

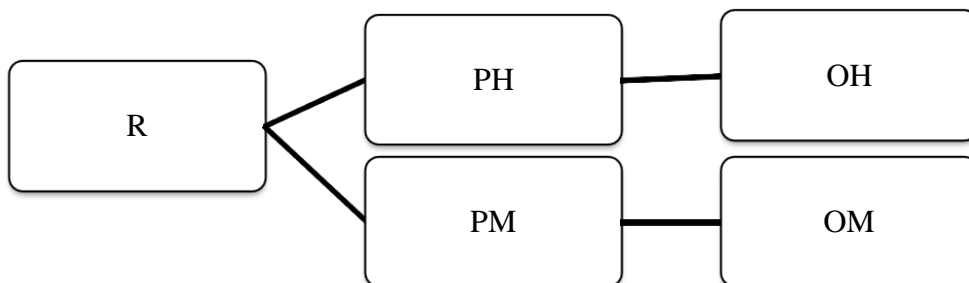
BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah bersifat eksperimen laboratoris, yaitu merupakan suatu metode untuk mengetahui pengaruh yang timbul, sebagai akibat adanya perlakuan tertentu yang dilakukan di laboratorium, dimana dalam hal ini untuk mengetahui perbedaan pertumbuhan *Candida albicans* antara pemberian daun sirih hijau (*piper betle linn*) dan sirih merah (*Piper crocatum*).

Desain atau rancangan penelitian adalah sebagai berikut :



(Notoatmodjo, 2010)

Gambar 3.1 Desain atau Rancangan Penelitian

Keterangan :

R : Random

PH : Pemberian kertas cakram yang mengandung perasan daun sirih hijau

PM : Pemberian kertas cakram yang mengandung perasan daun sirih merah

OH : Observasi zona hambat *Candida albicans* dengan pemberian kertas cakram yang mengandung perasan daun sirih hijau

OM : Observasi zona hambat *Candida albicans* dengan pemberian kertas cakram yang mengandung perasan daun sirih merah

3.2 Populasi dan Sampel penelitian

3.2.1 Populasi penelitian

Candida albicans dalam media pertumbuhan. *Candida albicans* yang ditumbuhkan berasal dari biakan murni yang diperoleh dari Balai Besar Laboratorium Kesehatan (BBLK) Surabaya.

3.2.2 Sampel penelitian

Pada penelitian ini sampel diambil secara acak/random, besar sampel pada penelitian ini adalah 16 yang ditentukan dengan rumus sebagai berikut :

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

$$(n - 1) (2 - 1) \geq 15$$

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

$$n - 1 \geq 15$$

$$n \geq 15 + 1$$

$$n \geq 16$$

Keterangan :

K : Perlakuan atau jumlah kelompok

N : Replikasi atau jumlah ulangan atau jumlah sampel

3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

3.3.1 Lokasi Penelitian

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

3.3.2 Waktu penelitian

Waktu penelitian dilakukan pada bulan April sampai dengan bulan Juli 2013. Sedangkan waktu pemeriksaan sampel penelitian dilakukan pada bulan Juni 2013.

3.4 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

3.4.1 Variabel Penelitian

Variabel bebas : jenis daun sirih :

Daun sirih hijau (*Piper betle*) dan daun sirih merah (*Piper crocatum*)

Variabel terikat : pertumbuhan *Candida albicans*

3.4.2 Definisi Operasional

- a. Pemberian daun sirih hijau (*Piper betle*) dan daun sirih merah (*Piper crocatum*) dalam penelitian ini dikategorikan menjadi :
 1. Dengan pemberian daun sirih hijau (*Piper betle*) yaitu media pertumbuhan *Candida albicans* diberi cakram kertas yang mengandung daun sirih hijau (*Piper betle*).
 2. Dengan pemberian daun sirih merah (*Piper crocatum*) yaitu media pertumbuhan *Candida albicans* diberi cakram kertas yang mengandung daun sirih merah (*Piper crocatum*).
- b. Pertumbuhan *Candida albicans* pada penelitian ini berupa angka yang menunjukkan zona hambat pertumbuhan dalam satuan mm yang ditetapkan berdasarkan metode pemeriksaan.
- c. Zona hambat pertumbuhan *Candida albicans* ditandai dengan terbentuknya daerah hambatan atau adanya zona jernih yang ada disekililing cakram kertas berupa ukuran diameter daerah jernih. Pengukuran dilakukan menggunakan penggaris dimulai dari tepi cakram.

3.5 Teknik Pengumpulan Data

3.5.1 Metode pemeriksaan

Data zona hambat diperoleh dari hasil uji laboratorium yang menggunakan metode difusi cakram (*Diffusion Method*), dengan mengamati area zona jernih disekeliling cakram kertas.

3.5.2 Prinsip Pemeriksaan

Cakram kertas yang mengandung perasan daun sirih hijau (*Piper betle*) dan daun sirih merah (*Piper crocatum*) diletakkan diatas media *Sabaroud Dektrose Agar* (SDA) yang telah ditanami *Candida albicans*, kemudian diinkubasikan 37⁰C selama 24 jam. Selanjutnya diamati adanya area zona jernih disekeliling cakram kertas yang menunjukkan tidak adanya pertumbuhan *Candida albicans*.

3.5.3 Alat Penelitian

1. Plate / petridish
2. Tabung reaksi
3. Autoclave
4. Kertas saring (Whatman)
5. Lampu spirtus
6. Beaker glass
7. Inkubator
8. Filler
9. Timbangan
10. Mortir
11. Stampler
12. Pinset
13. Mikropipet
14. Erlenmeyer

3.5.4 Bahan Pemeriksaan

1. Cakram kertas yang mengandung daun sirih hijau (*Piper betle*)
2. Cakram kertas yang mengandung daun sirih merah (*Piper crocatum*)
3. Media *Sabaroud Dektrose Agar* (SDA)
4. Aquadest steril dan PZ

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

Semua alat dan bahan yang akan digunakan dalam penelitian ini sebelumnya disterilkan dalam autoclave. Sterilisasi dalam autoclave menggunakan suhu 121°C selama 15 menit, berdasarkan buku petunjuk praktikum mikrobiologi prosedur sterilasi menggunakan autoclave sebagai berikut :

Cara sterilisasi :

- a. Memasukan air secukupnya kedalam bejana.
- b. Kemudian memasang pemanasnya.
- c. Memasukan bahan dan alat yang akan disterilkan kedalam bejana diatas lempeng yang berlubang lalu autoclave dikunci tutupnya hingga kuat.
- d. Membuka pentil pengaman sampai semua udara didalam bejana keluar.
- e. Menutup katup pengaman dan biarkan sampai suhu 121°C dipertahankan selama 15 menit.
- f. Mematikan pemanas, biarkan suhu turun lalu katup pengaman dibuka agar tekanan udara dalam bejana turun.

- g. Setelah itu buka autoclave setelah suhunya menunjukkan angka 0.

3.6.2 Pembuatan Perasan Daun Sirih Hijau (*Piper betle*)

Menurut Hendrayani (2005), teknik pembuatan perasan daun sirih hijau adalah sebagai berikut :

- a. Menyiapkan semua bahan dan alat yang akan digunakan.
- b. Mengambil daun sirih hijau, daun sirih hijau dipilih yang tidak terlalu tua dan tidak terlalu muda.
- c. Mencuci daun sirih hijau menggunakan aquadest yang bertujuan untuk membersihkan kotoran yang melekat seperti sisa debu atau bahan pestisida.
- d. Merajang daun sirih merah tadi selebar ± 1 cm dengan memakai pisau yang tajam, yang bertujuan untuk memperluas permukaan daun agar mempermudah saat proses penumbukan berlangsung.
- e. Menimbang 100gr daun sirih, kemudian ditumbuk menggunakan mortir sampai halus,
- f. Kemudian diperas menggunakan kasa steril setelah itu disentrifuge dan diambil supernatant.
- g. Melakukan sterilitas bahan dengan mengkultur bahan pada media *Sabaroud Dektrose Agar* (SDA) diinkubasi 37°C selama 24 jam. Apabila tidak terdapat pertumbuhan jamur maka sampel perasan dinyatakan steril.

3.6.3 Pembuatan Perasan Daun Sirih Merah (*Piper betle Crocatum*)

Tekhnik pembuatan perasan daun sirih merah dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

- a. Menyiapkan semua bahan dan alat yang akan digunakan.
- b. Mengambil daun sirih merah, daun sirih merah dipilih yang tidak terlalu tua dan tidak terlalu muda.
- c. Mencuci daun sirih merah menggunakan aquadest yang bertujuan untuk membersihkan kotoran yang melekat seperti sisa debu atau bahan pestisida.
- d. Merajang daun sirih merah tadi selebar ± 1 cm dengan memakai pisau yang tajam, yang bertujuan untuk memperluas permukaan daun agar mempermudah saat proses penumbukan berlangsung.
- e. Menimbang 100gr daun sirih, kemudian ditumbuk menggunakan mortir sampai halus.
- h. Kemudian diperas menggunakan kasa steril setelah itu disentrifuge dan diambil supernatan.
- f. Melakukan sterilitas bahan dengan mengkultur bahan pada media *Sabaroud Dektrose Agar* (SDA) diinkubasi 37°C selama 24 jam. Apabila tidak terdapat pertumbuhan jamur maka sampel perasan dinyatakan steril.

3.6.4 Pembuatan Suspensi Jamur *Candida albicans*

Prosedur :

1. Pembuatan Standart Mac Farland 0,05
 - a. Memipet 0,05 ml Barium Klorida (BaCl_2) 1% kedalam tabung reaksi.
 - b. Kemudian tambah 9,95 ml Asam Sulfat (H_2SO_4) 1%.
 - c. Mencampur kedua larutan tersebut sehingga didapatkan standart Mac Farland 0,05 maka setara dengan jumlah spora jamur $1,5 \times 10^8$ CFU/ml.

2. Pembuatan suspensi jamur *Candida albicans* menggunakan standart Mac Farland 0,05 = $1,5 \times 10^8$ CFU/ml :
 - a. Mengisi tabung reaksi dengan 10 ml PZ steril.
 - b. Tambahkan 1 mata ose bulat biakan murni jamur *Candida albicans*.
 - c. Kemudian homogenkan, bandingkan dengan standart Mac Farland 0,05.
 - d. Bila suspensi jamur lebih keruh dari standart Mac Farland 0,05 maka ditambah PZ.
 - e. Bila suspensi jamur kekeruhannya kurang maka ditambah dengan biakan jamur murni.

3.6.5 Prosedur Membuat Cakram Kertas

1. Menyiapkan kertas saring (cakram kertas) dengan diameter 6 mm yang telah disterilisasi.
2. Memasukkan kertas saring (cakram kertas) kedalam perasan daun sirih hijau (*Piper betle*) dan perasan daun sirih merah (*Piper crocatum*) dengan menggunakan pinset steril.
3. Kemudian direndam \pm 2 jam, hingga jenuh atau perasan tersebut terhisap sempurna oleh kertas saring (cakram kertas), kemudian dikeringkan.

3.6.6 Prosedur Penanaman pada Media *Sabaroud Dektrose Agar* (SDA)

1. Memasukkan lidi kapas steril kedalam suspensi jamur *Candida albicans* dan tekan lidi kapas pada dinding tabung.
2. Menyetrik lidi kapas tersebut keseluruh permukaan media SDA.
3. Meletakkan cakram kertas yang sudah mengandung perasan daun sirih hijau (*Piper betle*) dan daun sirih merah (*Piper crocatum*) diatas media

SDA (*Saboroud Dektrose Agar*), kemudian inkubasi 37⁰ C selama 24 jam.

4. Zona hambat pertumbuhan diukur mulai dari tepi cakram, yang ditandai dengan terbentuknya daerah hambatan atau zona jernih yang ada disekeliling cakram kertas.

3.7 Metode Pengumpulan Data

Untuk memperoleh data dan informasi, maka dari hasil penelitian secara eksperimental ini diperoleh dari data zona hambat pertumbuhan *Candida albicans*, dengan tujuan untuk mengetahui perbedaan pertumbuhan *Candida albicans* antara pemberian daun sirih hijau (*Piper betle*) dan daun sirih merah (*Piper crocatum*).

Tabel 3.1 Data hasil penelitian tentang perbandingan pertumbuhan *Candida albicans* antara pemberian daun sirih hijau (*Piper betle*) dan daun sirih merah (*Piper crocatum*)

| No | Hasil zona hambat daun sirih hijau (mm) | Hasil zona hambat daun sirih merah (mm) |
|----|---|---|
| 1 | | |
| 2 | | |
| 3 | | |
| 4 | | |
| 5 | | |
| 6 | | |
| 7 | | |
| 8 | | |
| 9 | | |
| 10 | | |
| 11 | | |
| 12 | | |
| 13 | | |
| 14 | | |
| 15 | | |
| 16 | | |

3.8 Metode Analisa Data

Data zona hambat pertumbuhan *Candida albicans* dianalisis dengan uji t bebas yaitu untuk membandingkan antara pemberian daun sirih hijau (*Piper betle*) dan sirih merah (*piper crocatum*) pada tingkat kesalahan 5%. ($\alpha = 0,05$).