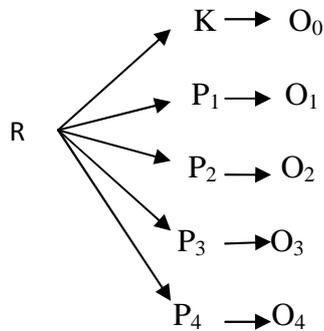


BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimental yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian filtrat tanaman kucing-kucingan (*Acalypha indica* Linn) terhadap pertumbuhan jamur *Trichophyton mentagrophytes*. Sedangkan design penelitiannya adalah sebagai berikut :



Gambar 3.1 Design atau Rancangan Penelitian

Keterangan :

R : Random

K : Kontrol (tanpa perlakuan) 0%

P₁ : Perlakuan pemberian konsentrasi filtrat tanaman kucing-kucingan 40%

P₂ : Perlakuan pemberian konsentrasi filtrat tanaman kucing-kucingan 30%

P₃ : Perlakuan pemberian konsentrasi filtrat tanaman kucing-kucingan 20%

P₄ : Perlakuan pemberian konsentrasi filtrat tanaman kucing-kucingan 10%

O₀ : Observasi pertumbuhan jamur tanpa adanya perlakuan 0%

O₁: Observasi setelah pemberian konsentrasi filtrat tanaman kucing-kucingan 40%

O₂ : Observasi setelah pemberian konsentrasi filtrat tanaman kucing-kucingan 30%

O₃ : Observasi setelah pemberian konsentrasi filtrat tanaman kucing-kucingan 20%

O₄ :Observasi setelah pemberian konsentrasi filtrat tanaman kucing-kucingan 10%

3.2 Populasi dan Sampel Penelitian

3.2.1 Populasi penelitian

Populasi dalam penelitian ini adalah biakan murni jamur *Trichophyton mentagrophytes* yang tumbuh pada media *Saboroud Dextrose Agar* (SDA).

3.2.2 Sampel penelitian

Sampel yang diperiksa adalah koloni dari biakan murni *Trichophyton mentagrophytes* yang telah diisolasi di media *Sabouroud Dextrose Agar* (SDA).

Dalam penelitian ini, untuk setiap perlakuan dilakukan masing-masing sebanyak 5 kali pengulangan yang diperoleh berdasarkan rumus Maliki (2003), dalam Anggraeni (2008), hasil replikasi sebagai berikut :

$$(t - 1) (r - 1) = 15$$

$$(5 - 1) (r - 1) = 15$$

$$4 (r - 1) = 15$$

$$4r - 4 = 15$$

$$4r = 15 + 4$$

$$r = 4,75 \approx 5$$

keterangan :

r : Replikasi atau pengulangan

t : Perlakuan

sehingga seluruhnya terdapat 5 pengulangan x 5 perlakuan = 25 unit percobaan.

Untuk total sampel yang dibutuhkan adalah sebanyak 25 x 1 mata ose suspensi jamur (setara dengan Mac Farland 0,5 yang mengandung $1,5 \times 10^8$ CFU/ml).

3.3 Lokasi dan waktu penelitian

3.3.1 Lokasi

Lokasi pemeriksaan sampel dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Prodi D3 Analis Kesehatan Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Surabaya.

3.3.2 Waktu penelitian

Waktu penelitian dilakukan pada bulan Januari sampai bulan Juni 2014. Sedangkan waktu pemeriksaan dilakukan pada bulan Maret 2014.

3.4 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

3.4.1 Variabel Penelitian

Dalam penelitian ini, variabel penelitian terdiri dari :

1. Variabel bebas : Konsentrasi filtrat tanaman kucing-kucingan (*Acalypha indica* Linn).
2. Variabel terikat : Pertumbuhan jamur *Trichophyton mentagrophytes*.
3. Variabel kontrol : Sterilisasi, inkubasi, cara inokulasi, volume suspensi jamur.

3.4.2 Definisi Operasional

Definisi operasional variabel penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Konsentrasi filtrat adalah berat kering tanaman kucing-kucingan per volume aquadest (dalam %), dimana konsentrasi terdiri dari 40%, 30%, 20%, 10% dan 0% (dalam berat/volum), variabel konsentrasi dalam skala ordinal.
2. Pertumbuhan jamur dalam penelitian ini berupa angka yang menunjukkan jumlah koloni jamur *Trichophyton mentagrophytes* (Koloni/ml) yang tetap

tumbuh setelah 5 hari dan diberi perlakuan pada setiap media pertumbuhan, variabel pertumbuhan jamur dalam skala rasio.

3.5 Metode Pengumpulan Data

Data tentang pertumbuhan jamur *Trichophyton mentagrophytes* diperoleh dari hasil uji laboratorium pada sampel yang telah diberi perlakuan dengan berbagai konsentrasi filtrat tanaman kucing-kucingan (*Acalypha indica* Linn) dengan langkah-langkah sebagai berikut :

3.5.1 Persiapan pemeriksaan

3.5.1.1 Cara Sterilisasi alat dan bahan

1. Mengisi bagian dasar Autoklaf dengan aquades hingga batas tertentu.
2. Menutup sekat yang berlubang-lubang antara bagian dasar dan bagian atas Autoklaf.
3. Memasukkan alat dan bahan-bahan yang akan disterilkan.
4. Menutup Autoklaf dengan seksama dan serapih mungkin, dengan cara berlawanan.
5. Membuka katup udara agar uap air dapat mengusir udara yang ada dalam Autoklaf pada saat pemanasan.
6. Apabila suhu telah mencapai 10°C tutuplah katup udara untuk meningkatkan tekanan uap di dalam Autoklaf.
7. Perhatikan kenaikan suhu atau tekanan uap apabila telah mencapai 121°C atau tekanan $1,1 \text{ kg/ cm}^2$. Sterilisasi dipertahankan 15 menit setelah suhu atau tekanan uap mencapai batas tertentu.

8. Membuka katup Autoklaf dengan cara buka-tutup hingga tekanan uap turun.
9. Membuka tutup Autoklaf dengan hati-hati
10. Mengeluarkan alat dan bahan-bahan yang telah disterilisasi (Novel dkk, 2010).

3.5.1.2 Pembuatan Media *Saboroud Dextrose Agar* (SDA)

Alat yang digunakan adalah Gelas Arloji, Erlenmeyer 500 ml, Batang pengaduk, Pipet ukur 1ml, Neraca Analitik, Hot plate, Petri disk, Gelas ukur 500 ml, PH media, Pipet tetes.

Bahan yang digunakan adalah Media *Saboroud Dextrose Agar* (SDA) yang terdiri dari : Pepton 10 gram, Glukosa 40 gram, Bacto agar 18 gram, Aquadest 1000 ml (Soewarsono, 1996).

Prosedur :

1. Menimbang semua bahan dan memasukkan kedalam erlenmeyer.
2. Melarutkan bahan-bahan tersebut dengan 1000 ml Aquadest ke dalam 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 dan ikat dengan tali.
5. Mensterilkan dengan autoklaf pada suhu 121⁰C selama 15 menit.
6. Setelah selesai disterilisasi tambahkan dengan larutan chloramphenicol 2 ml secara steril kedalam larutan media tadi (larutan Chloramphenicol steril :

250 mg chloramphenicol ditambah 10 ml PZ steril). Melakukan penambahan larutan chloramphenicol kedalam media sebelum media memadat.

7. Setelah itu menuangkan media pada cawan petri steril. Melakukan semua tahapan diatas secara stereril (Soewarsono, 1996).

3.5.1.3 Pengeringan Tanaman Kucing-kucingan (*Acalypha indica* Linn)

1. Mengambil tanaman kucing-kucingan yang tidak cacat (daun tidak berlubang).
2. Mencuci tanaman kucing-kucingan dengan air yang mengalir.
3. Memotong bagian-bagian tanaman (daun, batang dan akar).
4. Mengeringkan tanaman kucing-kucingan dengan menggunakan oven 50⁰C selama 2 jam.

3.5.1.4 Pembuatan Filtrat Tanaman Kucing-kucingan (*Acalypha indica* Linn)

Alat yang digunakan adalah Neraca analitik, Batang pengaduk, Kertas saring, Beaker glass 250 ml, Pipet volume 10 ml, Gelas arloji, Pipet ukur 10 ml

Bahan yang digunakan adalah Tanaman Kucing-kucingan dan aquadest steril.

Prosedur:

1. Tanaman Kucing-kucingan yang telah kering dihaluskan dengan mortar
2. Menimbang dengan gelas arloji sebanyak 8 gram
3. Melarutkan dengan aquadest steril sebanyak 20 ml
4. Menyaring dengan kertas saring, sehingga didapatkan filtrat 40 %
5. Cara Pembuatan Konsentrasi :
 - a. Pipet sebanyak 7,5 ml dari konsentrasi 40% + larutkan dengan aquadest steril sebanyak 2,5 ml.

- b. Pipet sebanyak 5 ml dari konsentrasi 40% + larutkan dengan aquadest steril sebanyak 5 ml.
- c. Pipet sebanyak 2,5 ml dari konsentrasi 40% + larutkan dengan aquadest steril sebanyak 7,5 ml.

3.5.1.5 Pembuatan standart Mac Farland 0,5

Alat yang digunakan adalah Tabung reaksi, Pipet ukur 1 dan 10 ml, dan Filler atau push ball.

Reagensia yang digunakan adalah Barium Klorida (BaCl_2) 1% dan Asam Sulfat (H_2SO_4) 1%.

Prosedur :

1. Menyediakan tabung reaksi yang bersih dan bebas dari lemak.
2. Pipet dan masukkan 0,05 ml Barium Klorida (BaCl_2) 1% kedalam tabung reaksi tersebut.
3. Menambahkan 9,95ml Asam Sulfat (H_2SO_4) 1% kedalam tabung yang telah berisi 0,05 ml Barium Klorida (BaCl_2) 1%.
4. Mencampur kedua larutan dalam tabung tersebut sehingga didapatkan standart Mac Farland 0,5 dan setara dengan jumlah spora jamur $1,5 \times 10^8$ CFU/ml (Anonim, 2005).

3.5.1.6 Pembuatan suspensi jamur *Trichophyton mentagrophytes* menggunakan standart Mac Farland 0,5 = $1,5 \times 10^8$ CFU/ml

Alat yang digunakan adalah Ose bulat, Tabung reaksi, dan Pipet pastur

Bahan yang digunakan adalah PZ steril (NaCl 0,85%-0,9%) dan Biakan murni jamur *Trichophyton mentagrophytes*

Prosedur :

1. Mengambil biakan murni koloni jamur *Trichophyton mentagrophytes* dengan ose bulat.
2. Memindahkannya ke dalam tabung reaksi yang berisi PZ (NaCl 0,85%-0,9%) lalu homogenkan.
3. Membandingkan kekeruhan dengan standart Mac Farland 0,5. Bila didapatkan kekeruhan suspensi jamur *Trichophyton mentagrophytes* yang melebihi standart Mac Farland 0,5 maka tambahkan PZ (NaCl 0,85%-0,9%) steril, dan apabila kekeruhan yang diperoleh masih kurang dari standart Mac Farland 0,5 maka tambahkan dengan biakan murni jamur *Trichophyton mentagrophytes*, lakukanlah hal tersebut sampai didapatkan suspensi jamur *Trichophyton mentagrophytes* yang sesuai dengan standart Mac Farland 0,5.

3.5.1.7 Pencampuran suspensi jamur dengan filtrat tanaman kucing-kucingan

Alat yang digunakan adalah Pipet ukur 1 ml dan Tabung reaksi

Bahan yang digunakan adalah Suspensi Jamur dan Filtrat Tanaman kucing-kucingan

Prosedur :

1. Mengambil 1 ml suspensi jamur lalu memasukkannya kedalam tabung reaksi
2. Mengambil 1 ml filtrat tanaman kucing-kucingan dengan konsentrasi 40% memasukkannya kedalam tabung reaksi yang berisi suspensi, homogenkan agar suspensi tercampur sempurna, inkubasi 37⁰C selama 24 jam.
Lakukan hal yang sama pada konsentrasi 30%, 20% dan 10%.

Tujuannya agar perbandingan suspensi dan filtrat sama yaitu 1 : 1

3.5.2 Pemeriksaan Penelitian

3.5.2.1 Metode pemeriksaan

Penelitian ini memakai metode *Total Plate Count* atau Angka Lempeng Total (ALT) dengan cara streking. Dimana hasil pemeriksaannya berupa jumlah pertumbuhan koloni jamur *Trichophyton mentagrophytes* yang tumbuh pada media *Sabouroud Dextrose Agar* (SDA).

3.5.2.2 Prinsip Pemeriksaan

Diamati ada tidaknya pertumbuhan koloni jamur *Trichophyton mentagrophytes* setelah diberi perlakuan dengan berbagai konsentrasi filtrat tanaman kucing-kucingan, yang tumbuh pada media *Sabouroud Dextrose Agar* (SDA) yang akan diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 5x24 jam.

3.5.2.2.1 Penanaman suspensi kuman pada media *Sabouroud Dextrosa Agar* (SDA)

Alat yang digunakan adalah ose bulat yang telah di tera dan Bunsen

Bahan yang digunakan adalah Campuran suspensi (suspensi jamur yang telah dicampur filtrat) dan Media *Saboroud Dextrose Agar* (SDA)

Prosedur :

1. Campuran suspensi di ambil satu mata ose menggunakan ose bulat yang telah di steril dengan api bunsen, lalu di gesekkan pada permukaan media *Saboroud Dextrose Agar* (SDA). Kemudian ose kembali di steril dengan api bunsen.
2. Dengan cara yang sama, lakukan hal yang serupa untuk konsentrsi filtrat kucing-kucingan yang lainnya.
3. Selanjutnya diinkubasi pada inkubator 37⁰C selama 5x24 jam.

4. Amati pertumbuhan koloni jamur *Trichophyton mentagrophytes* yang tumbuh pada media SDA (Dwidjoseputro, 1998).

3.6 Tabulasi Data

Data diperoleh dari pertumbuhan jamur *Trichophyton mentagrophytes* yang tumbuh pada media *Sabouroud Dextrose Agar* (SDA) yang telah diinkubasi selama 5x24 jam setelah diberi perlakuan dengan filtrat tanaman kucing-kucingan, yang kemudian hasil perolehan data ditabulasikan kedalam tabel sebagai berikut :

Tabel 3.1 Tabulasi Data Hasil Penelitian Pengaruh Pemberian Konsentrasi Filtrat Tanaman Kucing-kucingan Terhadap Pertumbuhan Jamur *Trichophyton mentagrophytes*.

No	Kode Sampel / pengulangan	Hasil pemeriksaan pertumbuhan kuman (koloni/gr) pada pemberian filtrat tanaman kucing-kucingan				
		40%	30%	20%	10%	0%
1	D ₁					
2	D ₂					
3	D ₃					
4	D ₄					
5	D ₅					
Jumlah						
Rata – rata						
SD						

3.7 Metode Analisa Data

Untuk mengetahui apakah ada pengaruh filtrat tanaman kucing-kucingan (*Acalypha indica* Linn) terhadap pertumbuhan jamur *Trichophyton mentagrophytes*, maka digunakan Analisis of Varians (ANOVA) dengan taraf signifikansi () 0,05.