

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Jenis dan Desain Penelitian**

Penelitian ini bersifat eksperimen dengan desain penelitian Rancangan Acak Lengkap (RAL) karena diterapkan pada kondisi lingkungan yang dapat dikendalikan (homogen) serta alat dan bahan yang digunakan bersifat homogen (Hidayat dkk., 2018). Variabel dalam penelitian ini adalah variabel eksperimen dan terikat. Variabel eksperimen yaitu variasi konsentrasi dan masa inkubasi media biji sorgum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). Variasi konsentrasi yang digunakan yaitu 30%, 45%, 60%, 75%, dan 90%, sedangkan variasi masa inkubasi yang digunakan yaitu 6 jam, 48 jam, 72 jam, dan 120 jam. Adapun variabel terikat pada penelitian ini yaitu pertumbuhan jamur *Candida albicans* yang diukur berdasarkan jumlah koloni yang tumbuh. Penanaman jamur *Candida albicans* dilakukan dengan metode *spread plate* dengan media *Potato Dextrose Agar* (PDA) sebagai kontrol pertumbuhan jamur. Berdasarkan rumus federer, pengulangan dilakukan sebanyak 4 kali.

#### **B. Lokasi dan Waktu Penelitian**

Pelaksanaan penelitian ini yaitu pada bulan Mei-Juni 2025 di Laboratorium Parasitologi dan Bakteriologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang.

#### **C. Subyek Penelitian**

Subyek dalam penelitian ini yaitu media pertumbuhan jamur, yang berupa media *Potato Dextrose Agar* (PDA) sebagai kontrol dan media biji sorgum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). Media PDA yang digunakan adalah media instan dengan nomor katalog CM0139B. Sedangkan media biji sorgum menggunakan biji sorgum yang telah matang (bertekstur keras), tidak busuk, dan tidak rusak (Lampiran 1, Gambar 1). Pada prosesnya, biji sorgum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) dijadikan tepung, kemudian dibuat media dengan konsentrasi biji sorgum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) 30%, 45%, 60%, 75%, dan 90%. Jamur *Candida albicans* diperoleh dari UPTD Balai

Laboratorium Kesehatan Provinsi Lampung dan dilakukan peremajaan di Laboratorium Bakteriologi Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang.

#### D. Variabel dan Definisi Operasional Penelitian

Tabel 3.1 Variabel dan Definisi Operasional

No.	Variabel	Definisi	Cara Ukur	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
1.	Variabel Eksperimen:					
	a. Variasi Konsentrasi Media Biji Sorgum	Variasi konsentrasi yang digunakan untuk membuat media biji sorgum yaitu konsentrasi 30%, 45%, 60%, 75%, dan 90%	Penimbangan	Neraca Analitik	Media biji sorgum konsentrasi 30%, 45%, 60%, 75%, dan 90%	Ordinal
	b. Variasi Masa Inkubasi Media Biji Sorgum	Variasi masa inkubasi yang digunakan untuk melihat fase pertumbuhan jamur <i>Candida albicans</i> yaitu 6 jam, 48 jam, 72 jam, dan 120 jam	Observasi	Jam	Jam	Rasio
2.	Variabel Terikat:					
	Pertumbuhan <i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i> yang tumbuh pada media biji sorgum dan media PDA	Dihitung jumlah koloni dengan <i>colony counter</i>	<i>Colony Counter</i>	Jumlah koloni <i>Candida albicans</i> dalam CFU/mL	Rasio

#### E. Pengumpulan Data

##### 1. Pendahuluan

- Mengajukan kode etik ke komisi etik Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang.
- Membuat surat izin untuk melakukan penelitian di Laboratorium Parasitologi dan Bakteriologi Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang.
- Mengajukan pemesanan strain jamur *Candida albicans* di UPTD Balai Laboratorium Kesehatan Provinsi Lampung.
- Menyiapkan peralatan dan bahan-bahan yang diperlukan dalam penelitian.

- e. Melakukan pengulangan sebanyak 4 kali. Banyaknya pengulangan dihitung menggunakan rumus Federer. Berikut ini merupakan rumus Federer.

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

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

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

$$5r-5 \geq 15$$

$$5r \geq 15+5$$

$$5r \geq 20$$

$$r \geq \frac{20}{5}$$

$$r \geq 4$$

Keterangan:

t : treatment (Perlakuan)

r : replikasi (Pengulangan)

- f. Melakukan Peremajaan Jamur *Candida albicans*

1) Menyiapkan alat dan bahan yang diperlukan.

2) Mengambil 1 *ose* strain jamur *Candida albicans* dan menginokulasikan pada media PDA dengan cara digores zig-zag.

3) Menginkubasi media pada suhu 37°C dalam waktu 2x24 jam di inkubator (Rahmawati dkk., 2022).

- g. Melakukan Identifikasi pada Strain Jamur *Candida albicans*

1) Menyipkan alat dan bahan yang diperlukan.

2) Mengambil 1 *ose* koloni jamur pada media PDA lalu meletakkannya di atas *object glass*.

3) Melakukan pewarnaan gram dengan cara:

a) Menggenangi *object glass* dengan larutan cat gram A selama 1 menit lalu membilasnya dengan air mengalir.

b) Menggenangi *object glass* dengan larutan cat gram B selama 1 menit lalu membilasnya dengan air mengalir.

c) Menggenangi *object glass* dengan larutan cat gram C selama ± 30 detik lalu membilasnya dengan air mengalir.

- d) Menggenangi *object glass* dengan larutan cat gram D selama 30 detik lalu membilasnya dengan air mengalir. Setelah itu, menunggu *object glass* hingga mengering.
- e) Melakukan pengamatan terhadap morfologi jamur *Candida albicans* dengan mikroskop dari perbesaran terkecil (100x) hingga perbesaran terbesar (1000x).

Hasil pengamatan: *Candida albicans* akan menunjukkan adanya blastospora dengan sel berbentuk oval dan memiliki sifat gram positif (berwarna ungu) pada hasil pewarnaan gram (Soemarno, 2000).

#### 4) Melakukan Uji *Germ Tube*

- a) Mengambil 1 *ose* koloni jamur *Candida albicans*.
- b) Memasukkan pada tabung reaksi yang berisi putih telur  $\pm$  1 mL.
- c) Melakukan pengocokan secara perlahan sampai koloni tercampur.
- d) Menutup tabung menggunakan kapas dan menginkubasi tabung selama 2 hingga 3 jam dalam suhu 37°C pada inkubator.
- e) Mengambil 1 *ose* suspensi meletakkannya di atas *objeck glass* lalu menutupnya menggunakan kaca penutup.
- f) Melakukan pengamatan *object glass* dengan mikroskop dari perbesaran 100x sampai perbesaran 400x.

Hasil pengamatan: *Candida albicans* akan menunjukkan adanya pertumbuhan hifa seperti kecambah yang berbentuk raket (Mulyati dkk., 2019).

### 2. Metode Pemeriksaan

Metode sebar atau *spread plate*.

### 3. Prinsip Pemeriksaan

Suspensi jamur *Candida albicans* yang didapatkan dari pengenceran  $10^{-3}$  diinokulasi pada media dan dilakukan penyebaran dengan batang L yang steril.

#### 4. Prosedur Kerja

##### a. Menyiapkan Alat dan Bahan yang Diperlukan

###### 1) Alat:

*Ose, inkubator, tabung reaksi, object glass, deck glass, pipet tetes, mikroskop, rak tabung reaksi, oven, neraca analitik, spatula, beaker glass 250 mL, gelas ukur 100 mL & 250 mL, kaca arloji, erlenmeyer 250 mL, hot plate, autoklaf, lemari pendingin, biological safety cabinet, batang pengaduk, cawan petri, vortex, lampu spiritus, mortar, alu, timbangan digital, ayakan/saringan 80 mesh, rak pengecatan, pipet ukur 1 mL & 10 mL, batang L, spidol permanen, korek api, mikropipet 50 µl & 100 µl, grinder, gunting, dan colony counter.*

###### 2) Bahan:

Strain jamur *Candida albicans*, biji sorgum, *dextrose*, agar, media PDA instan, antibiotik *chloramphenicol*, BaCl<sub>2</sub> 1%, NaCl 0,85%, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1%, indikator universal, cat gram (A, B, C, dan D), kertas lensa, minyak imersi, putih telur, kapas, kapas yang dilapisi aluminium foil, aquades, NaOH 0,01 N, HCl 0,01 N, label, kertas kopi, selotip, tip kuning, dan benang.

##### b. Sterilisasi Peralatan

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

##### c. Pembuatan Larutan Antibiotik Kloramfenikol

- 1) Menyiapkan *beaker glass* yang kemudian dimasukkan aquades sebanyak 20 mL. Kemudian, *beaker glass* ditutup dengan aluminium foil.
- 2) Melakukan sterilisasi aquades pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm menggunakan autoklaf.

- 3) Menambahkan bubuk antibiotik kloramfenikol sebanyak 1000 mg ke dalam 20 mL aquades yang telah disterilkan.
  - 4) Menghomogenkan larutan antibiotik (Afifah dkk., 2023)
- d. Pembuatan Media *Potato Dextrose Agar* (PDA) sebagai Kontrol Pertumbuhan Jamur
- 1) Menyiapkan alat dan bahan yang diperlukan.
  - 2) Menimbang bubuk media PDA sebanyak 9,75 gram dan memindahkannya ke erlenmeyer (Lampiran 4, Gambar 1&2).
  - 3) Menambahkan 250 mL aquades ke erlenmeyer (Lampiran 4, Gambar 3).
  - 4) Memanaskan media pada *hot plate* hingga homogen sempurna (Lampiran 4, Gambar 4).
  - 5) Melakukan pengukuran tingkat keasaman (pH) dengan indikator universal (Lampiran 4, Gambar 5). Pengukuran pH dilakukan hingga mencapai pH lingkungan yaitu  $\pm 5,5$ . Apabila media memiliki pH yang terlalu asam (rendah), maka tambahkan beberapa tetes NaOH 0,01 N. Apabila media memiliki pH yang terlalu basa (tinggi), maka tambahkan beberapa tetes HCl 0,01 N.
  - 6) Melakukan sterilisasi media menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm (Lampiran 4, Gambar 6).
  - 7) Mendiamkan media hingga suhunya turun, kemudian menambahkan antibiotik kloramfenikol sebanyak 2,5 mL dan media dihomogenkan (Lampiran 4, Gambar 7).
  - 8) Menyiapkan cawan petri steril dan lampu spiritus.
  - 9) Melakukan penuangan media PDA sebanyak 9-10 mL secara aseptis pada cawan petri (Lampiran 4, Gambar 8). Lalu, mendiamkan hingga memadat (Lampiran 4, Gambar 9) (Safitri & Novel, 2010).
  - 10) Melakukan uji sterilitas media dengan menyimpan 5% dari total media yang dibuat selama 24 jam dengan suhu 37°C di inkubator (Lampiran 4, Gambar 10). Lalu, setelah inkubasi tersebut dilihat ada tidaknya pertumbuhan bakteri. Jika tidak terdapat koloni yang tumbuh, maka media dapat digunakan. Namun, apabila terdapat

pertumbuhan koloni, maka seluruh media dibuang dan diperlukan pembuatan media yang baru (Armah dkk., 2023; Siregar dkk., 2022).

- e. Pembuatan Media Biji Sorgum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench)
  - 1) Menyiapkan 100 gram biji sorgum yang telah matang (bertekstur keras), tidak busuk, dan tidak rusak (Lampiran 3, Gambar1).
  - 2) Melakukan penumbukkan biji sorgum agar terlepas dari kulit luarnya (Lampiran 3, Gambar 2). Lalu, memisahkan biji sorgum dengan kulitnya (Lampiran 3, Gambar 3).
  - 3) Mencuci bersih biji sorgum (Lampiran 3, Gambar 4).
  - 4) Merendam biji sorgum dalam waktu 12-24 jam lalu membilasnya dengan air bersih beberapa kali (Lampiran 3, Gambar 5).
  - 5) Melakukan pengeringan biji sorgum di bawah terik matahari (Lampiran 3, Gambar 6).
  - 6) Menggiling biji sorgum yang telah kering menggunakan *grinder* hingga menjadi tepung (Lampiran 3, Gambar 7).
  - 7) Mengayak tepung biji sorgum yang telah digiling dengan saringan 80 mesh (Lampiran 3, Gambar 8).
  - 8) Melakukan penimbangan media biji sorgum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) dimulai dari penimbangan konsentrasi 30%, yaitu tepung biji sorgum 0,3 gram, *dextrose* sebanyak 5 gram, dan agar sebanyak 3,75 gram. Lalu, memindahkannya ke dalam erlenmeyer.
  - 9) Menimbang konsentrasi 45%, yaitu tepung biji sorgum 0,45 gram, *dextrose* sebanyak 5 gram, dan agar sebanyak 3,75 gram. Lalu, memindahkannya ke dalam erlenmeyer.
  - 10) Menimbang konsentrasi 60%, yaitu tepung biji sorgum 0,6 gram, *dextrose* sebanyak 5 gram, dan agar sebanyak 3,75 gram. Lalu, memindahkannya pada erlenmeyer.
  - 11) Menimbang konsentrasi 75%, yaitu tepung biji sorgum 0,75 gram, *dextrose* sebanyak 5 gram, dan agar sebanyak 3,75 gram. Lalu, memindahkannya pada erlenmeyer.

- 12) Menimbang konsentrasi 90%, yaitu tepung biji sorgum 0,90 gram, *dextrose* sebanyak 5 gram, dan agar sebanyak 3,75 gram. Lalu, memindahkannya pada erlenmeyer.
- 13) Lalu, menambahkan aquades sebanyak 250 mL ke dalam erlenmeyer pada masing-masing perlakuan dan setelahnya memanaskan media di atas *hot plate* hingga mendidih (Lampiran 5, Gambar 5&6).
- 14) Melakukan pengukuran tingkat keasaman (pH) dengan indikator universal (Lampiran 5, Gambar 7). Pengukuran pH dilakukan hingga mencapai pH lingkungan yaitu  $\pm$  5,5. Apabila media memiliki pH yang terlalu asam (rendah), maka tambahkan beberapa tetes NaOH 0,01 N. Apabila media memiliki pH yang terlalu basa (tinggi), maka tambahkan beberapa tetes HCl 0,01 N.
- 15) Menutup mulut tabung erlenmeyer dengan kapas yang dilapisi aluminium foil.
- 16) Melakukan sterilisasi media pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm menggunakan autoklaf (Lampiran 5, Gambar 8).
- 17) Mendiamkan media hingga suhunya turun, lalu menambahkan antibiotik kloramfenikol sebanyak 2,5 mL pada masing-masing media dan media dihomogenkan (Lampiran 5, Gambar 9).
- 18) Menyiapkan cawan petri steril dan lampu spiritus.
- 19) Melakukan penuangan media biji sorgum sebanyak 9-10 mL secara aseptis pada cawan petri (Lampiran 5, Gambar 10). Lalu, mendiamkan media hingga memadat (Lampiran 5, Gambar 11).
- 20) Melakukan uji sterilitas media dengan menyimpan 5% dari total media yang dibuat selama 24 jam dengan suhu 37°C di inkubator (Lampiran 5, Gambar 12). Lalu, setelah inkubasi tersebut dilihat ada tidaknya pertumbuhan bakteri. Apabila tidak terdapat pertumbuhan koloni, media dapat digunakan. Namun, apabila terdapat pertumbuhan koloni, maka seluruh media dibuang dan dilakukan pembuatan media yang baru (Armah dkk., 2023; Siregar dkk., 2022).

f. Pembuatan Standar Kekeruhan McFarland

- 1) Menyiapkan alat dan bahan yang diperlukan.

- 2) Menyiapkan tabung reaksi steril yang ditambahkan BaCl<sub>2</sub> 1% sebanyak 0,05 mL/50  $\mu$ L .
- 3) Menambahkan 1% asam sulfat sebanyak 9,95 mL ke tabung reaksi yang sama dan kemudian menghomogenkannya dengan *vortex* (Soemarno, 2000).

Standar McFarland digunakan untuk standarisasi perkiraan jumlah bakteri dalam suspensi cair, di mana dilakukan pembandingan kekeruhan dengan suspensi uji. Standard McFarland 0,5 setara dengan jumlah perkiraan suspensi bakteri yaitu  $1,5 \times 10^8$  CFU/mL. Maka, jika suspensi khamir diambil 0,1 mL akan setara dengan  $1,5 \times 10^7$  CFU (Aviany & Pujianto, 2020).

g. Pembuatan Suspensi Jamur *Candida albicans*

- 1) Menyiapkan alat dan bahan yang diperlukan.
- 2) Mengambil 1 ose *Candida albicans* yang telah dilakukan kultur peremajaan (Lampiran 6, Gambar 1).
- 3) Mencampurkan koloni yang telah diambil ke dalam NaCl 0,85% pada tabung, meghomogenkannya dengan *vortex*, lalu membandingkannya dengan standar kekeruhan McFarland (Lampiran 6, Gambar 2) (Soemarno, 2000).

h. Pengenceran Suspensi dan Penginokulasian Jamur *Candida albicans*

- 1) Menyiapkan alat dan bahan yang diperlukan.
- 2) Memipet 1 mL suspensi *Candida albicans*.
- 3) Memasukkan suspensi pada tabung pengenceran pertama atau  $10^{-1}$  yang berisi 9 mL NaCl, kemudian tabung tersebut dihomogenkan dengan *vortex* (Lampiran 6, Gambar 3).
- 4) Memipet 1 mL suspensi pada tabung pengenceran  $10^{-1}$ , lalu dimasukkan ke dalam tabung pengenceran kedua atau  $10^{-2}$ . Lalu, tabung tersebut dihomogenkan dengan *vortex* (Lampiran 6, Gambar 4).
- 5) Memipet 1 mL suspensi pada tabung pengenceran  $10^{-2}$ , lalu dimasukkan ke dalam tabung pengenceran ketiga atau  $10^{-3}$ . Lalu,

tabung tersebut dihomogenkan dengan *vortex* (Lampiran 6, Gambar 5).

- 6) Memipet suspensi pada tabung pengenceran  $10^{-3}$  sebanyak 0,1 mL/100  $\mu$ l, lalu meletakkan suspensi di atas permukaan media pertumbuhan dan menyebarkannya menggunakan batang L yang telah steril (Lampiran 6, Gambar 6,7, & 8).
- 7) Meginkubasi media pada suhu 37°C menggunakan inkubator dan dilakukan pengamatan sesuai dengan variasi masa inkubasi (Lampiran 6, Gambar 10) (Ramadhani & Wahyuni, 2020).

i. Uji Penelitian

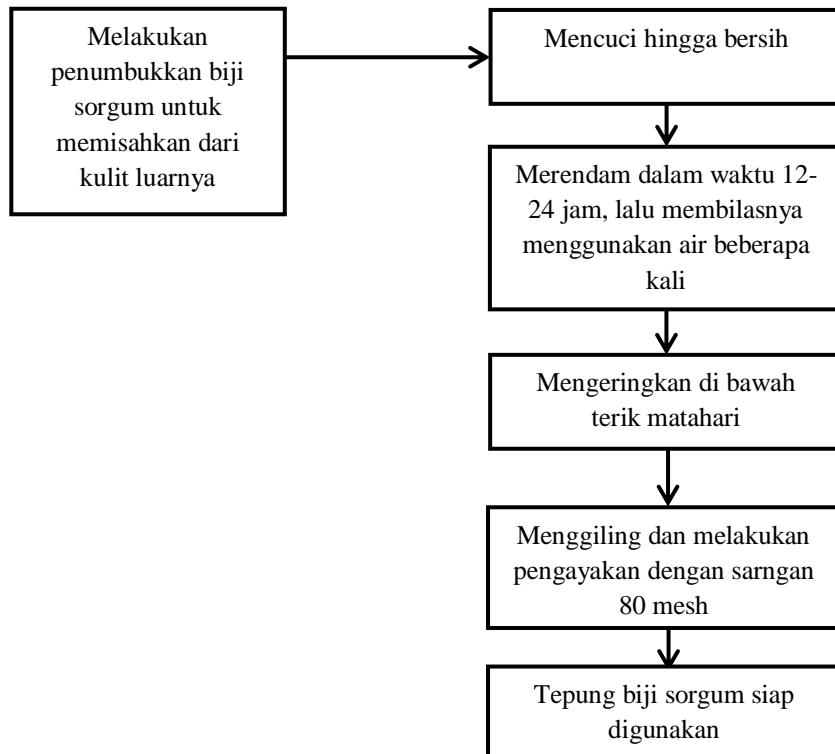
- 1) Mengeluarkan media biji sorgum dan media PDA yang telah diinkubasi.
- 2) Menghitung jumlah koloni jamur *Candida albicans* yang tumbuh di jam ke 6, 48, 72 dan 120 pada media biji sorgum dan media PDA menggunakan *colony counter*.

j. Uji Penegasan

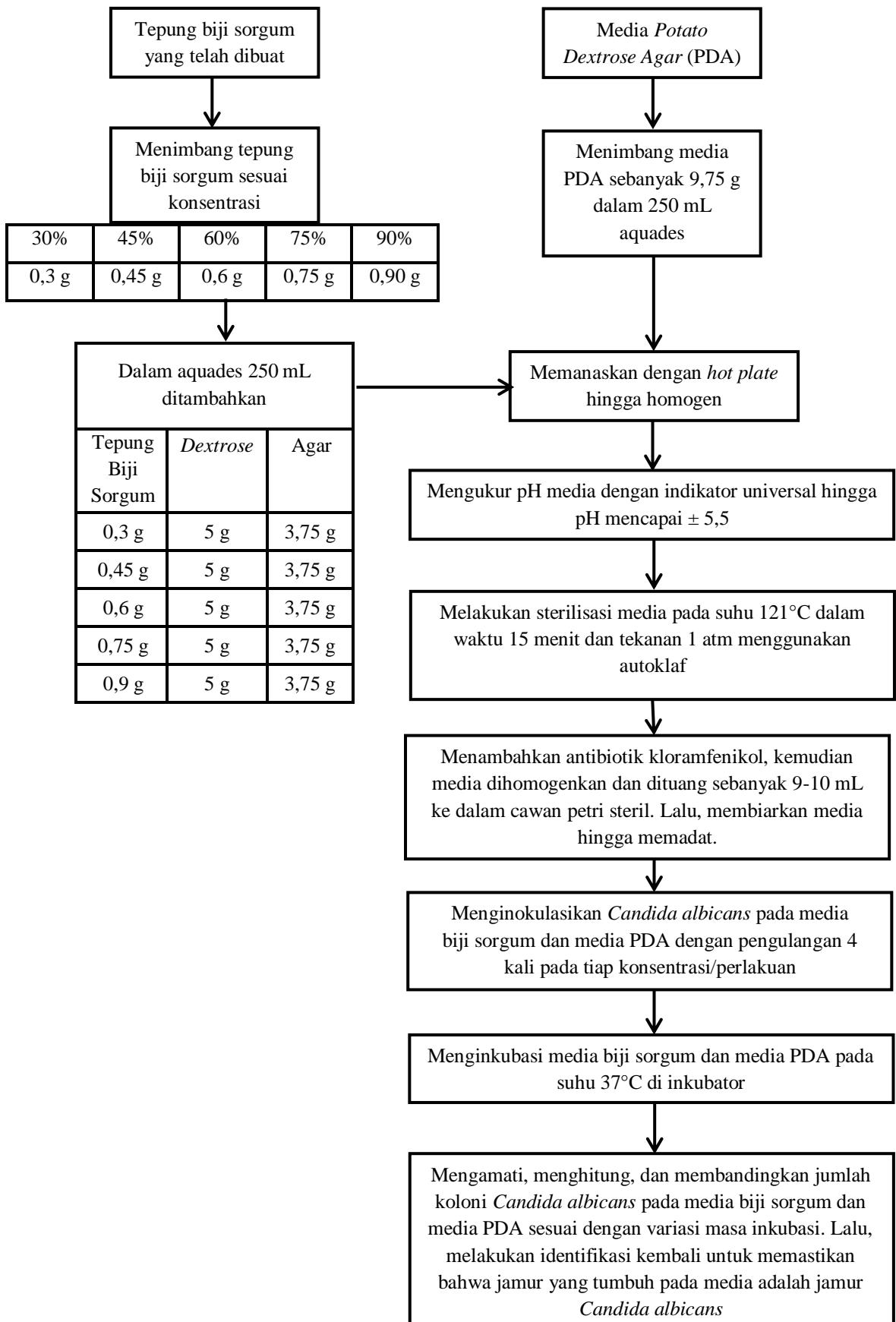
- 1) Menyiapkan alat dan bahan yang diperlukan.
- 2) Mengambil 1 *ose* koloni jamur *Candida albicans* dari masing-masing media pertumbuhan (media biji sorgum dan media PDA).
- 3) Menyebarkan koloni di atas *objeck glass* dan melakukan pewarnaan gram.
- 4) Melakukan pengamatan morfologi *Candida albicans* dengan perbesaran 100x sampai perbesaran 1000x.
- 5) Melakukan kembali uji *germ tube*.

## 5. Skema Kerja

### a. Pembuatan Tepung Biji Sorgum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench)



b. Pembuatan Media Biji Sorgum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) dan Media *Potato Dextrose Agar* (PDA)



## F. Pengolahan dan Analisa Data

### 1. Pengolahan Data

Data diperoleh dengan cara:

- a. Menghitung jumlah koloni jamur *Candida albicans* di jam ke-6, 48, 72, dan 120 pada media biji sorgum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) konsentrasi 30%, 45%, 60%, 75%, dan 90% dan media *Potato Dextrose Agar* (PDA) menggunakan alat *colony counter*.
- b. Menghitung rata-rata jumlah koloni jamur per cawan petri sampai dengan pengulangan 4 kali.

### 2. Analisa Data

- a. Analisis univariat pada penelitian ini dilakukan dengan perhitungan rata-rata jumlah koloni *Candida albicans* di jam ke-6, 48, 72, dan 120 pada masing-masing perlakuan di media biji sorgum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) dan media kontrol PDA yang dilakukan pengulangan sebanyak 4 kali. Kemudian, hasil perhitungan disajikan dalam bentuk tabel.
- b. Analisis bivariat diawali dengan uji kenormalan data. Jika data terdistribusi normal, maka dilakukan dengan uji *One Way Anova* untuk menganalisis variabel variasi konsentrasi dengan jumlah koloni maupun variabel masa inkubasi dengan jumlah koloni. Apabila hasil menunjukkan terdapat perbedaan, maka dilanjutkan dengan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) dengan tingkat kepercayaan 95% dan taraf kesalahan 5%. Adapun jika data tidak terdistribusi normal, maka digunakan uji *Kruskal-Wallis*. Jika terdapat perbedaan yang signifikan, maka dilanjutkan dengan uji *post hoc* yaitu uji *Dunn*.

## G. Ethical Clearence

Penelitian ini telah memperoleh izin penelitian dengan nomor surat: 261/KEPK-TJK/V/2025 pada tanggal 03 Mei 2025 oleh Komite Etik Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang. Penelitian ini tidak membahayakan peneliti dan lingkungan karena pada saat penelitian digunakannya Alat Pelindung Diri (APD) berupa jas laboratorium, masker, *handscoons*, dan sandal laboratorium yang tertutup. Selain itu, pengerajan penelitian juga dilakukan pada *Biological Safety Cabinet* (BSC) untuk memastikan bahan uji dan peneliti terlindungi.

Adapun pada penelitian ini digunakan jamur *Candida albicans* yang tidak berbahaya karena jamur tersebut secara alami hidup di tubuh manusia sebagai flora normal, terutama di mulut, kulit, saluran pencernaan, dan area genital.

Adapun semua limbah yang dihasilkan dikumpulkan dan dimusnahkan. Limbah cair dari hasil pembuatan media biji sorgum dan PDA serta suspensi jamur *Candida albicans* pada tabung dimusnahkan dengan melalui perebusan pada suhu 100°C selama 30 menit. Limbah media *plate Potato Dextrose Agar* (PDA) dan media biji sorgum yang telah diamati sampai jam ke-120 dimusnahkan dengan perebusan pada suhu yang sama selama 30 menit. Kemudian, limbah cair hasil perebusan dibuang ke saluran pembuangan dan *plate* dibersihkan menggunakan sabun dan dibilas dengan air mengalir.