

BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang akan digunakan adalah penelitian yang bersifat *eksperimental* yaitu dengan mengobservasi dan menganalisis pengaruh dari karbondioksida terhadap pembentukan germ tube *Candida albicans* (Notoatmodjo, 2012). Penelitian ini menggunakan rancangan Posttest dengan kelompok kontrol (*Posttest Only Control Group Design*), rancangan ini memungkinkan peneliti mengukur pengaruh perlakuan (interval) pada kelompok eksperimen dengan cara membandingkan kelompok tersebut dengan kelompok kontrol. Rancangan ini tidak memungkinkan peneliti untuk menentukan sejauh mana atau seberapa besar perubahan itu terjadi, sebab pretest tidak dilakukan untuk menentukan data awal. Bentuk rancangan ini, sebagai berikut:

	Perlakuan	Posttest
R (kelompok eksperimen)	X	O ₂
R (kelompok kontrol)		O ₂

(Notoatmojo, 2012)

Gambar 7. Bentuk Rancangan *Posttest Only Control Group Design*

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Bakteriologi Jurusan Analisis Kesehatan Poltekkes Denpasar.

2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan selama bulan Februari 2018 sampai Juni 2018

C. Populasi dan Sampel Penelitian

1. Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan adalah isolat standar *Candida albicans* ATCC 10231 yang didapat dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Udayana.

2. Jumlah dan Besar Sampel

Besar sampel dalam penelitian ini yaitu dengan menggunakan suspensi terstandar 1 McFarland. Pada penelitian kali ini menggunakan rancangan acak lengkap, dimana jumlah perlakuan dilakukan pengulangan berdasarkan rumus (Hanafiah, 2016) :

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

Keterangan :

r = jumlah ulangan

t = jumlah perlakuan

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

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

$$4r-4 \geq 15$$

$$4r \geq 19$$

$$r \geq 4,75$$

$$r \geq 5$$

Berdasarkan perhitungan tersebut, maka pengulangan yang dilakukan dalam penelitian ini adalah sebanyak 5 kali

3. Unit Analisis

Unit analisis dalam penelitian kali ini adalah jumlah germtube yang terbentuk pada variasi konsentrasi karbondioksida dengan empat jenis perlakuan konsentrasi yaitu 5, 10, 15, dan 20 %. Selain itu juga diuji perlakuan pada kontrol dimana yang digunakan adalah metode standar di laboratorium untuk uji induksi germ tube tanpa penambahan kadar CO₂. Terlihat bahwa terdapat 5 perlakuan termasuk kontrol dan juga dilakukan sebanyak 5 kali ulangan sehingga diperoleh jumlah data pemeriksaan sebesar 25 data.

A. Alat, Bahan, dan Prosedur Kerja

a. Alat

Untuk memperoleh hasil pengamatan pembentukan germ tube dibutuhkan alat-alat antara lain, ose bulat 1 buah, batang pengaduk 1 buah, Erlenmeyer (Iwaki-Pyrex®) 250 mL dan 800 mL masing-masing sebanyak 1 buah, gelas ukur 250 mL sebanyak 1 buah, petridish steril 4 buah, lampu spiritus sebanyak 1 buah, mikropipet (merk acura 825) ukuran 20 µL 1 buah, mikropipet (merk acura 825) ukuran 100-1000 µL 1 buah, kamar hitung newbauer, neraca analitik (merk Radwag AAS 220.R2) sebanyak 1 buah, Hotplate magnetic stirrer (merk Jisoco), Autoclaf (merk Tomy SX-500), densitometer macfarland (merk Biosan DEN-1b), mikroskop binokuler (merk Olympus), Bio Savety Cabinet (BSC 1800 II-B2x), Inkubator (Esco) sebanyak 1 buah, inkubator CO₂ (merk ESCO seri 2015-10-4537) sebanyak 1 buah.

b. Bahan

Adapun bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah pooled serum, Sabaroud Dextrose Agar (SDA) merk Liofilchem, eppendorf steril,

mikrotip steril, NaCl 0,9 % produksi Laboratorium Bio Analitika Surabaya, aquades, dan aluminium foil.

c. Prosedur Kerja

1) Tahap Persiapan

Tahap ini dilakukan dengan kegiatan mempersiapkan alat, bahan, pembuatan media untuk peremajaan *Candida albicans*, dan preparasi untuk mendapatkan serum.

a) Prosedur pembuatan media SDA

Prosedur kerja pembuatan media SDA dilakukan berdasarkan informasi yang diperoleh dari kemasan medium yang dikeluarkan oleh manufaktur dengan modifikasi di laboratorium.

(1) Disiapkan semua alat dan bahan yang akan digunakan.

(2) Ditimbang serbuk media SDA sesuai volume yang dibuat.

$$\text{Rumus : } \frac{V1}{V2} = \frac{W1}{W2}$$

Ket :

V1 = volume yang tertera pada etiket kemasan/media (ml)

V2 = Volume media yang akan dibuat

W1 = Berat media yang tertera pada kemasan (gr)

W2 = Berat media yang akan ditimbang (gr)

(3) Dipindahkan serbuk media SDA ke beaker glass. Ditambahkan aquadest sebanyak X mL, kemudian dipindahkan ke Erlenmeyer

(4) Dihomogenkan media dengan bantuan pemanasan dan pengaduk.

- (5) Dilakukan pengecekan pH media sesuai petunjuk pH ($\text{pH} = 5,6 \pm 0,2$) pada suhu 25°C . Ditambah NaOH 0,01 N jika pH media asam dan ditambahkan HCl 0,01 N jika pH media basa.
- (6) Disterilisasi menggunakan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit.
- (7) Dihomogenkan media yang telah berisi antibiotik, kemudian dituang kedalam petridish steril.

b) Prosedur pembuatan pooled serum

Prosedur kerja pembuatan media pooled serum dilakukan :

- (1) Disiapkan semua alat dan bahan yang akan digunakan.
- (2) Darah manusia dalam tabung tanpa antikoagulan disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit.
- (3) Bagian supernatan yang berupa serum diambil dengan menggunakan mikropipet secara hati hati.
- (4) Serum yang didapat digabungkan dengan serum yang lain sehingga membentuk pooled serum.
- (5) Sebanyak 0,5 ml pooled serum kemudian di pipet dan dimasukkan ke dalam tabung eppendorf steril.

2) Tahap Pelaksanaan

a) Persiapan inokulasi *Candida albicans*

Isolat *Candida albicans* diremajakan dengan menggunakan media *Sabuoraud Dextrose Agar* (SDA) yang diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam.

b) Pembuatan suspensi *Candida albicans* 0,5 McFarland

- (1) Disiapkan isolat *Candida albicans* yang sudah diremajakan dan NaCl 0,9 % steril.

(2) Disiapkan alat densitometer McFarland.

(3) Dibuat suspensi awal isolat *Candida albicans* 1 McFarland dengan menghomogenkan beberapa koloni jamur pada NaCl 0,9 % dan diukur pada densitometer.

c) Uji induksi germ tube

Prosedur kerja uji germ tube yang dilakukan berdasarkan referensi dari penelitian lain yaitu sebagai berikut (Byadarahally Raju and Rajappa, 2011):

(1) Suspensi 1 McFarland *Candida albicans* dipipet sebanyak 20 μ l ke dalam tabung eppendorf yang sudah berisi 0,5 ml pooled serum.

(2) Tabung eppendorf kemudian dinkubasi pada konsentrasi karbondioksida yang berbeda antara 5, 10, 15, 20 % selama 2,5 jam pada inkubator CO₂ dengan suhu inkubasi 37⁰C

(3) Pada kontrol, tabung eppendorf ditutup rapat dan diinkubasi selama 2,5 jam pada suhu 37⁰C di inkubator.

(4) Setelah 2,5 jam, serum dikeluarkan dari inkubator, kemudian disiapkan untuk dilakukan perhitungan.

d) Pembentukan germ tube

Prosedur kerja yang digunakan untuk menghitung jumlah germ tube dilakukan berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Nadeem dengan modifikasi (Nadeem *et al.*, 2013). Pengamatan dan perhitungan dilakukan dengan menggunakan haemositometer yaitu kamar hitung improved newbauer kemudian diamati dibawah mikroskop binokuler dengan pembesaran 400 x. Pengamatan dilakukan pada kotak eritrosit. Kotak bidang eritrosit memiliki luas 1 mm², dan kedalaman sebesar 0,1 mm, jadi volume seluruh bilik hitung leukosit adalah 0,1 mm³.

Jumlah germ tube kemudian di kali 10 sehingga diperoleh jumlah germ tube per mm^3 .

E. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis data

Jenis data yang dikumpulkan adalah data primer meliputi data tentang adanya pengaruh karbondioksida terhadap jumlah germ tube *Candida albicans* yang terbentuk. Data dikumpulkan dengan menggunakan metode observasi eksperimental (Notoatmodjo, 2012).

2. Teknik pengumpulan data

Data diperoleh dengan melakukan uji induksi germ tube dengan perlakuan konsentrasi karbondioksida yang berbeda. Pengukuran dilakukan dengan menghitung jumlah germ tube yang terbentuk pada kamar hitung improved newbauer.

F. Tahap Pengolahan dan Analisis Data

a. Tahap Pengolahan Data

Data dari hasil pengujian ini berupa jumlah germ tube yang terbentuk per mm^3 . Data disajikan dalam bentuk tabel dan narasi yang berdasarkan kajian pustaka yang relevan.

b. Tahap Analisis Data

Analisis data pada penelitian ini adalah analisa kuantitatif, yang dilakukan dengan uji statistik dengan menggunakan bantuan perangkat lunak komputer (software). Uji Shapiro wilk digunakan untuk menguji apakah data berdistribusi normal atau tidak. Data yang didapatkan dianalisis statistika dengan uji ANOVA

bila data berdistribusi normal, dengan uji non parametrik Kruskal Wallis bila data distribusi tidak normal (Eriyanto, 2011).

Untuk mengetahui pengaruh jumlah germ tube antara masing-masing konsentrasi karbondioksida, maka uji statistika yang digunakan adalah LSD (*Least Significant Deference*).