

## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain penelitian eksperimental dengan metode *tube dilution test* untuk mengetahui efektivitas antijamur ekstrak kencur dengan berbagai konsentrasi terhadap *Candida albicans* secara *in vitro*.

#### 4.2 Sampel Penelitian

Sampel penelitian adalah isolat jamur *Candida albicans*, diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.

Jumlah estimasi pengulangan sampel yang digunakan dalam penelitian dihitung dengan menggunakan rumus (Federer, 1977) :

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

Keterangan :

n = jumlah pengulangan yang diperlukan

t = jumlah perlakuan

Penelitian ini menggunakan 7 konsentrasi ekstrak rimpang kencur (*Kaempferia galanga L.*) dan satu kontrol negatif ( $p = 7+1 = 8$ ), maka didapatkan jumlah pengulangan :

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

$$(n-1) (8-1) = 15$$

$$(n-1) 7 = 15$$

$$n-1 = 2,1$$

$$n = 2,1+1$$

$$n = 3,1$$

Jadi penelitian ini akan memberikan 8 macam perlakuan dan 3 kali pengulangan.

#### **4.3 Variabel Penelitian**

Terdapat 2 variabel dalam penelitian ini yaitu variabel bebas dan variabel terikat.

##### **4.3.1 Variabel Bebas**

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak rimpang kencur (*Kaempferia galanga*) dengan konsentrasi 0,5%; 1%; 1,5%; 2%; 2,5%; 3%; dan 3,5%.

##### **4.3.2 Variabel Terikat**

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah pertumbuhan jumlah koloni jamur *C. albicans*.

#### **4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian**

Penelitian akan dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang dari bulan Agustus 2017 sampai Oktober 2017.

#### **4.5 Alat dan Bahan Penelitian**

##### **4.5.1 Alat dan Bahan Ekstraksi Kencur**

Alat: toples bertutup, corong gelas, timbangan analitik, gelas ukur, botol, waterbath, erlenmeyer, rotary evaporator, beaker glass, alkoholmeter, shaker digital. Bahan: 3L etanol 96%, 400kg bubuk rimpang kencur, dan penyaring.

#### 4.5.2 Alat dan Bahan untuk Identifikasi Jamur dengan Pewarnaan Gram

Alat: gelas objek, *cover glass*, lampu spiritus, korek api, ose, mikroskop.

Bahan: isolat jamur *C. albicans*, *anaerobic jar*, bahan pewarnaan Gram (kristal, violet, lugol, alkohol 96%, safranin), kertas penghisap atau tissue.

#### 4.5.3 Alat dan Bahan untuk Identifikasi Jamur dengan Uji *Germ Tube*

Alat: *cover glass*, obyek gelas, tabung reaksi, pipet Pasteur, mikroskop, lampu spiritus, korek api, ose, inkubator. Bahan: reagen serum *Bovine* dan isolat jamur *C. albicans*.

#### 4.5.4 Alat dan Bahan untuk Uji Daya Antijamur Ekstrak Rimpang kencur Kencur (*Kaempferia galanga*) Melalui Metode Dilusi Tabung dan Dilusi Agar

Alat: *plate steril*, mikropipet (ukuran 1ml dan 10ml), karet penghisap, inkubator, lampu spiritus, vortex, korek api, ose, rak kayu, tabung reaksi, dan kapas steril. Bahan : ekstrak rimpang kencur kencur (*Kaempferia galanga*), aquades steril, dan isolat *C. albicans*, saboraaud agar.

#### 4.5.5 Alat dan Bahan Uji *Streaking Plate*

Alat: ose, lampu spiritus, *colony counter*, SDA.

### 4.6 Definisi Operasional

1. Rimpang kencur yang digunakan adalah rimpang kencur berupa bubuk yang didapatkan dari Balai Materia Medica UPT Dinas Kesehatan Provinsi Jawa Timur dan diekstraksi.
2. Sediaan ekstrak rimpang kencur (*Kaempferia galanga*) merupakan hasil ekstraksi etanol 96% terhadap rimpang kencur (*Kaempferia galanga*).
3. Isolat *C. albicans* adalah *C. albicans* yang ditanam pada agar miring SDA (tempat untuk memperbanyak biakan) dan selanjutnya isolat tersebut ditanam pada SDA *plate*.

4. Kadar Hambat Minimal (KHM) adalah konsentrasi minimal bahan coba yang mampu menghambat pertumbuhan jamur setelah diinkubasi selama 24 jam dan tidak tumbuh koloni jamur yang diketahui dengan cara mengamati kekeruhan pada media perbenihan dengan menggunakan metode dilusi.
5. Standar kepadatan (kekeruhan) Mc Farland 0,5 adalah suatu standar yang digunakan sebagai referensi untuk menentukan tingkat kekeruhan suspensi jamur sehingga jumlah jamur yang terdapat dalam suspensi tersebut  $\pm 1,5 \times 10^6$  CFU/ml.
6. Kadar Bunuh Minimal (KBM) adalah konsentrasi minimal ekstrak rimpang kencur (*Kaempferia galanga L.*) yang dapat membunuh jamur sebesar 99% atau 100% pada media agar SDA plate.
7. Penilaian KBM dilakukan dengan koloni *counter*.

#### **4.7 Prosedur Penelitian**

##### **4.7.1 Pembuatan Ekstrak Rimpang Kencur (*Kaempferia galanga L.*)**

Proses Ekstraksi (UPT Materia Medica Batu)

- a. Timbang serbuk rimpang kencur sebanyak 400 gram.
- b. Lakukan pembasahan dengan pelarut etanol 96% sebanyak 400 ml.
- c. Masukkan serbuk yang telah dibasahi dengan pelarut ke dalam toples, diratakan dan ditambahkan pelarut etanol 96% sampai terendam (pelarut yang digunakan minimal 2 kali berat atau lebih). Pelarut yang ditambahkan sebanyak 1,5 L. Tutup toples dengan rapat selama 24 jam. Dan dishaker di atas shaker digital dengan kecepatan 50 rpm.
- d. Saring ekstrak cair dengan penyaring kain. Tampung ekstrak dalam Erlenmeyer.

- e. Ampas dimasukkan dimasukkan lagi dalam toples dan tambahkan pelarut sampai terendam (minimal pelarut 5 cm diatas permukaan), dalam hal ini digunakan 1,5 L.
- f. Biarkan semalam atau 24 jam diatas shaker kecepatan 50 rpm.
- g. Hasil ekstrak cair pertama dan kedua dijadikan satu dan diuapkan dengan menggunakan rotary evaporator. Diperlukan waktu 2 jam 30 menit untuk evaporasi.
- h. Ekstrak yang dihasilkan dievaporasi/diuapkan diatas waterbath selama 2 jam

#### **4.7.2 Uji Identifikasi Jamur *Candida albicans* (Jawetz et al, 2013)**

Proses identifikasi *C. albicans* terdiri dari 2 tahap yaitu pewarnaan gram dan *germ tube*. Tahap pewarnaan gram dan *germ tube* akan memberi hasil identifikasi bahwa isolat bakteri uji adalah benar *C. albicans*.

##### **4.7.2.1 Uji Pewarnaan Gram**

Pewarnaan gram dilakukan untuk memastikan bahwa organisme yang diteliti merupakan *C. albicans*. Pewarnaan Gram dapat dilakukan dengan cara :

1. Satu ose akuades steril diteteskan pada gelas objek, lalu diambil sedikit jamur untuk disuspensi dengan aquades yang telah diletakkan di atas gelas objek, lalu dibiarkan kering di udara.
2. Suspensi jamur yang sudah kering difiksasi dengan cara melewatkan beberapa kali di atas api. Sediaan siap untuk diwarnai.
3. Kristal violet diteteskan pada sediaan dan ditunggu selama satu menit. Sisa kristal violet dibuang dan dibilas dengan air.
4. Lugol diteteskan pada sediaan dan ditunggu selama satu menit. Sisa lugol dibuang dan dibilas dengan air.

5. Alkohol 96% diteteskan pada sediaan dan ditunggu selama 10 detik atau sampai warna cat luntur. Sisa alkohol dibuang dan dibilas dengan air.
6. Safranin diteteskan pada sediaan dan ditunggu selama 30 detik. Sisa safranin dibuang dan dibilas dengan air.
7. Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap.
8. Sediaan dilihat di bawah mikroskop dengan perbesaran total 1000x.
9. Hasil positif : *C. albicans* tercat ungu (Gram positif), bentuk budding.

#### 4.7.2.2 Uji *Germ Tube*

Uji *Germ tube* merupakan tes identifikasi untuk membedakan *C. albicans* dengan spesies lainnya, ditandai dengan adanya *germ tube* yang tidak ditemukan pada spesies *Candida* lainnya. Uji *Germ tube* dapat dilakukan dengan cara :

1. Masukkan 3 tetes serum ke dalam tabung reaksi
2. Ambil koloni jamur menggunakan pipet Pasteur, kemudian masukkan ke dalam tabung reaksi
3. Inkubasi pada suhu 37° selama 2-4 jam
4. Teteskan koloni dalam serum pada obyek gelas dan tutup dengan *cover glass*
5. Amati dibawah mikroskop dengan perbesaran 400x.
6. Dicari bentukan *pseudohifa* memanjang khas *C. albicans*

### 4.7.3 Uji Pengaruh Ekstrak Rimpang kencur Rimpang Kencur (*Kaempferia galanga L.*) sebagai Antijamur *Candida albicans* dengan Metode Dilusi Tabung

#### 4.7.3.1 Uji Dilusi Tabung untuk Menentukan KHM

Prosedur uji dilusi tabung antara lain :

1. Disiapkan 8 buah tabung dengan rincian penggunaan, 1 tabung reaksi sebagai kontrol yaitu kontrol negatif dan 7 buah tabung diisi konsentrasi ekstrak rimpang kencur (*Kaempferia galanga L.*) yang berbeda pada setiap tabungnya.

Masing-masing tabung reaksi diberi label dengan ketentuan:

- Tabung 1 : Konsentrasi ekstrak rimpang kencur (*Kaempferia galanga L.*) 0,5%
- Tabung 2 : Konsentrasi ekstrak rimpang kencur (*Kaempferia galanga L.*) 1%
- Tabung 3 : Konsentrasi ekstrak rimpang kencur (*Kaempferia galanga L.*) 1,5%
- Tabung 4 : Konsentrasi ekstrak rimpang kencur (*Kaempferia galanga L.*) 2%
- Tabung 5 : Konsentrasi ekstrak rimpang kencur (*Kaempferia galanga L.*) 2,5%
- Tabung 6 : Konsentrasi ekstrak rimpang kencur (*Kaempferia galanga L.*) 3%
- Tabung 7 : Konsentrasi ekstrak rimpang kencur (*Kaempferia galanga L.*) 3,5%
- Tabung 8 : Kontrol Kuman (KK)

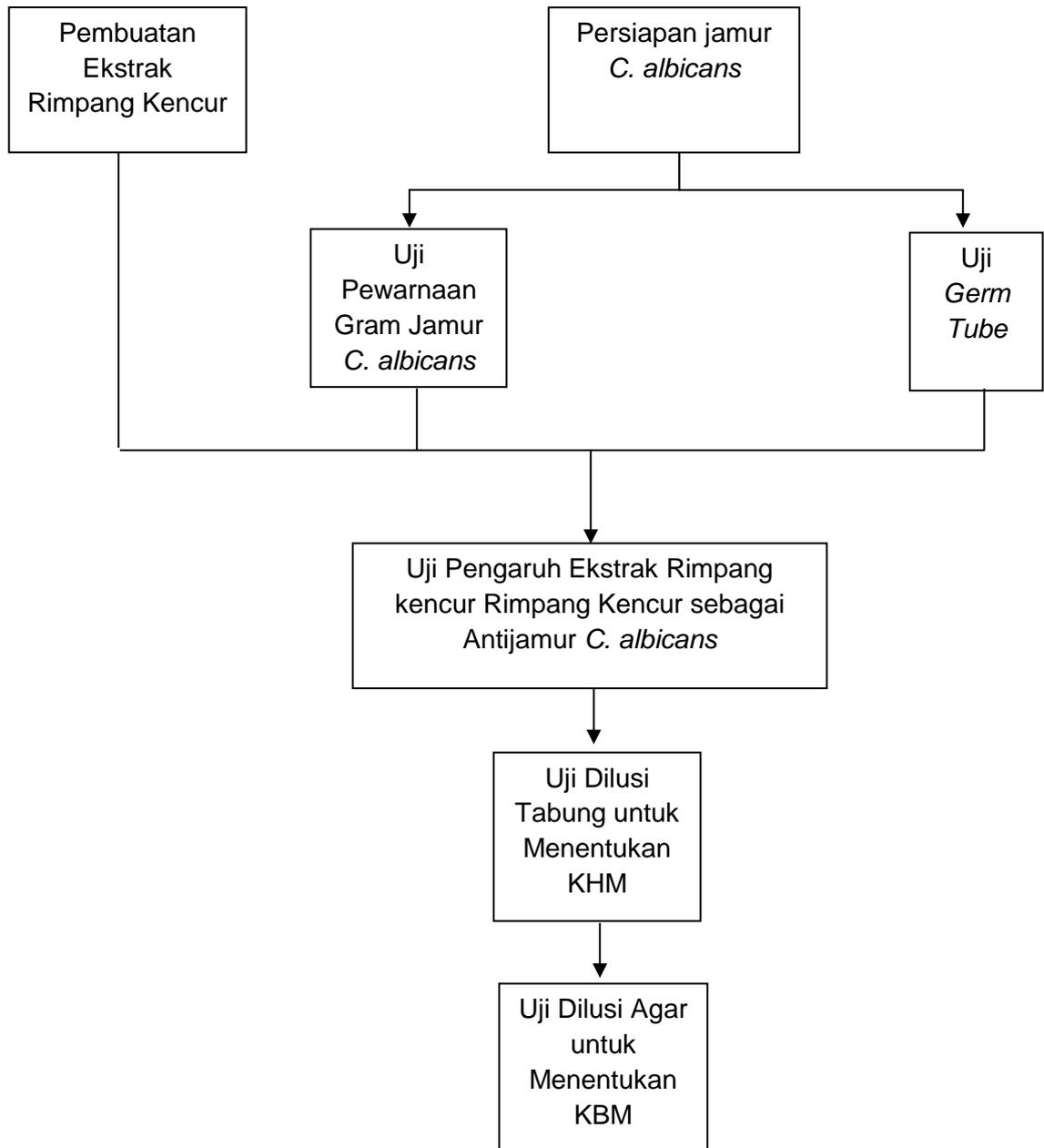
2. Masing-masing tabung reaksi diisi ekstrak rimpang kencur (*Kaempferia galanga L.*) dengan ketentuan :
  - Tabung 1 : 0,1 ml ekstrak rimpang kencur (*Kaempferia galanga L.*) + 0,9 ml aquades
  - Tabung 2 : 0,2 ml ekstrak rimpang kencur (*Kaempferia galanga L.*) + 0,8 ml aquades
  - Tabung 3 : 0,3 ml ekstrak rimpang kencur (*Kaempferia galanga L.*) + 0,7 ml aquades
  - Tabung 4 : 0,4 ml ekstrak rimpang kencur (*Kaempferia galanga L.*) + 0,6 ml aquades
  - Tabung 5 : 0,5 ml ekstrak rimpang kencur (*Kaempferia galanga L.*) + 0,5 ml aquades
  - Tabung 6 : 0,6 ml ekstrak rimpang kencur (*Kaempferia galanga L.*) + 0,4 ml aquades
  - Tabung 7 : 0,7 ml ekstrak rimpang kencur (*Kaempferia galanga L.*) + 0,3 ml aquades
  - Tabung 8 : 1 ml aquades
3. Ditambahkan 1 ml inokulum *C. albicans* (dari nutrient broth yang telah diinkubasi) pada tabung no 1-8. Sehingga semua tabung berisi larutan 2 ml
4. Semua tabung ditutup dengan kapas steril kemudian diinkubasikan ke dalam inkubator pada suhu 37°C selama 18-24 jam
5. Pada hari kedua, semua tabung diambil dari inkubator. Kemudian dilakukan pengamatan untuk membandingkan kekeruhan antar tabung reaksi, sehingga diperoleh nilai KHM (Dzen, 2003).

#### 4.7.4.2 Uji Dilusi Agar untuk Menentukan KBM

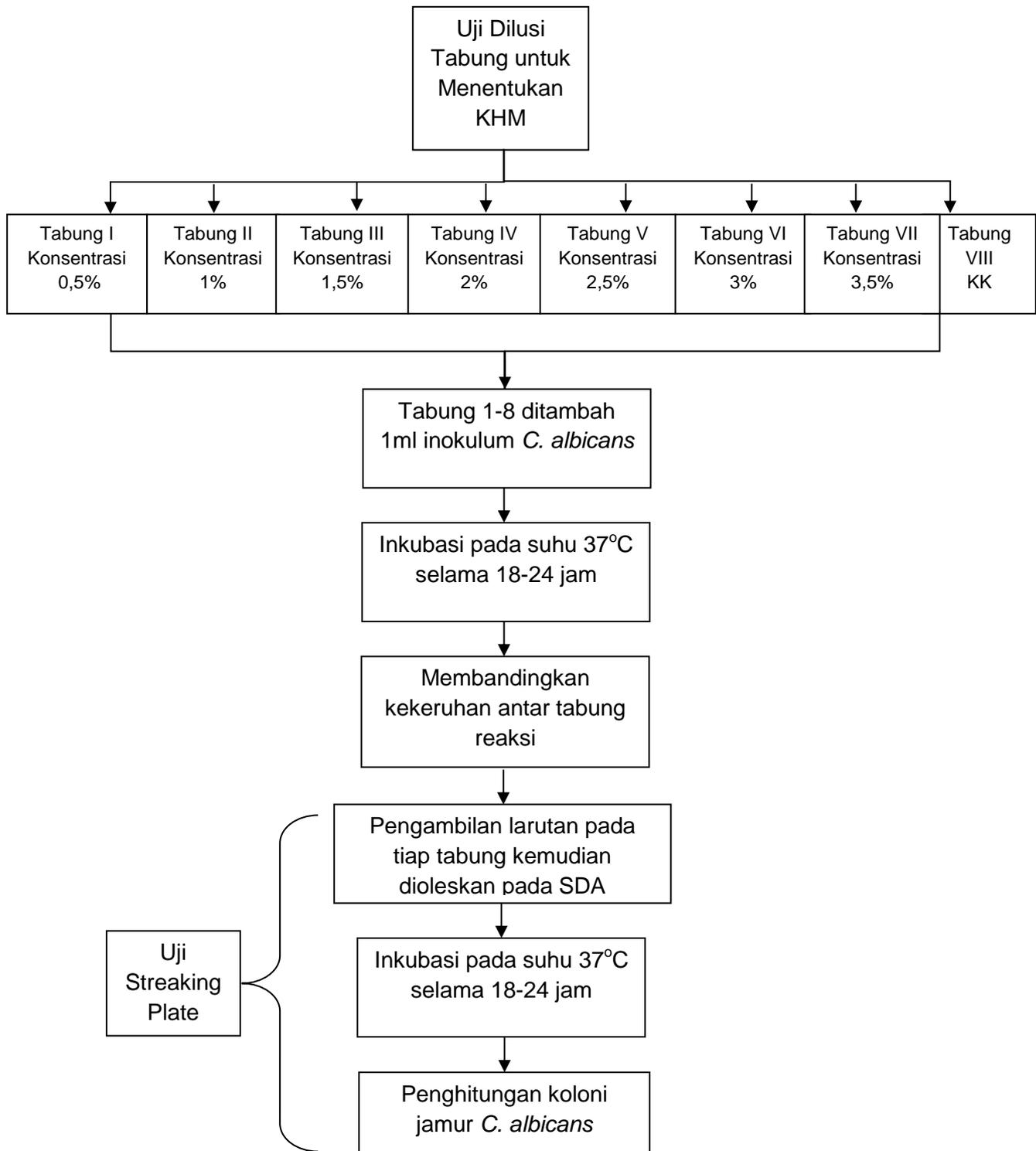
Prosedur yang dilakukan antara lain:

1. Dilakukan pengambilan larutan sebanyak 1 ose dari tiap tabung kemudian dioleskan pada masing-masing SDA plate yang sudah diberi label sesuai label tabung reaksinya.
2. Semua SDA plate diinkubasikan ke dalam inkubator pada suhu 37° C selama 18-24 jam.
3. Pada hari ketiga, semua SDA plate dikeluarkan dan dilakukan penghitungan jumlah koloni jamur *C. albicans* dengan menggunakan *coloni counter*, sehingga diperoleh nilai KBM.

#### 4.8 Skema Alur Penelitian



#### 4.8.1 Uji Ekstrak Rimpang Kencur untuk Menentukan KHM dan KBM



#### 4.9 Analisis Data

Data terdistribusi normal, analisis data yang digunakan yaitu uji statistik parametrik *one way ANOVA*. Uji statistik *one way ANOVA* dengan derajat kepercayaan 95% ( $\alpha = 0,05$ ) digunakan untuk mengetahui adanya pengaruh pemberian berbagai konsentrasi ekstrak rimpang kencur terhadap jumlah koloni jamur *C. albicans*. Uji korelasi Pearson digunakan untuk mengetahui apakah terdapat hubungan antara pemberian konsentrasi ekstrak rimpang kencur terhadap jumlah koloni jamur *C. albicans* dan Uji Regresi dilakukan untuk mengetahui seberapa besar pengaruh variabel dependen (terikat) dengan satu atau lebih variabel independent (variabel penjelas/bebas). Analisis data menggunakan SPSS (*Statistical Product of Service Solution*) for Windows.