, kemudian media didiamkan hingga membeku (Safitri & Novel, 2010).
- e. Pembuatan standard kekeruhan Mc Farland
- 1) Menyiapkan alat dan bahan.
 - 2) Membuat standar kekeruhan dengan menyiapkan tabung reaksi yang ditambahkan BaCl_2 1% sebanyak 0,5 mL.
 - 3) Menambahkan 1% asam sulfat sebanyak 99,5 mL.
 - 4) Jika belum akan digunakan maka suspensi di dalam tabung reaksi dengan ditutup rapat untuk menghindari penguapan dan disimpan di ruangan gelap dengan suhu kamar.
 - 5) Ketika akan digunakan suspensi dilakukan penghomogenan terlebih dahulu.
- f. Pembuatan larutan NaCl (*Natrium Clorida*) 0,85%
- 1) Menyiapkan alat dan bahan.
 - 2) Menimbang NaCl sebanyak 0,85 g.
 - 3) Menambahkan aquades 100 mL dan dihomogenkan (Soemarno, 2000).
- g. Pembuatan suspensi *Candida albicans*
- 1) Menyiapkan alat dan bahan.
 - 2) Mengambil 1 ose suspensi *Candida albicans* yang sudah dilakukan pengkulturan.
 - 3) *Candida albicans* disuspensikan dalam NaCl yang sudah steril, kemudian suspensi dibandingkan dengan standar kekeruhan.
- h. Pengenceran suspensi dan menginokulasi *Candida albicans*
- 1) Menyiapkan alat dan bahan.

- 2) Memipet 1 mL suspensi *Candida albicans*.
- 3) Memasukkan suspensi kedalam Pengenceran pertama atau 10^{-1} yang berisi 9 mL NaCl, kemudian dihomogenkan.
- 4) Setelah homogen suspensi pengenceran 10^{-1} dipipet 1 mL, kemudian dimasukkan kedalam tabung pengenceran kedua atau 10^{-2} dihomogenkan.
- 5) Setelah homogen suspensi pengenceran 10^{-2} dipipet 1 mL, kedalam tabung pengenceran kedua atau 10^{-3} dihomogenkan.
- 6) Kemudian melakukan penanaman pada media dengan cara diambil suspensi pengenceran 10^{-3} sebanyak 0,1 mL.
- 7) Suspensi ditetaskan keatas permukaan media pertumbuhan dan dilakukan penyebaran menggunakan batang L steril. dilakukan inkubasi selama 3x24 jam suhu 37°C menggunakan inkubator (Rahmahani & Wahyuni, 2020).

i. Uji penelitian

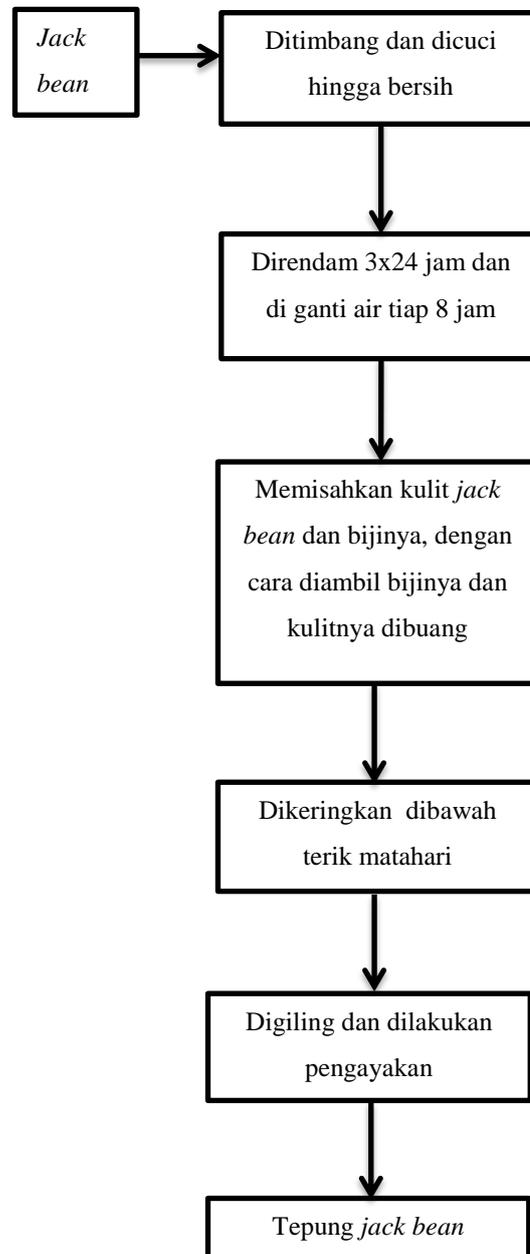
- 1) Mengeluarkan media JBSA dan PDA yang sudah diinkubasi selama 3 hari.
- 2) Melakukan perhitungan jumlah koloni *Candida albicans* yang tumbuh pada media JBSA dan PDA menggunakan alat *colony counter*.

j. Uji penegasan

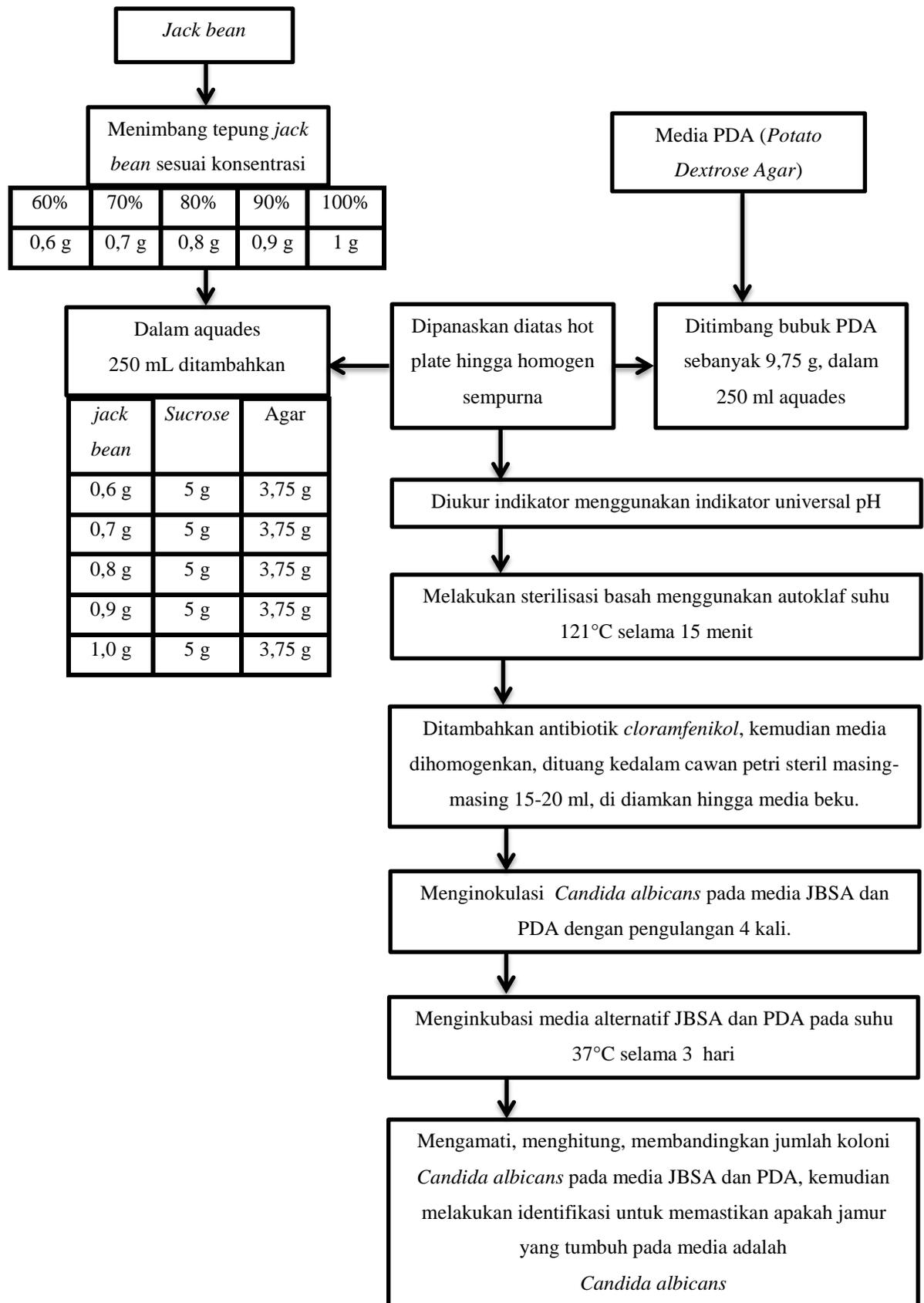
- 1) Menyiapkan alat dan bahan
- 2) Mengambil 1 ose koloni, dari masing-masing media pertumbuhan JBSA dan PDA.
- 3) Menyebarkan koloni di atas objek glass
- 4) Melakukan pewarnaan Gram.
- 5) Melakukan pengamatan morfologi *Candida albicans* secara mikroskopis dengan perbesaran 100 sampai perbesaran tertinggi 1000.

Hasil: Pewarnaan Gram *Candida albicans* akan menunjukkan adanya *blastospora*, sel yang berbentuk oval, dan memiliki sifat Gram positif.

5. Skema kerja

a. Pembuatan tepung *jack bean*

b. Pembuatan media JBSA dan PDA



F. Pengolahan Data

1. Pengolahan data

Data diperoleh dengan cara:

- a. Dihitung jumlah koloni jamur *Candida albicans* pada media alternatif JBSA konsentrasi 60%, 70%, 80%, 90%, 100% dan media konvensional PDA dihitung menggunakan alat *colony counter*. Jumlah koloni dihitung selama 3 hari pertumbuhan jamur.
- b. Dihitung rata-rata jumlah koloni per cawan petri pada pengulangan 1 sampai 4 kali.

2. Analisis data

- a. Analisis univariat pada penelitian berupa pertumbuhan jumlah koloni *Candida albicans* pada tiap perlakuan yang disajikan dalam bentuk tabel dan grafik, tiap perlakuan media alternatif JBSA dan media kontrol PDA dilakukan pengulangan sebanyak 4 kali kemudian dilakukan perhitungan rata-rata jumlah koloni *Candida albicans*.
- b. Analisis bivariat hasil rata-rata jumlah koloni *Candida albicans* pada tiap perlakuan dianalisis uji *One Way Anova*, jika ada perbedaan jumlah koloni media alternatif JBSA dan media kontrol PDA pada tiap perlakuan maka dilanjutkan dengan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) dengan taraf kesalahan 5% dan tingkat kepercayaan 95%.

G. Ethical Clearance

Penelitian yang dilakukan oleh peneliti dilakukan atas izin dari komisi kode etik, sehingga perlu dilakukannya telaah secara etik dan menyerahkan naskah skripsi ke komite etik Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang untuk dinilai kelayakan naskah skripsi yang dibuat oleh peneliti.

Penelitian yang dilakukan tidak menyebabkan bahaya pada lingkungan, limbah yang dihasilkan dari proses penelitian disatukan kemudian dimusnahkan di buang pada saluran pembuangan. Limbah larutan yang dihasilkan dari pembuatan media JBSA dan PDA yang sudah dilakukan pengamatan selama 3 hari dan limbah suspensi jamur *Candida albicans* didalam tabung dimusnahkan dengan dilakukan perebusan suhu 100°C selama 30 menit, limbah dari rebusan media plate dan suspensi *Candida albicans*

dibuang pada saluran pembuangan laboratorium bakteriologi yang dipastikan aman, kemudian plate yang sudah digunakan dicuci menggunakan deterjen dan dibilas menggunakan air mengalir.