

## BAB 4

## METODE PENELITIAN

**4.1 Rancangan Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental *in vitro* dengan metode dilusi tabung (*tube dilution test*). Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh ekstrak etanol daun Sirsak (*Annona muricata L.*) terhadap pertumbuhan *Candida Albicans* secara *in vitro*.

*Tube dilution test* meliputi dua tahap, yaitu pengujian tingkat kekeruhan tabung yang ditujukan untuk mengetahui nilai Kadar Hambat Minimal (KHM) dan tahap penanaman dengan cara *streaking* (penggoresan) pada SDA *plate* yang ditujukan untuk mengetahui nilai Kadar Bunuh Minimal (KBM).

**4.2 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juli sampai September 2013 bertempat di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.

**4.3 Sampel dan Pengulangan**

Sampel penelitian ini adalah *Candida Albicans*. Dasar perhitungan pengulangannya adalah dengan rumus :

$$p (n-1) = 15 \text{ (Notobroto, 2005)}$$

Keterangan : n = pengulangan

p = perlakuan

Dalam penelitian ini digunakan enam konsentrasi ekstrak etanol daun Sirsak masing-masing 0% (Kontrol *C.albicans*), 25%  $\%_v$  , 22,5%  $\%_v$  , 20%  $\%_v$ , 17,5%  $\%_v$ , dan 15%  $\%_v$  maka didapatkan pengulangan :

6(n-1)	15
6n-6	15
6n	21
n	3,5

Jadi jumlah pengulangan minimum yang diperlukan dalam penelitian ini adalah 4 pengulangan.

#### 4.4 Identifikasi Variabel

##### 4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah beberapa konsentrasi bertingkat ekstrak etanol daun sirsak. Konsentrasi ekstrak etanol daun sirsak yang di uji adalah 0% (Kontrol *C.albicans*), 25%  $\%_v$  , 22,5%  $\%_v$  , 20%  $\%_v$ , 17,5%  $\%_v$ , dan 15%  $\%_v$  .

##### 4.4.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung penelitian ini adalah jumlah koloni jamur *Candida albicans* yang tumbuh pada SDA.

#### 4.5 Definisi Operasional

4.5.1 Daun sirsak yang digunakan adalah daun sirsak tua, segar dan berwarna hijau tua yang didapatkan dari Balai Materia Medika , Batu, Malang.

4.5.2 Ekstrak etanol daun sirsak adalah ekstrak cair dengan menggunakan bahan pengestraksi etanol 96% dengan metode maserasi.

4.5.3 Sampel *Candida albicans* adalah isolat dengan nomor registrasi 450-SV yang berasal dari penderita kandidiasis vagina yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.

4.5.4 Kadar Hambat Minimum (KHM) adalah kadar atau konsentrasi minimal larutan ekstrak etanol daun sirsak yang mampu menghambat pertumbuhan *Candida albicans* ditandai dengan tidak terdapatnya kekeruhan pada larutan ekstrak etanol daun sirsak yang telah diberi *Candida albicans*

4.5.5 Kadar Bunuh Minimum (KBM) adalah kadar atau konsentrasi minimal larutan ekstrak etanol daun Sirsak yang mampu membunuh kuman uji (*Candida albicans*), ditandai dengan tidak terdapatnya pertumbuhan atau hanya ada pertumbuhan 0,01% koloni dari inokulum awal koloni kuman pada media SDA yang telah dilakukan penggoresan dengan satu ose larutan ekstrak etanol daun sirsak yang tidak menunjukkan kekeruhan.

4.5.6 Standar kepadatan jamur yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebesar  $10^4$  CFU/ml (Murray *et al*, 1999).

## 4.6 Alat dan Bahan

### 4.6.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian adalah tabung reaksi steril 7 buah, kapas, rak tabung, gelas obyek, mikroskop, ose, bunsen, korek api, stiker label, spidol permanen, cawan petri, inkubator, *colony counter*, vortex, mikropipet, oven, lemari es (freezer), timbangan, gelas erlenmeyer, corong gelas,

kertas saring, labu evaporator, labu penampung etanol, evaporator, rotary evaporator, selang water, pump, water pump, water bath, vacuum pump.

#### 4.6.2 Bahan-bahan yang Digunakan dalam Penelitian

- Isolat *Candida albicans* dengan kepadatan  $10^4$  CFU/ml
- Daun sirsak tua yang berwarna hijau tua
- Aquades steril, NaCl 0,85%, etanol 96%
- *Saboraud broth liquid*
- Pewarnaan Gram : kristal violet, lugol, alcohol 96%, safranin
- *Saboraud Dextrose Agar (SDA)*

#### 4.7 Prosedur Penelitian

##### 4.7.1 Persiapan Alat

Tabung reaksi dipersiapkan dalam kondisi steril kemudian ditutup dengan kapas.

##### 4.7.2 Persiapan Bahan

- Daun sirsak dicuci hingga bersih kemudian dikeringkan
- Isolat *Candida albicans* dari laboratorium Mikrobiologi ditanam pada media SDA steril kemudian diinkubasikan pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 18-24 jam
- Aquades, SDA, dan medium cair *Sabouraud* disterilkan kemudian dimasukkan ke dalam lemari es

### 4.7.3 Pembuatan Sediaan Ekstrak Etanol Daun Sirsak (*Annona muricata* L.)

#### 4.7.3.1 Proses Pengeringan (Armando,2009; Cowan,1999)

- Daun sirsak yang akan dikeringkan dicuci bersih.
- Daun sirsak yang sudah dibersihkan, dimasukkan oven dengan suhu 80°C sampai kering (bebas kandungan air).

#### 4.7.3.2 Proses Ekstraksi (Armando,2009; Cowan,1999)

- Daun sirsak yang sudah kering dihaluskan dengan blender.
- Daun sirsak yang sudah halus ditimbang dengan menggunakan timbangan analitik sebanyak 100 gram (sampel kering).
- Dimasukkan dalam gelas erlenmeyer berukuran 1 liter.
- Rendam dengan etanol sampai volume 900 ml.
- Kocok sampai benar-benar tercampur ( $\pm 30$  menit)
- Campuran diinapkan selama semalam sampai mengendap.

#### 4.7.3.3 Proses Evaporasi (Armando,2009; Cowan,1999)

- Ambil lapisan atas campuran etanol dengan zat aktif yang sudah terambil.
- Masukkan dalam labu evaporasi berukuran 1 liter.
- Pasang labu evaporasi pada evaporator.
- Isi *water bath* dengan air sampai jenuh.
- Pasang semua rangkaian alat, termasuk *rotary evaporator*, pemanas, *water bath* (atur sampai 90°C), kemudian sambungkan dengan aliran listrik.
- Biarkan etanol menguap.

- g. Ditunggu proses berjalan sampai aliran etanol berhenti menetes pada labu penampung ( $\pm$  1,5 hingga 2 jam untuk satu labu).
- h. Hasil evaporasi dimasukkan dalam botol plastik kemudian disimpan di dalam *freezer*.

#### 4.7.4 Persiapan Suspensi Jamur untuk Uji ( $10^4$ CFU/ml) (Murray *et al.*, 1999)

- Dipersiapkan jamur *Candida albicans* yang telah diidentifikasi.
- Diambil 5 koloni *Candida albicans* (diameter 1 mm) dengan menggunakan ose kemudian dimasukkan ke dalam tabung berisi 9 ml NaCl 0,85% steril. Selanjutnya diukur kepadatan optisnya atau *Optical Density* (OD) dengan spektrofotometer pada  $\lambda = 530 \text{ nm}$  dengan acuan bahwa kepadatan optis sebesar 0,1 untuk suspensi sebesar  $10^6$  CFU/ml. Dari prosedur tersebut maka dibuat suspensi sel yang mengandung  $10^6$  CFU/ml ( $1 \times 10^6$  sampai  $5 \times 10^6$  CFU/ml) dengan melakukan pengenceran.
- Untuk mendapatkan suspensi sel yang mengandung  $10^4$  CFU/ml dilakukan dengan cara mengambil 1 ml (dari tabung yang mengandung  $10^6$  CFU/ml) untuk dicampur dengan 9 ml NaCl 0,85% steril. Maka akan didapatkan suspensi sel dengan konsentrasi  $10^5$  CFU/ml. Dilanjutkan lagi dengan mengambil 1 ml lagi (dari tabung yang mengandung  $10^5$  CFU/ml) untuk dicampur dengan 9 ml NaCl 0,85% steril. Maka akan didapatkan suspensi sel dengan konsentrasi  $10^4$  CFU/ml.

#### 4.7.5 Identifikasi *Candida albicans*

##### 4.7.5.1 Pewarnaan Gram (Cappuccino and Sherman, 1998)

- a. Diambil 1 ose aquades dan diletakkan pada obyek glass.
- b. Jamur sebanyak 1 ose diletakkan pada obyek glass kemudian ditunggu hingga kering.
- c. Difiksasi dengan memberikan pemanasan secukupnya.
- d. Sediaan dituangi Kristal violet dan dibiarkan selama 1 menit.
- e. Sisa bahan pewarna dibuang dan dibilas dengan air
- f. Sediaan dituangi larutan lugol dibiarkan selama 1 menit
- g. Sisa lugol dibuang dan dibilas dengan air.
- h. Sediaan alkohol 96% sebagai peluntur selama 5-10 detik.
- i. Sisa alkohol dibuang dan dibilas dengan air.
- j. Sediaan dituangi safranin sebagai warna pembanding selama 30 detik.
- k. Sisa safranin dibuang dan dibilas dengan air.
- l. Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap dan dilihat di bawah mikroskop dengan lensa obyektif pembesaran 100-400 x.
- m. Jamur *Candida albicans* berbentuk oval dan budding.

##### 4.7.5.2 Uji Germinating Tube (Forbes,2007)

- a. Disediakan serum mamalia dalam tabung.
- b. Pembenuhan *Candida albicans* pada SDA diambil dengan ose dan dimasukkan ke dalam tabung berisi serum.
- c. Diinkubasikan pada suhu 37°C selama  $\pm 4$  jam.
- d. Kultur di dalam serum tersebut diambil menggunakan ose dan diletakkan pada gelas obyek dan tutup dengan penutupnya.

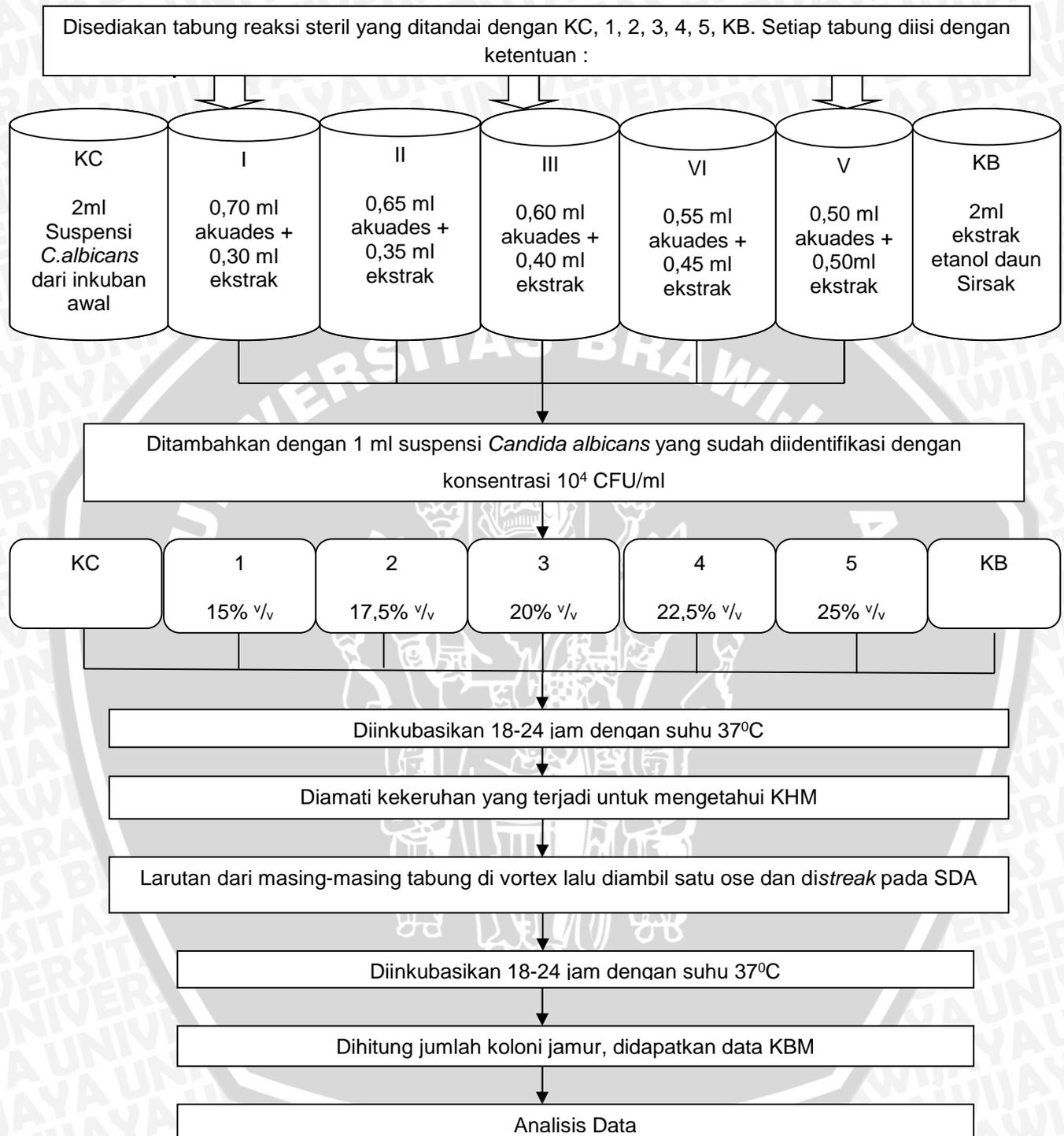
- e. Diperiksa dibawah mikroskop dengan lensa obyektif pembesaran 400 kali dan dicari bentukan *germinating tube*.

#### 4.7.6 Pengujian Efek Ekstrak Etanol Daun Sirsak terhadap *Candida Albicans* (Forbes,2007)

- a. Disediakan tabung reaksi steril yang telah ditandai KC (Kontrol *Candida albicans*), 1,2,3,4,5, dan KB (Kontrol Bahan).
- b. Tabung KC diisi dengan suspensi kuman *Candida albicans* dengan kepadatan  $(1-5) \times 10^4$  CFU/ml sebanyak 2 ml digunakan sebagai kontrol (+).
- c. Tabung 1,2,3,4,5 diisi dengan aquades steril masing-masing sebanyak 0,70ml; 0,65ml; 0,60ml; 0,55ml; dan 0.50 ml.
- d. Tabung 1,2,3,4,5 diisi dengan ekstrak etanol daun sirsak masing-masing 0,30ml; 0,35ml; 0,40ml; 0,45ml; dan 0,50 ml. Sehingga konsentrasi daun sirsak berturut-turut adalah 30%  $\frac{v}{v}$ , 35%  $\frac{v}{v}$ , 40%  $\frac{v}{v}$ , 45%  $\frac{v}{v}$ , dan 50%  $\frac{v}{v}$ .
- e. Dimasukkan suspensi kuman *Candida albicans* dengan kepadatan  $(1-5) \times 10^4$  CFU/ml dalam tabung 1,2,3,4,5 masing-masing sebanyak 1 ml, sehingga konsentrasi daun sirsak sekarang pada tabung 1,2,3,4,5 berturut-turut 15%  $\frac{v}{v}$ , 17,5%  $\frac{v}{v}$ , 20%  $\frac{v}{v}$ , 22,5%  $\frac{v}{v}$ , dan 25%  $\frac{v}{v}$ .
- f. Tabung KB diisi ekstrak etanol daun sirsak dengan menggunakan mikropipet sebanyak 2 ml (100%). Tabung ini digunakan sebagai kontrol (-).
- g. Ketujuh tabung divortex kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C selama 18-24 jam

- h. Setelah diinkubasikan, semua tabung dikeluarkan dari inkubator dan dilakukan pengamatan pada kekeruhan tabung untuk menentukan kadar hambatan minimal (KHM).
- i. Kemudian seluruh tabung divortex, lalu diambil 1 ose dan dilakukan *streaking* pada medium SDA. Lalu diinkubasikan lagi selama 18-24 jam pada suhu 37°C.
- j. Setelah diinkubasikan, hitung koloni yang tumbuh pada SDA. Tentukan Kadar Bunuh Minimal (KBM) larutan ekstrak etanol daun Sirsak tersebut. Skema prosedur penelitian dapat dilihat pada Gambar 4.1





Gambar 4.1 Skema Prosedur Penelitian

#### 4.8 Analisis Data

Data dari pengamatan perbenihan *Candida albicans* dengan berbagai konsentrasi ekstrak etanol daun sirsak secara kuantitatif dianalisis menggunakan uji statistik *one way ANOVA* yang kemudian dilanjutkan dengan uji korelasi untuk menentukan kekuatan dan arah hubungan antara konsentrasi ekstrak etanol daun Sirsak dengan pertumbuhan *Candida albicans* secara *in vitro* (Santoso, 2010). Sebelumnya, perlu dilakukan uji normalitas data dan uji homogenitas varians karena syarat uji *ANOVA* satu arah adalah data yang diuji harus berdistribusi normal dan varians data harus sama. Jika uji normalitas dan homogenitas menunjukkan distribusi yang normal maka penelitian ini menggunakan uji statistik parametrik *One way ANOVA*. Namun, apabila data tidak homogen dan memiliki distribusi yang tidak normal, maka dilakukan uji nonparametrik untuk membandingkan kekeruhan yang terjadi dalam pelaksanaan penelitian ini. Uji nonparametrik yang dilakukan yaitu *Kruskal wallis* untuk mengetahui adanya perbedaan kekeruhan koloni jamur terhadap pemberian ekstrak etanol daun sirsak dalam berbagai konsentrasi kemudian dilakukan uji *Mann Whitney U* untuk mengetahui konsentrasi yang menunjukkan perbedaan (Santoso,2010). Rencana analisis data terhadap data yang didapat akan dilakukan dengan menggunakan program SPSS (*Statistical Product of Service Solution*) for Windows 17.0.

Untuk melihat adanya perbedaan yang signifikan antara rata-rata pertumbuhan koloni pada masing-masing konsentrasi maka dilakukan uji *ANOVA* satu arah. Dengan uji ini akan diperoleh perbandingan rata-rata jumlah koloni *Candida albicans* pada ketujuh kelompok konsentrasi, sehingga dapat disimpulkan apakah pemberian ekstrak etanol daun sirsak menyebabkan

penurunan jumlah koloni *Candida albicans* secara signifikan (Andi,2004). Pada penelitian ini, tingkat kepercayaan yang dipakai adalah 95% untuk tingkat signifikansi  $\alpha = 0,05$

