

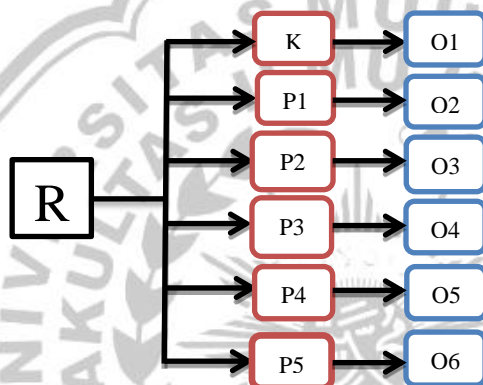
BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah bersifat *eksperimental*, yaitu untuk mengetahui adanya pengaruh variasi perasan jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) dengan variasi konsentrasi terhadap pertumbuhan *Candida albicans*.

Desain penelitian sebagai berikut :



Gambar 3.1 Desain penelitian (Sudjana,1994)

Keterangan :

- R : Random
- K+ : Kontrol positif , tanpa pemberian perasan jeruk nipis
- P1 : Pemberian perasan jeruk nipis 20%
- P2 : Pemberian perasan jeruk nipis 40%
- P3 : Pemberian perasan jeruk nipis 60%
- P4 : Pemberian perasan jeruk nipis 80%
- P5 : Pemberian perasan jeruk nipis 100%
- O1 : Observasi tanpa pemebrian perasan jeruk nipis
- O2 : Observasi setelah pemberian perasan jeruk nipis 20%
- O3 : Observasi setelah pemberian perasan jeruk nipis 40%
- O4 : Observasi setelah pemberian perasan jeruk nipis 60%
- O5 : Observasi setelah pemberian perasan jeruk nipis 80%
- O6 : Observasi setelah pemberian perasan jeruk nipis 100%

3.2 Populasi dan Sampel penelitian

3.2.1 Populasi Penelitian

Populasi dalam penelitian ini adalah biakan jamur *Candida albicans* yang ditanam pada perasan jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*).

3.2.2 Sampel Penelitian

Sampel dalam penelitian ini adalah biakan jamur *Candida albicans* yang ditanam pada perasan jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*). Sampel diambil secara random (acak). Terdapat 6 perlakuan konsentrasi dari perasan jeruk nipis dan setiap konsentrasi dilakukan minimal 4 pengulangan untuk setiap perlakuan. Yang diperoleh berdasarkan rumus. (Notobroto, 2005)

Hasil replikasi sebagai berikut :

$$p(n-1) \geq 15$$

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

$$6n - 6 \geq 15$$

$$6n \geq 21 \rightarrow n \geq 3,5 \approx 4$$

Keterangan:

p = jumlah perlakuan

n = jumlah sampel

3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

3.3.1 Lokasi Penelitian

Lokasi penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Prodi D3 Analisis Kesehatan Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Surabaya Jl. Sutorejo no. 59 Surabaya.

3.3.2 Waktu Penelitian

Waktu penelitian dilakukan pada bulan Desember 2013 sampai dengan Juni 2014, sedangkan waktu pemeriksaan dilakukan pada bulan Mei 2014.

3.4 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional Variabel

3.4.1 Variabel Penelitian

3.4.1.1 Variabel terikat : Pertumbuhan *Candida albicans*

3.4.1.2 Variabel bebas : Variasi konsentrasi perasan jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*)

3.4.1.3 Variabel kontrol : Suhu, media pertumbuhan, kontaminasi jamur lain, jumlah koloni *Candida albicans* yang diberi perlakuan

3.4.2 Definisi Operasional Variabel

3.4.2.1 Variasi konsentrasi perasan jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*): Dalam penelitian menggunakan konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, 100% untuk menguji pertumbuhan *Candida albicans*.

3.4.2.2 Pertumbuhan *Candida albicans*: Data pertumbuhan dalam penelitian ini berupa angka yang menunjukkan jumlah koloni *Candida albicans* pada setiap media *Sabaroud Dekstrose Agar* (SDA).

3.4.2.3 Suhu : Suhu yang dipakai untuk inkubasi. Jamur diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam.

3.4.2.4 Kontaminasi jamur lain: Tumbuhnya jamur lain yang dapat terkontaminasi pada *Sabaroud Dekstrose Agar* (SDA).

3.4.2.5 Media pertumbuhan : Media pertumbuhan menggunakan *Sabaroud Dekstrose Agar* (SDA) merupakan media selektif untuk pertumbuhan jamur.

3.4.2.6 Jumlah *Candida albicans*: Penanaman jamur menggunakan standar Mc Farland. Standar Mc Farland ini dipakai untuk memperoleh jumlah koloni jamur yang seragam sebelum ditanam pada *Sabaroud Dektrose Agar* (SDA).

3.5 Metode Pengumpulan Data

Data pertumbuhan *Candida albicans* dikumpulkan dengan cara pemeriksaan laboratorium dengan langkah, sebagai berikut :

3.5.1 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian antara lain : autoclave, cawan petri, tabung reaksi, rak tabung, lampu spiritus, inkubator, kaki tiga dan asbes, ose bulat, batang pengaduk, pipet ukur, filler, vortex, timbangan analitik, hot plate, pisau, saringan, corong, telenan, erlenmeyer, beaker glass.

Bahan pemeriksaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah perasan jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) dan biakan jamur *Candida albicans*, sedangkan media yang dipakai adalah *Sabaroud Dektrose Agar* (SDA). Bahan lain yang digunakan antara lain : PZ steril, aquades steril, alkohol 96%, Ba₂Cl 1%, H₂SO₄ 1%.

3.5.2 Sterilisasi Alat dan Bahan

Semua alat dan bahan yang akan digunakan dalam penelitian ini sebelumnya disteril dalam autoclave, dengan menggunakan suhu 121°C selama 15 menit.

Prosedur sterilisasi :

1. Memasukkan air secukupnya ke dalam bejana.
2. Memasang pemanasnya.

3. Memasukkan bahan dan alat yang akan disterilkan ke dalam bejana diatas lempeng yang berlubang lalu autoclave dikunci tutupnya hingga kuat.
4. Membuka pentil pengaman sampai semua udara didalam bejana keluar.
5. Menutup katup pengaman dan biarkan sampai suhu 121°C serta mempertahankan selama 15 menit.
6. Mematikan pemanas, biarkan suhu turun lalu katup pengaman dibuka tutup agar tekanan udara dalam bejana turun.
7. Membuka autoclave setelah suhunya menunjukkan angka 0.(Novel dkk,2010)

3.5.3 Pembuatan Media *Sabaroud Dektrose Agar* (SDA)

Alat yang digunakan adalah gelas arloji, erlenmeyer 500ml, batang pengaduk, pipet ukur 10ml, neraca analitik, hot plate, plate, gelas ukur, pH media, pipet tetes.

Bahan yang digunakan adalah pepton 10 gram, glukosa 40 gram, bacto agar 18 gram, aquadest 1000 ml, lar. Chloramphenicol steril.

Prosedur :

1. Menimbang semua bahan dan memasukkan ke dalam erlenmeyer.
2. Melarutkan bahan-bahan tersebut dengan 1000ml aquades kedalam erlenmeyer.
3. Memanaskan sampai larut sempurna (mendidihkan kira-kira 1 sampai 3 menit).

4. Menutup erlenmeyer dengan kapas berlemak yang diselimuti dengan kain kasa dan bungkus mulut erlenmeyer dengan kertas koran serta ikat dengan tali.
5. Mensterilkan dengan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit.
6. Setelah selesai disterilkan tambahkan dengan larutan chloramphenicol 2 ml secara steril kedalam larutan media tadi (larutan chloramphenicol : 250mg chloramphenicol ditambah 10ml Pz steril). Melakukan penambahan larutan chloramphenicol ke dalam larutan media sebelum membeku.
7. Menuangkan larutan media pada plate steril. Semua tahapan dilakukan secara steril. (Soewarsono, 1996)

3.5.4 Pembuatan Perasan Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*)

Cara pembuatan perasan jeruk nipis dalam penelitian ini, sebagai berikut :

1. Menyiapkan semua bahan dan alat yang akan digunakan dalam keadaan steril.
2. Mencuci jeruk nipis dengan aquades lalu bilas lagi dengan alkohol 96%.
3. Memotong jeruk nipis menjadi dua lalu peras dan ditampung pada erlenmeyer steril yang di atasnya sudah ada corong, kertas saring dan saringan.
4. Melakukan semua hal dalam keadaan steril.
5. Hasil saringan yang didapat dianggap mempunyai konsentrasi 100%.
6. Melakukan sterilisasi bahan dengan mengkultur pada media *Sabaroud Dekstrose Agar* (SDA) diinkubasi 37°C selama 24 jam.

Apabila tidak terdapat pertumbuhan jamur maka bahan perasan dinyatakan steril.(Galuh dkk,2012)

3.5.5 Pembuatan suspensi Jamur *Candida albicans*

3.5.5.1 Prodesur Pembuatan Standart Mc Farland 0,5

1. Memipet 0.05 ml Barium Klorida ($BaCl_2$) 1% kedalam tabung reaksi.
2. Menambahkan 9,95 ml Asam Sulfat (H_2SO_4) 1%.
3. Mencampur kedua larutan tersebut hingga didapat standart Mc Farland 0,5 dan setara dengan jumlah jamur $1,5 \times 10^8$ CFU/ml.(Aulia abdul dkk,2012)

3.5.5.2 Prosedur Pembuatan suspensi jamur *Candida albicans*

1. Mengisi tabung reaksi dengan 1 ml PZ steril.
2. Menambahkan 1 mata ose bulat biakan murni jamur *Candida albicans*, menghomogenkan.
3. Membandingkan dengan standart Mc farland 0,5.
4. Bila suspensi jamur lebih keruh dari standart Mc farland 0,5 maka ditambah PZ steril.
5. Bila suspensi jamur kekeruhannya kurang maka ditambah dengan biakan jamur murni.

3.5.6 Pengenceran Perasan Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*)

Pengenceran perasan jeruk nipis menggunakan metode dilusi tabung. Perasan jeruk nipis dibuat pengenceran dengan konsentrasi tertentu menggunakan aquadest steril menjadi 20%, 40%, 60%, 80%, 100%. Cara pengenceran :

1. Menyiapkan 24 tabung reaksi steril dan diberi label keterangan konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, 100%
2. Membuat deret konsentrasi perasan jeruk nipis dan kontrol, diisi sebagai berikut :
 - a. Konsentrasi 100% : 1 ml perasan jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*)
 - b. Konsentrasi 80% : 0,8 ml perasan jeruk nipis + 0,2 ml aquades steril
 - c. Konsentrasi 60% : 0,6 ml perasan jeruk nipis + 0,4 ml aquades steril
 - d. Konsentrasi 40% : 0,4 ml perasan jeruk nipis + 0,6 ml aquades steril
 - e. Konsentrasi 20% : 0,2 ml perasan jeruk nipis + 0,8 ml aquades steril
3. Untuk tabung kontrol positif dengan kode K, diisi 2 ml suspensi jamur.
4. Memberikan suspensi jamur *Candida albicans* sebanyak 1 ml pada semua tabung perlakuan, ditutup dengan kapas steril lalu divortex.
5. Selanjutnya menginkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam, dan diamati kekeruhannya.(Galuh dkk,2012)

3.5.7 Penanaman Pada Media *Sabaroud Dekstrose agar* (SDA)

Setelah mengamati kekeruhan, dari tiap-tiap tabung hasil uji dilusi tabung melakukan penanaman dengan cara penggoresan (*streaking*) pada medium padat SDA. Prosedur penanaman :

1. Memberi label pada masing-masing media SDA sesuai konsentrasinya.
2. Mensteril ose bulat standart menggunakan lampu spiritus hingga merah membara, lalu dinginkan.
3. Mengambil 1 mata ose koloni jamur pada setiap konsentrasi.
4. Menggesekkan pada media SDA sesuai dengan konsentrasi masing-masing perasan jeruk nipis.
5. Lakukan juga pada kontrol positif.
6. Inkubasi pada inkubator dengan suhu 37°C selama 48 jam. Setelah diinkubasikan, hitung koloni yang tumbuh pada SDA untuk menentukan Kadar Bunuh Minimal (KBM).(Sri winarsih dkk,2011)

3.5.8 Interpretasi Hasil

Daya antifungi perasan jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) terhadap pertumbuhan *Candida albicans* dapat diketahui dari nilai KHM dan KBM yang diperoleh. Berdasarkan hasil uji dilusi tabung, diperoleh nilai Kadar Hambat Minimal (KHM) dengan melihat tingkat kekeruhan yang terjadi. Berdasarkan jumlah pertumbuhan koloni hasil *streaking* pada media SDA diperoleh nilai Kadar Bunuh Minimal (KBM).(Sri winarsih dkk,2011) Secara makroskopis jamur *Candida albicans* yaitu bentuk koloni menonjol dari permukaan medium, permukaan koloni halus, licin, keruh, berwarna krem dan berbau ragi.

Untuk memperoleh hasil penelitian secara eksperimental diperoleh data dari pertumbuhan koloni dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh variasi konsentrasi perasan jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) terhadap pertumbuhan *Candida albicans*. Hasil ditabulasi pada tabelberikut :

Tabel 3.1 Data Hasil Penelitian tentang Pengaruh Variasi Konsentrasi Perasan Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*) terhadap Pertumbuahn *Candida albicans*.

Pengulangan	<i>Candida albicans</i> pada media Sabaroud Dekstrose Agar (SDA)					
	100%	80%	60%	40%	20%	Control
1						
2						
3						
4						

3.6 Metode Analisis Data

Dari data hasil penelitian maka dilakukan uji Anova One-Way sesuai dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh variasi konsentrasi perasan jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) terhadap pertumbuhan *Candida albicans*, menggunakan skala rasio dengan taraf signifikan 5% ($\alpha = 0,05$).