

## **BAB III**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **3.1 Waktu dan Tempat**

Penelitian tentang pembuatan media alternatif dari tepung umbi gadung sebagai pengganti media PDA (*Potato Dextrose Agar*) dilaksanakan pada tanggal 03 November - 03 Desember 2019 di Balai Besar Laboratorium Kesehatan (BBLK) Palembang.

#### **3.2 Alat dan Bahan**

##### **3.2.1 Alat**

Adapun alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu timbangan analitik, spatula, erlenmeyer, *beaker glass*, gelas ukur, *petri dish*, cawan dan mortar, *hot plate*, *magnetic stirrer*, *autoklaf*, oven, inkubator, pipet mikro, tabung reaksi, rak tabung, bunsen, *laminar air flow*, *densichek*, kain kasa, kertas saring, aluminium foil, sarung tangan, korek api, ose, ayakan 100 mesh, *colony counter* dan kapas.

##### **3.2.2 Bahan**

Adapun bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah spiritus, alkohol 70%, umbi gadung kuning, abu sekam, aquadest, NaCl 0,85 %, *ciprofloxacin*, *dextrose*, agar, media PDA, isolat *Candida albicans*.

### 3.3 Metode Penelitian

#### 3.3.1 Desain penelitian

Penelitian ini adalah jenis penelitian eksperimen dan rancangan penelitian yang digunakan yaitu rancangan acak lengkap (RAL), dengan menggunakan 6 perlakuan sebagai berikut:

- a. P0 = media PDA sebagai kontrol positif
- b. P1= media alternatif menggunakan tepung umbi gadung dengan konsentrasi 5%
- c. P2= media alternatif menggunakan tepung umbi gadung dengan konsentrasi 10%
- d. P3= media alternatif menggunakan tepung umbi gadung dengan konsentrasi 15%
- e. P4= media alternatif menggunakan tepung umbi gadung dengan konsentrasi 20%
- f. P5= media alternatif dengan menggunakan tepung umbi gadung dengan konsentrasi 25%

Pengulangan dalam percobaan tersebut diperoleh dengan menggunakan rumus dibawah ini:

$$\begin{aligned} & \boxed{(t-1)(r-1) \geq 15} \\ & (6-1)(r-1) \geq 15 \\ & 5r-5 \geq 15 \\ & 5r \geq 15+5 \\ & 5r \geq 20 \\ & r \geq 4 \end{aligned}$$

keterangan:

t : Perlakuan

r : Ulangan

Sehingga dalam penelitian tersebut diperoleh 6 perlakuan dan 4 pengulangan. Menurut Harsojuwono dkk (2011), penerapan perlakuan pada setiap percobaan dalam RAL dilakukan secara acak lengkap terhadap semua unit percobaan. Begitu pula setiap pengulangan mempunyai kesempatan yang sama besar untuk menempati setiap unit percobaan. Pengacakan perlakuan dan pengulangan dilakukan dengan cara pengundian terhadap 24 unit percobaan. Kombinasi perlakuan dan ulangan serta perlakuan hasil pengacakan percobaan dapat dilihat di bawah ini:

**Tabel 3.1 Kombinasi perlakuan dan ulangan yang digunakan dalam penelitian**

Perlakuan	Pengulangan			
	1	2	3	4
P <sub>0</sub>	P <sub>01</sub>	P <sub>02</sub>	P <sub>03</sub>	P <sub>04</sub>
P <sub>1</sub>	P <sub>11</sub>	P <sub>12</sub>	P <sub>13</sub>	P <sub>14</sub>
P <sub>2</sub>	P <sub>21</sub>	P <sub>22</sub>	P <sub>23</sub>	P <sub>24</sub>
P <sub>3</sub>	P <sub>31</sub>	P <sub>32</sub>	P <sub>33</sub>	P <sub>34</sub>
P <sub>4</sub>	P <sub>41</sub>	P <sub>42</sub>	P <sub>43</sub>	P <sub>44</sub>
P <sub>5</sub>	P <sub>51</sub>	P <sub>52</sub>	P <sub>53</sub>	P <sub>54</sub>

**Tabel 3.2 Kombinasi perlakuan hasil pengacakan**

No	Baris ke-			
	1	2	3	4
1	P <sub>52</sub>	P <sub>43</sub>	P <sub>22</sub>	P <sub>41</sub>
2	P <sub>03</sub>	P <sub>21</sub>	P <sub>33</sub>	P <sub>14</sub>
3	P <sub>12</sub>	P <sub>32</sub>	P <sub>54</sub>	P <sub>42</sub>
4	P <sub>34</sub>	P <sub>51</sub>	P <sub>11</sub>	P <sub>04</sub>
5	P <sub>24</sub>	P <sub>13</sub>	P <sub>01</sub>	P <sub>53</sub>
6	P <sub>02</sub>	P <sub>31</sub>	P <sub>44</sub>	P <sub>23</sub>

Keterangan:

P<sub>0n</sub> : perlakuan kontrol ulangan ke-n

P<sub>1n</sub> : perlakuan 5% ulangan ke-n

P<sub>2n</sub> : perlakuan 10% ulangan ke-n

P<sub>3n</sub> : perlakuan 15% ulangan ke-n

P<sub>4n</sub> : perlakuan 20% ulangan ke-n

P<sub>5n</sub> : perlakuan 25% ulangan ke-n

### 3.3.2 Prosedur Penelitian

#### A. Tahap Persiapan dan Pembuatan Media

##### 1. Sterilisasi Alat

Sebelum melakukan percobaan terlebih dahulu dilakukan sterilisasi terhadap alat yang terdiri dari Erlenmeyer, *beaker glass*, *ose*, *petri dish* dan tabung reaksi. Proses sterilisasi alat-alat tersebut dilakukan dengan menggunakan autoklaf selama 15 menit pada temperatur 121° dengan tekanan 1 atm (Dwidjoseputro, 1998).

##### 2. Pembuatan Tepung umbi gadung

Cara pembuatan tepung umbi gadung ini diambil dari penelitian Wanita (2018), umbi gadung terlebih dahulu dibersihkan dari tanah. Kemudian umbi gadung dikupas setebal mungkin setelah itu diiris tipis. Selanjutnya umbi gadung tersebut direndam dengan menggunakan abu sekam selama 24 jam. Setelah 24 jam irisan umbi gadung dicuci hingga bersih. Setelah itu irisan umbi gadung direndam dalam air bersih selama 72 jam. Air rendaman tersebut diganti setiap 12 jam. Selanjutnya irisan umbi tersebut dikeringkan. Setelah kering irisan umbi dihaluskan dan kemudian diayak menggunakan ayakan 100 mesh.

##### 3. Uji Proksimat metode *by different* (Santi dkk, 2012)

Uji proksimat dilakukan di laboratorium teknologi hasil pertanian (THP) Universitas Sriwijaya dengan menggunakan metode *by different*.

4. Uji Kadar Sianida Tepung Umbi Gadung (Sulistiyarti dkk, 2014)

Uji kadar sianida dilakukan di Balai Pemeriksaan Obat dan Makanan (BPOM) Palembang. Dengan menggunakan metode semi kuantitatif yaitu menggunakan tes kit sianida.

5. Pembuatan media alternatif tepung umbi gadung

Pembuatan media alternatif dari tepung umbi gadung diambil dan dimodifikasi dari penelitian Jiwintarum dkk (2017), yaitu dengan mengganti tepung biji keluwih dengan tepung umbi gadung. Dimana media alternatif umbi gadung dibuat sebanyak 100 ml untuk 1 perlakuan dan 4 kali ulangan. Tepung umbi gadung ditimbang sebanyak 10 gr, dextrosa sebanyak 2 gr, agar sebanyak 2 gr dan *ciprofloxacin* sebanyak 0,2 gr. Direbus tepung umbi gadung dengan 200 ml aquades diatas *hot plate* pada suhu 90° C sampai 100°C selama 30 menit. Hasil rebusan disaring menggunakan kain kasa dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer sebanyak 100 ml. Agar dan *dextrose* dimasukkan sedikit demi sedikit kedalam erlenmeyer hingga mendidih sambil terus diaduk hingga homogen. Semua langkah tersebut diulangi sampai selesai dengan komposisi tepung umbi gadung yang berbeda yaitu 20 gr, 30 gr, 40 gr dan 50 gr.

6. Pembuatan media PDA sebagai kontrol positif

Media PDA dibuat sebanyak 100 ml yaitu dengan cara ditimbang media PDA (39 gr/l) sebanyak 3,9 gr, dilarutkan hasil timbangan media PDA instan tersebut kedalam 100 ml aquades steril. Kemudian media dipanaskan dan di aduk hingga homogen.

## 7. Sterilisasi media

Media disterilisasi menggunakan autoklaf dengan suhu 121<sup>0</sup>C, tekanan 1 atm dan waktu ± 15 menit. Setelah proses sterilisasi ditunggu sampai media tidak terlalu panas kemudian ditambahkan 0,2 gr *Ciprofloxacin* (Dwidjoseputro, 1998).

### **B. Tahap Uji Pertumbuhan *Candida albicans* Pada Media PDA dan Media alternatif tepung umbi gadung**

#### 1. Pembuatan suspensi *Candida albicans* 1 Mc Farland kepadatan $1 \times 10^7$ (Jiwintarum dkk, 2017)

Disiapkan 1 buah tabung reaksi steril. Kemudian ditambahkan 5 ml NaCl dan 1 ose biakan *Candida albicans* kedalam tabung reaksi steril tersebut. Setelah itu cek kekeruhan dengan menggunakan *Densithek*. Apabila standar Mc Farland lebih dari 1, tambahkan dengan NaCl dan apabila kurang dari 1, tambahkan dengan biakan *Candida albicans*.

Selanjutnya dipipet suspensi tersebut dan dimasukkan kedalam tabung reaksi yang berisi 9 ml NaCl 0,85% steril (pengenceran 10 x), sehingga diperoleh kepadatan jamur  $1 \times 10^6$ . Dilakukan pengenceran berikutnya dengan dipipet suspensi jamur  $1 \times 10^6$  tersebut dan dimasukkan kedalam tabung reaksi yang berisi 9 ml NaCl 0,85% steril sehingga didapat kepadatan jamur  $1 \times 10^5$ . Pengenceran dilakukan sampai didapatkan kepadatan  $1 \times 10^4$ .

#### 2. Penanaman *Candida albicans*

Penanaman *Candida albicans* pada media PDA dan media alternatif tepung umbi gadung dilakukan dengan metode tuang (*Pour Plate Method*) yang diambil dan dimodifikasi dari penelitian Jiwintarum dkk (2017), yaitu dimasukkan masing-masing 0,1 ml biakan kedalam 24 cawan petri steril, kemudian 4 cawan

ditambahkan media PDA cair (kontrol) dan 20 cawan ditambahkan dengan media alternatif tepung umbi gadung cair (perlakuan) dengan suhu  $\pm 45^{\circ}\text{C}$  sebanyak 15-20 ml kemudian dihomogenkan dan dibiarkan hingga memadat. Inkubasi selama 2 hari (48 jam) pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  dalam inkubator.

### 3. Perhitungan Koloni *Candida albicans*

Setelah dilakukan inkubasi, cawan yang mengandung 10-150 koloni *Candida albicans* dihitung dengan menggunakan *colony counter* (Jiwintarum dkk, 2017).

## 3.4 Variabel Penelitian

### 3.4.1 Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini yaitu media alternatif dari tepung umbi gadung dengan konsentrasi 5%, 10%, 15%, 20% dan 25%.

### 3.4.2 Variabel terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini yaitu pertumbuhan *Candida albicans* yang dipengaruhi oleh media tumbuhnya yaitu media alternatif dari tepung umbi gadung.

## 3.5 Teknik Analisis Data

Pengaruh perlakuan terhadap masing-masing variabel ditentukan dengan menggunakan uji *One Way Anova* pada tingkat kepercayaan 95% atau  $\alpha = 0,05$  dengan bantuan komputer program SPSS kemudian dilanjutkan dengan uji beda nyata jujur (BNJ).

### 3.5.1 Analisis Sidik Ragam

**Tabel 3.3** Tabulasi data hasil pengamatan

Perlakuan	Pengulangan				Jumlah (TP)	Rerata ( $\bar{y}_A$ )
	1	2	3	4		
P <sub>0</sub>	P <sub>01</sub>	P <sub>02</sub>	P <sub>03</sub>	P <sub>04</sub>	PN <sub>0</sub>	
P <sub>1</sub>	P <sub>11</sub>	P <sub>12</sub>	P <sub>13</sub>	P <sub>14</sub>	PN <sub>1</sub>	
P <sub>2</sub>	P <sub>21</sub>	P <sub>22</sub>	P <sub>23</sub>	P <sub>24</sub>	PN <sub>2</sub>	
P <sub>3</sub>	P <sub>31</sub>	P <sub>32</sub>	P <sub>33</sub>	P <sub>34</sub>	PN <sub>3</sub>	
P <sub>4</sub>	P <sub>41</sub>	P <sub>42</sub>	P <sub>43</sub>	P <sub>44</sub>	PN <sub>4</sub>	
P <sub>5</sub>	P <sub>51</sub>	P <sub>52</sub>	P <sub>53</sub>	P <sub>54</sub>	PN <sub>5</sub>	
Jumlah	TA <sub>1</sub>	TA <sub>2</sub>	TA <sub>3</sub>	TA <sub>4</sub>	T <sub>ij</sub>	

### 3.5.2 Jumlah Kuadrat (JK)

1. FK =  $T_{ij}^2 / rxt$
2. JK<sub>Total</sub> = T (Y<sub>ij</sub><sup>2</sup>) - FK
3. JK<sub>Perlakuan</sub> = {(TA)<sup>2</sup>/r} - FK
4. JK<sub>Galat</sub> = JKT - JKP
5. KT<sub>Perlakuan</sub> = JKP/db perlakuan
6. KT<sub>Galat</sub> = JKG/db Galat

**Tabel 3.4** Analisis sidik ragam RAL

Sumber keragaman	Db	JK	KT	F <sub>hitung</sub>	F <sub>tabel</sub>	
					( $\alpha=1\%$ )	( $\alpha=5\%$ )
Perlakuan	t-1	JKP	KTP	KTP/KTG	F(v <sub>1</sub> , v <sub>2</sub> )	
Galat	t(r-1)	JKG	KTG			
Total	(t.r)-1	JKT				

Keterangan: \* = Nyata (F<sub>hitung</sub> > F 5%)

\*\* = Sangat Nyata (F<sub>hitung</sub> > 1%)

### 7. Koefisien Keragaman (KK)

$$KK = \frac{\sqrt{KT \text{ galat}}}{\bar{y}} \times 100\%$$

$$\bar{y} = \frac{T_{ij}}{rt} = \frac{\sum y_{ij}}{rt}$$

Keterangan:

JK : Jumlah Kuadrat  
KT : Kuadrat Tengah  
FK : Faktor Koreksi  
db : derajat bebas  
t : Perlakuan  
r : Ulangan  
T : jumlah perlakuan

Menurut Harsojuwono dkk (2011), setelah dilakukan uji F diatas maka dapat disimpulkan ada atau tidaknya pengaruh dari perlakuan yang telah dicobakan. Namun belum dapat menentukan atau menunjukkan adanya perbedaan antara perlakuan satu dengan yang lainnya. Oleh karena itu perlu dilakukan uji lanjut. Untuk menentukan uji lanjut yang digunakan terlebih dahulu ditentukan nilai koefisien keragaman (KK). Menurut Hanafiah (1997), nilai dari koefisien keragaman, menunjukkan derajat kejitian suatu percobaan. Dimana semakin kecil nilai KK maka derajat kejitian dari penelitian akan semakin tinggi. Berdasarkan perhitungan yang telah dilakukan diketahui bahwa nilai KK pada percobaan ini sebesar 2,78 %. Dari nilai KK tersebut maka diketahui bahwa uji lanjut yang digunakan adalah uji BNJ (Beda nyata jujur).