

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan ini bersifat *experimental laboratory* dengan desain penelitian RAL (Rancangan Acak Lengkap). Terdapat dua variabel yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu: Variabel bebas berupa media SDA dan media kacang polong (*Pisum sativum*) dengan konsentrasi 60%, 70%, 80%, 90%, 100% serta Variabel terikat berupa pertumbuhan jamur *Candida albicans*.

B. Waktu dan Tempat Penelitian

1. Waktu

Penelitian ini dilakukan pada bulan Mei-Juni 2025.

2. Tempat

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

C. Subyek Penelitian

Subyek penelitian ini adalah kacang polong yang didapat dari ecommerce dengan ciri-ciri panjang 2,5-10 cm, biji yang dihasilkan berwarna hijau, bulat dan halus. Kacang polong dijadikan tepung, kemudian dibuat media alternatif dengan konsentrasi 60%, 70%, 80%, 90%, 100% yang dicampur dengan dextrose dan agar. Jamur *Candida albicans* yang didapat dari UPTD Balai Labotarium Kesehatan Provinsi Lampung dan dilakukan peremajaan di Laboratorium Parasitologi Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang.

Pengulangan dilakukan sebanyak 4 kali, dan didapatkan dari perhitungan federer : $(t-1) (r-1) \geq 15$.

Keterangan :

t : treatment (Perlakuan)

r : replikasi (Pengulangan)

D. Variabel dan Definisi Operasional Penelitian

Tabel 3. 1 variabel dan definisi operasional penelitian

Variabel	Definisi	Alat Ukur	Cara Ukur	Hasil Ukur	Skala
Variabel Bebas:	Media kontrol yang	Neraca	Penimbangan	Diameter	Nominal
a. Media SDA (<i>Sabouraud Dextrose Agar</i>)	digunakan untuk pertumbuhan jamur <i>Candida albicans</i> .	analitik		<i>Candida albicans</i> pada media kontrol SDA	
b. Kacang polong (<i>Pisum sativum</i>)	Kacang polong dengan ciri-ciri panjang 2,5-10 cm, berwarna hijau, bulat dan halus yang digunakan sebagai media alternatif untuk pertumbuhan jamur <i>Candida albicans</i> .	Neraca analitik	Penimbangan	Media alternatif kacang polong konsentrasi 60%, 70%, 80%, 90% dan 100%	Nominal
Variabel terikat : <i>Candida albicans</i>	Pertumbuhan Jamur <i>Candida albicans</i> yang tumbuh pada media alternatif kacang polong dan dibandingkan dengan media kontrol SDA.	<i>Colony counter</i>	Dihitung jumlah koloni dengan <i>colony counter</i>	Jumlah koloni <i>Candida albicans</i> cfu/mL, dianggap layak jika jumlah koloninya tidak signifikan lebih rendah dari media standar	Rasio

E. Pengumpulan Data

1. Prosedur penelitian

- Membuat izin penelitian di Laboratorium Parasitologi Poltekkes Kemenkes Tanjungkarang.
- Pengajuan Kode Etik, setelah Kode Etik diajukan dan disetujui penelitian dapat dilakukan.
- Membeli kacang polong dengan biji yang dihasilkan berwarna hijau, bulat dan halus.
- Mengajukan pemesanan strain jamur *Candida albicans* ke UPTD Balai Labotarium Kesehatan Provinsi Lampung.
- Melakukan persiapan peralatan dan bahan yang digunakan dalam penelitian.

- f. Melakukan pengulangan sebanyak 4 kali. Jumlah pengulangan dihitung menggunakan rumus Federer:

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

Keterangan :

t : treatment (perlakuan)

r : replikasi (pengulangan)

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

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

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

$$5r \geq 15 + 5$$

$$r \geq 20/5$$

$$r \geq 4$$

- g. Melakukan peremajaan *Candida albicans*

- 1) Disiapkan alat dan bahan: Ose, Inkubator, Lampu Spirtus, Korek Api, Label.
- 2) Dilakukan inokulasi satu ose jamur *Candida albicans* secara aseptik, dengan cara digores pada media SDA miring.
- 3) Media yang sudah diinokulasi jamur *Candida albicans* disimpan selama 2x24 jam pada suhu 37°C dalam inkubator (Putri I R et al., 2022).

- f. Melakukan identifikasi strain *Candida albicans* (Mikroskopis)

- 1) Disiapkan alat dan bahan: Ose, Kaca obyek, Lampu Spirtus , Korek api, Spidol permanen, Mikroskop, Kertas Lensa, Minyak Imersi, Cat Gram A, B, C, D.
- 2) Diambil 1 ose koloni dari media SDA.
- 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) Dilakukan pengamatan morfologi *Candida albicans* menggunakan mikroskop dimulai dari perbesaran 100x hingga perbesaran tertinggi 1000x.

Hasil: Pewarnaan Gram *Candida albicans* 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 diinkubasi selama 2 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 di bawah mikroskop mulai dari perbesaran 100x sampai perbesaran tertinggi 1000x.

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

2. Metode

Spread plate atau metode sebar dengan melihat jumlah koloni pada media.

3. 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*, Kacang polong, Dextrose, Agar-agar, Media SDA, Antibiotik *Chloramphenicol*, BaCl₂ (*Barium Clorida*) 1%, NaCl (*Natrium Clorida*) 0,85%, H₂SO₄ (asam sulfat) 1%, Pewarnaan Gram.

b. Sterilisasi alat

- 1) Disiapkan alat yang disterilisasi.
- 2) Bersihkan dan keringkan peralatan yang digunakan.
- 3) Lakukan pembungkusan alat menggunakan kertas kopi.
- 4) Dilakukan sterilisasi alat menggunakan oven, dengan suhu 160°C dalam 1 jam (Soemarno, 2000).

c. Pembuatan media SDA

- 1) Ditimbang bubuk SDA sebanyak 16,25 gram. Lalu dimasukkan kedalam erlenmeyer 250 ml.
- 2) Tambahkan 250 ml aquades, lalu dipanaskan di atas hot plate sambil sekali kali dihomogenkan sampai larut sempurna.
- 3) Dicek pH larutan sampai pHnya 5,5.
- 4) Sterilisasi dalam autoclaf pada suhu 121°C, 15 menit.
- 5) Larutan didiamkan sampai suhu menurun, lalu ditambahkan antibiotik kloramphenikol 2 ml, dan homogenkan.
- 6) Media SDA dituang kedalam cawan petri steril 15 ml secara aseptis, dan didiamkan sampai beku.

d. Pembuatan media kacang polong

- 1) Menyiapkan alat dan bahan.
- 2) Kacang polong yang didapatkan dari ecommerce dicuci, lalu dijemur diatas sinar matahari dan ditutup dengan kain hitam sampai kering.
- 3) Kacang polong digiling sampai halus, lalu diayak.

- 4) Kacang polong, dextrose dan agar ditimbang sesuai konsentrasi 60%, 70%, 80%, 90% dan 100%.

Tabel 3. 2 komposisi berat media alternatif

No	Konsentrasi (gr)	Kacang polong (gr)	Dextrose (gr)	Agar (gr)
1.	60%	1,5	6	2,25
2.	70%	1,75	7	2,625
3.	80%	2	8	3
4.	90%	2,25	9	3,375
5.	100%	2,5	10	3,75

- 5) Tambahkan aquades 250 ml, dan dipanaskan di atas hot plate sampai mendidih.
 - 6) Diukur pHnya sampai 5,5.
 - 7) Dipanaskan kembali sampai homogen, kemudian diangkat dan erlenmeyer ditutup menggunakan kapas yang telah dibungkus menggunakan aluminium foil.
 - 8) Media sterilisasi basah dalam autoclaf pada suhu 121°C, 15 menit.
 - 9) Diamkan sampai suhu turun, lalu ditambahkan antibiotik kloramfenikol 2 ml, kemudian homogenkan.
 - 10) Media kacang polong dituang kedalam cawan petri steril 15 ml secara aseptis, dan didiamkan sampai beku.
 - 11) Inkubasi pada suhu 37°C, selama 24 jam.
- e. Pembuatan larutan kloramfenikol
- Pembuatan larutan pada media *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) dengan melarutkan 1 gram kloramfenikol dalam 100 ml aquades.
- f. Pembuatan standar kekeruhan Mc Farland
- 1) Disiapkan alat dan bahan.
 - 2) Dibuat standar kekeruhan dengan menyiapkan tabung reaksi yang ditambahkan BaCl₂ 1% sebanyak 0,5 mL.
 - 3) Ditambahkan 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 (Soemarno, 2000).
- g. 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).
- h. Pembuatan suspensi *Candida albicans* dan pengenceran suspensi
- 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 Mc Farland.
 - 4) Dipipet 1 ml suspensi *Candida albicans*.
 - 5) Dimasukkan suspensi kedalam Pengenceran pertama atau 10^{-1} yang berisi 9 ml NaCl, kemudian dihomogenkan.
 - 6) Setelah homogen suspensi pengenceran 10^{-1} dipipet 1ml, kemudian dimasukkan kedalam tabung pengenceran kedua atau 10^{-2} dihomogenkan.
 - 7) Setelah homogen suspensi pengenceran 10^{-2} dipipet 1ml, kedalam tabung pengenceran ketiga atau 10^{-3} dihomogenkan.
- i. Menginokulasi *Candida albicans* (Uji penelitian)
- 1) Penanaman pada media dengan cara diambil suspensi pengenceran 10^{-3} sebanyak 0,1 ml.
 - 2) Suspensi ditetaskan keatas permukaan media pertumbuhan dan dilakukan penyebaran menggunakan batang L steril. dilakukan inkubasi selama 2x24 jam suhu 37°C menggunakan incubator (Rahmahani & Wahyuni, 2020).
 - 3) Mengeluarkan media kacang polong dan media SDA yang sudah diinkubasi selama 2 hari.

- 4) Melakukan perhitungan jumlah koloni *Candida albicans* yang tumbuh pada media kacang polong dan SDA menggunakan alat *colony counter*.

j. Uji penegasan

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

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

F. Pengolahan Data

1. Pengolahan data

Pengolahan data diperoleh dengan cara :

- a. Dihitung jumlah koloni jamur *Candida albicans* pada media alternatif Kacang polong konsentrasi 60%, 70%, 80%, 90%, 100% dan media kontrol SDA, dihitung menggunakan alat *colony counter*.
- b. Dihitung rata-rata jumlah koloni per cawan petri pada pengulangan 1 sampai 4 kali.

2. Analisis data

Analisis data yang digunakan adalah analisis data univariat dan bivariat

- a. Analisis Univariat berupa data jumlah koloni pertumbuhan jamur *Candida albicans* terhadap variasi konsentrasi 60%, 70%, 80%, 90%, 100% dan SDA (*Sabouraud dextrose agar*) sebagai kontrol dengan pengulangan sebanyak 4 kali kemudian diakumulasikan dan dihitung rata-ratanya.
- 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 kacang polong dan media kontrol SDA pada tiap perlakuan maka dilanjutkan dengan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) dengan taraf kesalahan 5% dan tingkat kepercayaan 95%.

G. *Ethical Clearence*

Penelitian yang dilakukan oleh peneliti dilakukan atas izin komisi etik, Poltekkes kemenkes tanjungkarang dengan No.392/KEPK-TJK/VI/2025 pada tanggal 05 Juni 2025.

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 media kacang polong dan *Sabouraud Dextrose Agar* yang telah diamati selama 2 hari dan limbah suspensi jamur *Candida albicans* dalam tabung dimusnahkan dengan cara direbus pada suhu 100°C selama 30 menit, limbah hasil rebusan media plate dan suspensi *Candida albicans* dibuang ke saluran pembuangan limbah laboratorium bakteriologi yang sudah dipastikan aman, kemudian plate yang sudah digunakan dicuci menggunakan detergen dan dibilas dengan menggunakan air yang mengalir.