

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan menggunakan desain penelitian kuantitatif. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah kombucha teh bunga telang dengan variasi lama waktu fermentasi, yaitu 7 hari, 14 hari, dan 21 hari. Sedangkan variable terikatnya adalah diameter zona hambat jamur *Candida albicans*.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Parasitologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Tanjung Karang. Penelitian dilaksanakan pada bulan April-Mei 2025.

C. Subyek Penelitian

Subjek penelitian adalah kombucha teh bunga telang dengan variasi lama waktu fermentasi yaitu 7 hari, 14 hari, dan 21 hari yang digunakan untuk menghambat pertumbuhan jamur *Candida albicans*. Sampel strain murni jamur *Candida albicans* diperoleh dari Balai Laboratorium Kesehatan Provinsi Lampung. Bunga telang segar didapat dari desa Kotagajah, Kecamatan Kotagajah, Kabupaten Lampung Tengah. Starter kombucha diperoleh dari pembelian di *market place* (Shopee) sebagaimana ditunjukkan pada Lampiran 7 bagian K.a. Namun, dalam penelitian ini yang digunakan hanyalah kombucha dalam bentuk cair, tanpa menyertakan SCOPY, sebagaimana terlihat pada Lampiran 7 bagian K.b.

Terdapat 3 perlakuan, 1 kontrol positif yaitu ketoconazole 200 mg dan 1 kontrol negatif yaitu aquabidest steril sehingga dilakukan 5 kali pengulangan. Pengulangan dihitung memakai rumus Federer:

$(t-1)(n-1) \geq 15$	$(5-1)(n-1) \geq 15$ $(4)(n-1) \geq 15$ $4n-4 \geq 15$ $4n \geq 15+4$ $4n \geq 19$ $n \geq 19/4$ $n \geq 4,74$
Keterangan : t = perlakuan n = pengulangan	

Jadi setiap sampel dilakukan 5 kali pengulangan.

D. Variabel dan Definisi Operasional

Tabel 3.1 Variabel dan Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Cara Ukur	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala
Variabel Bebas : Lama Fermentasi Kombucha Teh Bunga Telang	Bunga telang (<i>Clitoria ternatea</i>) yang telah dikeringkan lalu dibuat kombucha dengan variasi lama waktu fermentasi, yaitu 7 hari, 14 hari, dan 21 hari.	Fermentasi	Neraca, gelas ukur, toples kaca, kain penutup	Fermentasi 7 hari Fermentasi 14 hari Fermentasi 21 hari	Rasio
Variabel Terikat : Diameter zona hambat jamur <i>Candida albicans</i>	Pertumbuhan jamur <i>Candida albicans</i> yang dihambat oleh kombucha teh bunga telang (<i>Clitoria ternatea</i>) dan obat ketoconazole (kontrol positif)	Pengukuran zona hambat	Jangka Sorong	Diameter (mm)	Rasio

E. Pengumpulan Data

1. Alat dan Bahan

Peralatan yang dipakai dalam riset ini ialah: neraca analitik elektrik, erlemeyer ukuran 250 mL dan 500 mL, beaker glass ukuran 250 mL, gelas ukur ukuran 100 mL dan 500 mL, tabung reaksi ukuran 10 mL, batang pengaduk, hot plate, rak tabung, cawan petri, autoclave, jarum ose, lampu spirtus, pipet steril, lidi kapas steril, spuit steril, kertas kopi, oven, toples, tisu, inkubator dan jangka sorong.

Bahan yang dipakai dalam riset ini ialah: bunga telang, media *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA), media *Potato Dextrose Agar* (PDA), media *Potato Dextrose Broth* (PDB), strain murni jamur *Candida albicans*, kontrol positif (+) ketoconazole 200 mg, dan kontrol negatif (-) larutan aquabidest steril, larutan standar Mc Farland 0,5, NaCl 0,9%.

2. Sterilisasi Alat

Sebelum digunakan, seluruh alat disterilkan memakai oven seperti pada lampiran 7 bagian selama 1-2 jam pada suhu 170°C. Sedangkan untuk media disterilkan menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C. (Nasution, 2022)

3. Peremajaan Jamur

Diambil menggunakan ose steril sebanyak 1 ose biakan jamur *Candida albicans* kemudian digoreskan pada media PDA miring. Selanjutkan diinkubasi selama 2x24 jam di dalam inkubator. Setelah diinkubasi, ditanam kembali koloni jamur ke media PDB dan diinkubasi kembali selama 2x24 jam. Koloni inilah yang akan digunakan untuk pembuatan suspensi jamur. (Rodiah, 2022)

4. Identifikasi Jamur

Diambil menggunakan ose bulat koloni *Candida albicans* hasil peremajaan di media PDB. Kemudian dimasukkan koloni tersebut kedalam tabung reaksi berisi putih telur, diinkubasi selama 2 jam pada suhu 37°C. (Lebih dari 2 jam tidak valid). Diambil satu tetes koloni dan diteteskan pada *objek glass* lalu ditutup dengan *deck glass*. Diperiksa di bawah mikroskop menggunakan lensa objektif 40x. Jamur *Candida albicans* akan terlihat berbentuk sel yang berkecambah seperti raket atau kecambah. Bagian yang berbentuk bulat merupakan blastospora, sedangkan bagian yang menunjukkan pertumbuhan seperti kecambah disebut pseudohifa. Hasil uji *germ tube* dapat dilihat pada Lampiran 7 bagian G. (Rahayu, 2018)

5. Pembuatan Suspensi Jamur

Setelah peremajaan, ambil dua hingga tiga lilitan koloni jamur *Candida albicans* dan tempatkan dalam tabung reaksi dengan sepuluh mililiter larutan NaCl fisiologis. Standar Mc. Farland 0,5 dipakai untuk mengukur kekeruhan suspensi jamur. Koloni jamur bisa ditambahkan jika tidak cukup berkabut, sedangkan NaCl fisiologis bisa ditambahkan jika terlalu keruh. Proses menyamakan kekeruhan suspensi *Candida albicans* dengan larutan Mc Farland dapat dilihat pada Lampiran 7 bagian H. (Soleha, 2023)

6. Persiapan Bunga Telang

Bunga telang dalam penelitian ini dipanen langsung oleh peneliti. Sebanyak 1.000 gram bunga telang segar dicuci menggunakan air mengalir kemudian dijemur selama 3 hari dengan ditutup kain hitam sehingga tidak terkena cahaya matahari secara langsung. Setelah kering, bunga telang

disimpan dan siap digunakan untuk pembuatan kombucha. Proses persiapan bunga telang dapat dilihat pada Lampiran 7 bagian A.

7. Pembuatan Starter Kombucha

Disiapkan 200 mL air rebusan yang masih panas. Ditambahkan bunga telang kering sebanyak 34,4 g (17,2% dari 200 mL) dan didiamkan selama 15 menit. Setelah itu disaring dan dimasukkan kedalam toples kaca bening. Ditambahkan gula pasir sebanyak 80 g (40% dari 200 mL) lalu diaduk. Didinginkan pada suhu 25°C. Setelah benar-benar dingin, ditambahkan starter kombucha cair yang dibeli dari *market place* sebanyak 16 mL (8% dari 200 mL). Ditutup menggunakan tisu dan diinkubasi selama 7 hari di suhu 25°C. Starter kombucha siap digunakan. (Rezaldi dkk, 2022)

8. Pembuatan Kombucha Teh Bunga Telang

Disiapkan 200 mL air rebusan yang masih panas. Ditambahkan bunga telang kering sebanyak 34,4 g (17,2% dari 200 mL) dan didiamkan selama 15 menit. Setelah itu disaring dan dimasukkan kedalam toples kaca bening. Ditambahkan gula pasir sebanyak 80 g (40% dari 200 mL) lalu diaduk. Didinginkan pada suhu 25°C. Setelah benar-benar dingin, ditambahkan starter kombucha cair yang berusia 7 hari sebanyak 16 mL (8% dari 200 mL). Ditutup menggunakan tisu dan diinkubasi selama 21 hari di suhu 25°C. Diulangi langkah yang sama untuk membuat kombucha teh bunga telang dengan lama fermentasi 14 hari dan 7 hari. Proses pembuatan kombucha dapat dilihat pada Lampiran 7 bagian B. (Rezaldi dkk, 2022)

9. Pembuatan Media Agar Potato Dextrose Agar (PDA)

Dilarutkan 0,975 g bubuk PDA dalam 25 mL aquadest. Dipanaskan sambil diaduk terus menerus hingga mendidih agar bubuk larut sempurna. Setelah larut diaduk rata lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Disterilkan dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C. Didinginkan dengan posisi tabung miring 30°. Proses pembuatan media PDA dapat dilihat pada Lampiran 7 bagian D.

10. Pembuatan Media Agar Potato Dextrose Broth (PDB)

Dilarutkan 0,6 g bubuk PDB dalam 25 mL aquadest. Dipanaskan sambil diaduk terus menerus hingga mendidih agar bubuk larut sempurna.

Setelah larut diaduk rata lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Disterilkan dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C. Proses pembuatan media PDB dapat dilihat pada Lampiran 7 bagian E.

11. Pembuatan Media Agar *Saboraund Dextrose Agar*

Ditimbang bubuk SDA sebanyak 19,5 g dan dimasukkan kedalam Erlenmeyer. Ditambahkan 300 mL aquadest steril, diaduk lalu dipanaskan sampai larut sempurna diatas hotplate. Disterilkan media menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C pada tekanan 1 ATM. Setelah disterilkan didiamkan hingga sedikit dingin lalu ditambahkan larutan kloramfenikol sebanyak 3 mL. Dituangkan media agar ke dalam cawan petri hingga setebal 3-4 mm, lalu dibiarkan agar mengeras di suhu ruang. Proses pembuatan media SDA dapat dilihat pada Lampiran 7 bagian F. (Soleha, 2023)

12. Pembuatan Kontrol Positif Ketoconazole

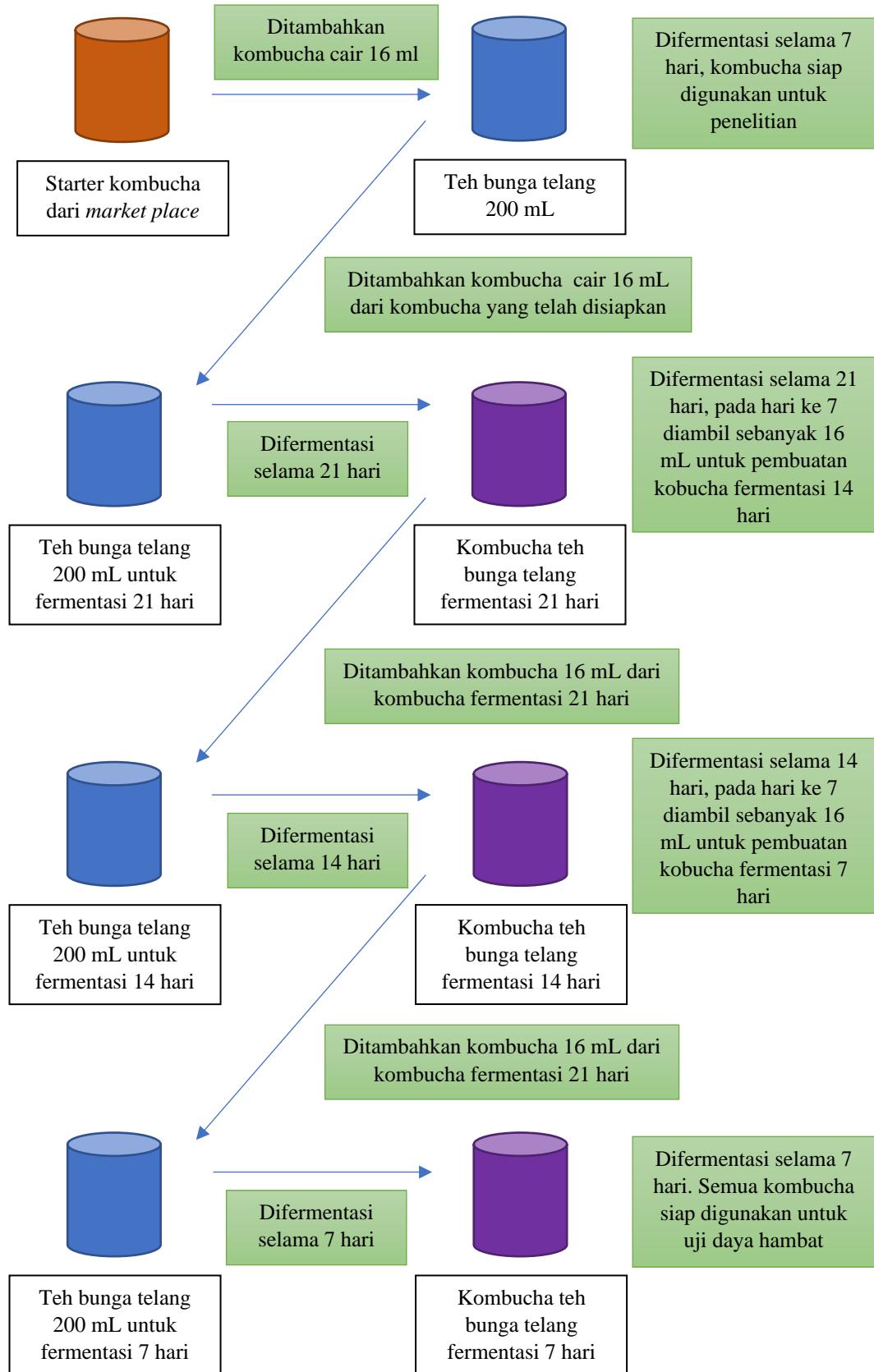
Kontrol positif dalam penelitian ini semula menggunakan nistatin cair, namun kemudian diganti dengan ketokonazol karena beberapa pertimbangan teknis dan ilmiah. Nistatin bersifat kurang stabil dalam bentuk cair dan memiliki keterbatasan dalam difusi ke dalam media agar, yang dapat mempengaruhi keakuratan zona hambat. Sebaliknya, ketokonazol lebih sesuai digunakan dalam metode difusi sumuran dan merupakan kontrol positif yang lebih umum digunakan dalam penelitian antifungi in vitro, sehingga pergantian ini dilakukan demi menjamin validitas dan keterbandingan hasil penelitian.

Ditimbang satu per satu sebanyak 10 Tablet Ketokonazole, hitung bobot rata-rata lalu gerus menggunakan mortir dan stamper sampai halus. Kemudian ditimbang secara seksama sejumlah serbuk tablet Ketokonazole yang setara dengan lebih kurang 200 mg baku Ketokonazole. Dilarutkan dalam 10,0 ml Alkohol 96%, kocok kuat dengan menggunakan vortex selama kurang lebih 10 menit atau sampai dengan homogen. Setelah homogen larutan kontrol positif siap digunakan. Proses pembuatan kontrol positif (ketoconazole) dapat dilihat pada Lampiran 7 bagian C.

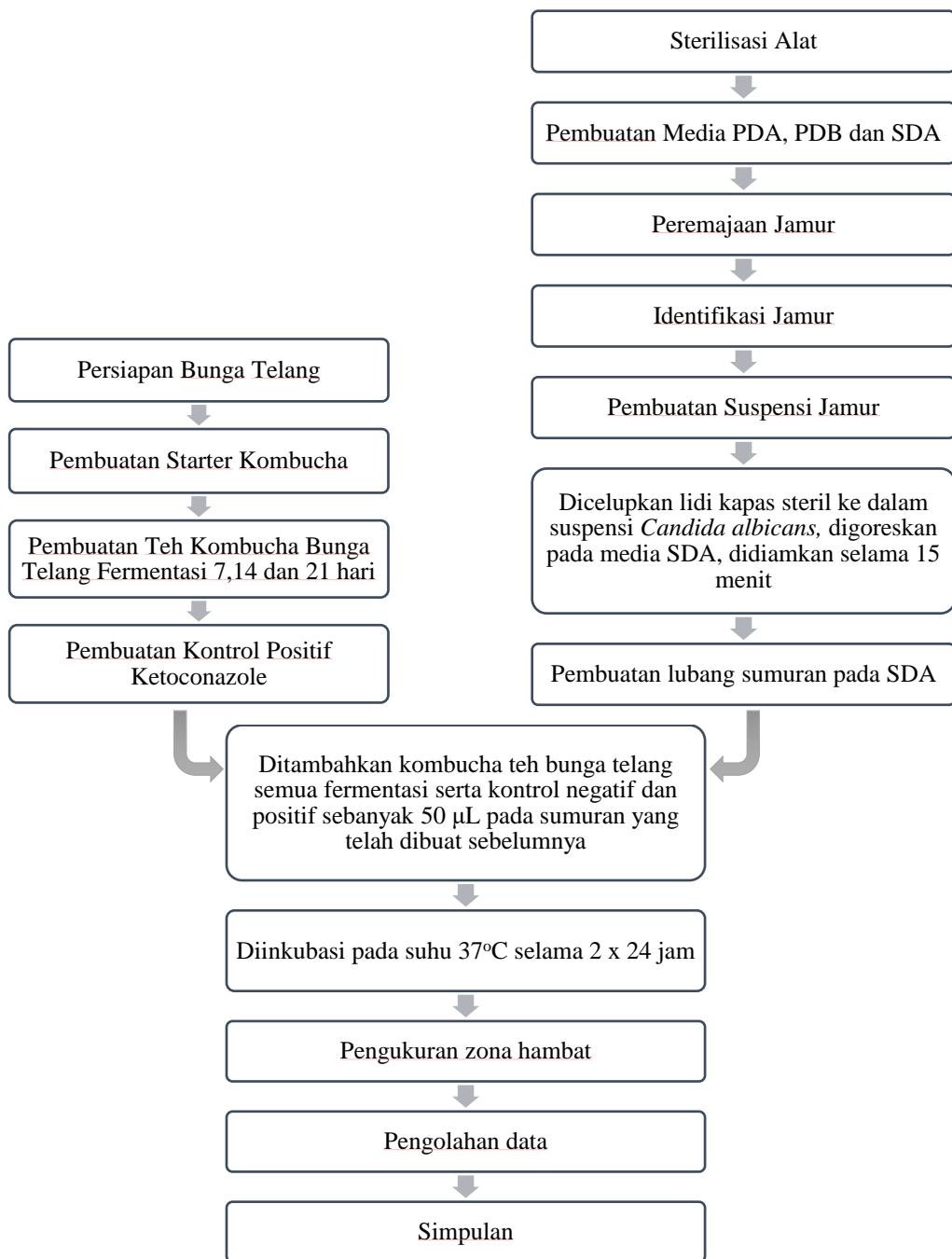
13. Pelaksanaan Uji Daya Hambat

- a. Disiapkan media SDA yang telah mengeras
- b. Dicelupkan lidi kapas steril ke dalam suspensi *Candida albicans*. Didiamkan sejenak agar suspensi meresap ke dalam kapas, kemudian diangkat dan diperas pada dinding tabung dengan cara menekannya sambil diputar.
- c. Dipulaskan lidi kapas ke permukaan media SDA hingga seluruh permukaan tertutup dengan merata.
- d. Dibiarkan media SDA tersebut di atas meja selama 5-15 menit agar suspensi jamur dapat meresap ke dalam media.
- e. Dibuat beberapa sumuran dengan jarak yang cukup agar tidak saling tumpang tindih menggunakan alat pembuat sumuran (tip kuning dengan diameter 5 mm) setelah inokulasi jamur selesai.
- f. Diambil kombucha teh bunga telang sebanyak 50 μL dan diletakkan pada sumuran yang telah dibuat sebelumnya.
- g. Diinkubasi cawan petri selama 2x24 jam pada suhu 37°C. Pertumbuhan diamati secara berkala mulai dari 1x24 jam hingga 2x24 jam.
- h. Setelah inkubasi, diamati adanya zona hambat (*zone of inhibition*) di sekitar sumuran. Zona ini menunjukkan area di mana pertumbuhan jamur terhambat oleh bahan uji.
- i. Diukur diameter zona hambat (zona bening) yang terbentuk menggunakan jangka sorong. Pengukuran dilakukan pada tiga titik berbeda dari masing-masing zona, kemudian dihitung nilai rata-ratanya. Ketiga pengukuran dilakukan dari tepi ke tepi zona bening dan harus melewati pusat sumuran seperti pada Lampiran 7 bagian J.

F. Alur Kerja Penambahan Starter Kombucha



G. Alur Kerja Penelitian



H. Pengolahan dan Analisis Data

Data didapatkan dengan cara mengukur zona hambat dari masing-masing perlakuan uji daya hambat jamur *Candida albicans* menggunakan kombucha teh bunga telang dengan variasi waktu fermentasi. Data ditampilkan dalam tabel 4.1.

ANOVA satu arah dengan tingkat kepercayaan 95% merupakan metode analisis data yang dipakai pada riset ini. Untuk menemukan perbedaan antar kelompok yang diteliti, dilakukan analisis *post hoc*.

I. *Ethical Clearance (Persetujuan Etik)*

Penelitian ini telah memperoleh persetujuan dari Komite Etik Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang setelah melalui proses kaji etik, dengan surat keterangan layak etik nomor: 203/KEPK-TJK/IV/2025 tanggal 28 April 2025.

Dalam proses penelitian, terdapat limbah laboratorium berupa sisa larutan kombucha teh bunga telang dan jamur *Candida albicans*. Limbah ini dikelola sesuai dengan prosedur pengelolaan limbah laboratorium untuk mencegah pencemaran lingkungan. Penelitian ini tidak melibatkan data pribadi atau identitas manusia yang memerlukan kerahasiaan, namun prosedur penelitian tetap mengikuti prinsip-prinsip etika laboratorium. Peneliti menanggung sepenuhnya seluruh biaya yang dibutuhkan dalam penelitian ini.