

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain penelitian eksperimental laboratorium *Post test only Control Group Design* dengan menggunakan metode dilusi tabung (*Tube Dilution Test*). Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui efektivitas perasan bawang putih (*Allium sativum Linn.*) sebagai antifungal terhadap *Candida albicans* secara *in vitro*.

Dilusi tabung (*Tube Dilution Test*) meliputi dua tahap, yaitu tahap pengujian bahan di media *broth* yang bertujuan untuk menentukan Kadar Hambat Minimal (KHM), dan tahap penanaman pada media *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) dengan metode *streaking* (penggoresan) untuk menentukan Kadar Bunuh Minimal (KBM). Besarnya konsentrasi yang digunakan, ditetapkan melalui eksperimen pendahuluan (Lingga dan Rustama, 2005).

4.2 Tempat Dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang dilaksanakan pada bulan Agustus 2013 sampai Oktober 2013.

4.3 Sampel Penelitian

Pada penelitian ini sampel yang digunakan adalah jamur *Candida albicans* swab vagina dengan kode isolat 450-SV yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas (*Independent*)

Variabel bebas pada penelitian ini adalah perasan bawang putih yang dibuat dengan konsentrasi kadar perasan antara lain : 0,5%, 0,4%, 0,3%, 0,2%, 0,1% berdasarkan eksplorasi awal atau penelitian pendahuluan (Ramadanti, 2008).

4.4.2 Variabel Tergantung (*Dependent*)

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah pertumbuhan koloni jamur *Candida albicans* pada *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA).

4.5 Jumlah Sampel

Besarnya konsentrasi yang digunakan ditetapkan melalui eksperimen pendahuluan. Pada penelitian ini menentukan banyaknya sampel menggunakan rumus Federer dalam Elya (2010), yaitu : $t(n-1) \geq 15$

Keterangan :

n = jumlah sampel

t = jumlah kelompok perlakuan

Karena dalam penelitian ini menggunakan enam kelompok perlakuan diantaranya terdapat dosis I,II,III,IV,V,VI maka jumlah sampelnya adalah :

$$6(n-1) \geq 15$$

$$6n-6 \geq 15$$

$$6n \geq 21$$

$$n \geq 3,5$$

$$n \approx 4$$

Dari perhitungan di atas, didapatkan sampel minimal yang akan digunakan adalah satu isolat *Candida albicans* dengan pengulangan sebanyak empat kali.

4.6 Definisi Operasional

4.6.1 Bawang putih (*Allium sativum* Linn.) yang digunakan dibeli dari pasar

Induk Gadhang Malang, kemudian dibawa ke Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang untuk diambil perasan.

4.6.2 Perasan bawang putih merupakan perasan yang dihasilkan dari bawang putih yang dihaluskan dengan menggunakan *juicer* tanpa menggunakan air dan disaring menggunakan kertas saring, dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4.6.3 Jamur *Candida albicans* yang digunakan adalah isolat yang berasal dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang yang berasal dari kultur penderita kandidiasis vaginalis di Rumah Sakit Saiful Anwar (RSSA) Malang.

4.6.4 Kadar Hambat Minimum (KHM) adalah kadar atau konsentrasi minimal perasan bawang putih yang mampu menghambat pertumbuhan jamur *Candida albicans* yang ditandai dengan tidak adanya kekeruhan pada tabung yang berisi larutan perasan bawang putih yang ditambahkan *Candida albicans* setelah diinkubasi selama 18-24 jam.

4.6.5 Kadar Bunuh Minimum (KBM) adalah kadar atau konsentrasi minimal perasan bawang putih yang mampu membunuh jamur *Candida albicans* yang ditandai dengan tidak adanya pertumbuhan koloni *Candida albicans*

pada media padat setelah diinkubasi selama 18-24 jam, atau pertumbuhan koloninya kurang dari 0,1% dari jumlah koloni inokulum awal (*Original inokulum/OI*).

4.6.6 Pengamatan kualitatif digunakan untuk menentukan pertumbuhan

Candida albicans yaitu melihat kekeruhan perasan bawang putih dalam media *Broth* dengan berbagai konsentrasi, secara berturut-turut 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5% yang telah diinokulasikan dengan jamur tersebut.

4.6.7 Pengamatan kuantitatif digunakan untuk menentukan pertumbuhan

Candida albicans dengan cara menghitung koloni jamur pada SDA dengan menggunakan *colony counter*.

4.6.8 Kontrol positif adalah konsentrasi jamur tanpa perasan bawang putih

yang dapat digunakan untuk mengetahui apakah jamur yang digunakan terkontaminasi dengan bakteri lain.

4.6.9 Kontrol Negatif adalah konsentrasi yang digunakan untuk mengetahui

apakah bahan yang digunakan steril.

4.6.10 Original inokulum adalah inokulum jamur dengan konsentrasi 10^4

CFU/ml yang diinokulasikan pada media agar padat sebelum diinkubasi, dan digunakan untuk mencari kategori KHM dan KBM.

4.7 Alat dan Bahan Penelitian

4.7.1 Untuk Pembuatan Perasan Bawang Putih

Dalam pembuatan perasan bawang putih (*Allium sativum Linn.*), maka diperlukan 100 gram umbi bawang putih yang segar, timbangan digital, blender *juicer*, kertas saring untuk menyaring perasan bawang putih, gelas Erlenmeyer, corong gelas.

4.7.2 Untuk Identifikasi *Candida albicans*

Untuk identifikasi *Candida albicans*, maka disiapkan satu isolat *Candida albicans* dengan kepadatan 10^6 CFU/ml diencerkan 100x hingga 10^4 CFU/ml, Aquades steril, SDA (Sabouraud Dextrose Agar) untuk pewarnaan Gram : Kristal violet, lugol, alkohol 96%, safranin, minyak emersi.

4.7.3 Untuk *Tube Dilution Test*

Untuk persiapan dilusi tabung, maka disiapkan bahan dan alat sebagai berikut: tabung reaksi, pipet steril ukuran 1 ml dan 10 ml, inkubator, vortex, hasil perasan bawang putih, pembenihan cair *Candida albicans* yang telah distandarisasikan, SDA (*Sabouraud Dextrose Agar*), ose, lampu, spiritus.

4.8 Prosedur Penelitian

4.8.1 Persiapan Alat

Tabung reaksi dan tabung Erlenmeyer disterilkan dengan autoklaf terlebih dahulu kemudian ditutup dengan kapas.

4.8.2 Persiapan Bahan

- Kulit umbi bawang putih dikupas, setelah dikupas dicuci dengan air mengalir hingga bersih, kemudian ditimbang seberat 100 gram. Selanjutnya dihaluskan dengan blender *juicer* tanpa pelarut air. Kemudian hasil larutan bawang putih yang sudah di blender disaring dengan menggunakan kertas saring, hasil filtratnya dimasukkan ke dalam tabung.

- Isolat *Candida albicans* dari Laboratorium Mikrobiologi ditanam pada media SDA steril kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam.
- Aquades dan media cair *Sabouraud Dextrose Agar* disterilkan dengan autoklaf kemudian dimasukkan ke dalam lemari es.

4.8.3 Pembuatan Bentuk Sediaan Perasan Bawang Putih (*Allium sativum* Linn.)

Pembuatan perasan bawang putih melalui tahapan sebagai berikut: Bawang putih terlebih dahulu di kupas kulitnya. Setelah dikupas dibersihkan dengan air mengalir sampai bersih. Kemudian bawang putih yang telah dibersihkan ditimbang sebanyak 100 gram dengan timbangan digital. Kemudian bawang dilumat dengan di blender tanpa diberi air. Hasil tersebut kemudian disaring dengan menggunakan kertas saring untuk diambil sarinya. Setelah didapat sarinya diambil 0,001 ml; 0,002 ml; 0,003 ml; 0,004 ml; 0,005ml dan ditambahkan aquades sampai 1 ml untuk dosis 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, dan 0,5%.

4.8.4 Identifikasi *Candida albicans*

Identifikasi *Candida albicans* dengan beberapa cara yakni identifikasi koloni pada *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA), pewarnaan gram, dan *Germinating Tube Test*.

4.8.4.1 Identifikasi Koloni pada Sabouraud Dextrose Agar (SDA)

Isolat jamur dari laboratorium mikrobiologi diambil satu koloni dengan menggunakan ose. Kemudian dibiakkan pada media SDA hingga dihasilkan koloni terpisah dan diinokulasi selama 24-48 jam. Setelah itu diamati karakteristik koloni jamur.

4.8.4.2 Test Germinating Tube

Disediakan serum mamalia dalam tabung 0,5 ml. Kemudian diambil pembenihan *Candida albicans* pada SDA dengan ose yang sudah disterilkan dengan cara pembakaran dan dimasukkan ke dalam tabung berisi serum mamalia 0,5 ml. Setelah itu diinkubasi pada suhu 37°C selama lebih kurang 24 jam. Kemudian diambil kultur di dalam serum tersebut menggunakan ose dan diletakkan pada gelas obyek kemudian ditutup dengan penutupnya. Dilakukan pemeriksaan di bawah mikroskop dengan perbesaran 400 kali. Dicari bentukan khas *Candida albicans* yang membentuk *germ tube*.

4.8.4.3 Pewarnaan Gram

Object glass dibersihkan dengan kapas steril. dilewatkan di atas api untuk menghilangkan lemak. Lalu biarkan dingin. Kemudian ditetaskan satu tetes aquades steril atau larutan saline pada *obyek glass*. Dengan ose yang sudah steril dengan pembakaran, ambillah satu ose koloni *Candida albicans* yang tumbuh pada medium padat. Suspensikan dengan satu tetes aquades steril atau larutan saline yang sudah ditetaskan terlebih dahulu pada *obyek glass*. Hapusan sebaiknya dibuat tipis. Hapusan dibiarkan

kering di udara, kemudian difiksasi dengan cara melewatkan sediaan sebanyak 3x diatas api. Sediaan siap untuk diwarnai. Sediaan dituangi dengan kristal violet selama satu menit, kemudian dibuang sisanya. Dibilas Kristal violet dengan air. Sediaan dituangi dengan lugol selama satu menit, kemudian buang sisa lugol dan bilas dengan air. Sediaan dituangi dengan alkohol 96% selama 5-10 detik atau sampai warna cat luntur, kemudian buang sisa alkohol dan bilas dengan air. Sediaan dituangi dengan safranin selama 30 detik, kemudian buang sisa safranin dan bilas dengan air. Kemudian kertas penghisap dikeringkan. Dilihat di bawah mikroskop dengan perbesaran lensa obyek 1000 kali. Hasil positif : *Candida albicans* tercat ungu (Gram positif) dan berbentuk oval.

4.8.5 Persiapan Suspensi Uji *Candida albicans* 10⁴ CFU/ml

Dzen dkk (2003) menjelaskan cara persiapan suspensi uji jamur, dengan perhitungan jumlah koloni menggunakan spektrofotometer. OD=0,1 disebutkan setara dengan standar McFarland 0,5. Sementara itu, standar McFarland 0,5 setara dengan uji konsentrasi jamur sebesar 10⁶ CFU/ml. dengan demikian, persiapan suspensi uji *Candida albicans* dapat dilakukan sebagai berikut :

- Disediakan jamur *Candida albicans* dari SDA yang telah diuji konfirmaasi
- Diambil 5 koloni (diameter ≥ 1 mm) dengan ose kemudian dimasukkan ke dalam 5 ml NaCl 0,85% steril. Kemudian diukur OD (Optical Density) atau kepadatan optisnya dengan spektrofotometer pada λ : 530 nm. Dari hasil yang diperoleh dibuat suspense sel yang mengandung 1x10⁶ CFU/ml

(sesuai standarMcFarland 0,5) yang setara dengan OD= 0,1 dilakukan perhitungan sebagai berikut :

$$N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$$

Keterangan :

- N₁ = Hasil spektrofotometri
- V₁ = Volume jamur yang akan ditambah pengencer
- N₂ = OD (0,1 setara dengan 10⁶ CFU/ml)
- V₂ = Volume suspense jamur uji (10 ml)

Dari hasil perhitungan tersebut diperoleh volume jamur (ml) yang akan ditambah pengencer untuk mendapatkan 10 ml konsentrasi 10⁴ CFU/ml.

- Dilakukan pengenceran suspense jamur dengan konsentrasi 10⁶ CFU/ml sebanyak 100 kali untuk mendapatkan konsentrasi jamur 10⁴ CFU/ml.
- Dari 10 ml jamur dengan konsentrasi 10⁶ diambil 1 ml larutan kemudian dimasukkan ke dalam tabung yang telah diisi 9 ml NaCl 0,85% steril sehingga konsentrasi jamur menjadi 10⁵ CFU/ml.
- Diambil 1 ml larutan dengan konsentrasi jamur 10⁵ CFU/ml kemudian dimasukkan ke dalam tabung yang telah diisi 9 ml NaCl sehingga konsentrasi jamur menjadi 10⁴ CFU/ml.

4.8.6 Uji Antifungal Perasan Bawang Putih Terhadap *Candida albicans*

Sebelum dosis konsentrasi ditentukan dilakukan eksplorasi (penelitian pendahuluan) terlebih dahulu sebanyak tiga kali. Penelitian pertama dilakukan dengan memakai konsentrasi 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125% dan 1,56%. Hasil pengamatan pada SDA menunjukkan konsentrasi 50% sampai konsentrasi 1,56% jernih. Sementara untuk

jumlah koloni yang tumbuh di SDA, dari konsentrasi 50% sampai dengan 1,56% tidak ada koloni *Candida albicans* yang tumbuh.

Hasil penelitian kedua, pada pengamatan SDA, jumlah koloni pada konsentrasi dari 4%, 3%, 2%, 1% semua konsentrasi tersebut tidak menunjukkan adanya jumlah koloni *Candida albicans* yang tumbuh, sehingga untuk penelitian ketiga konsentrasi diturunkan menjadi 1%, 0,9%, 0,8%, 0,7%, 0,6%, 0,5%, 0,4%, 0,3%, 0,2%, 0,1%. Diharapkan pada penelitian ketiga akan didapatkan hasil KHM dan KBM .

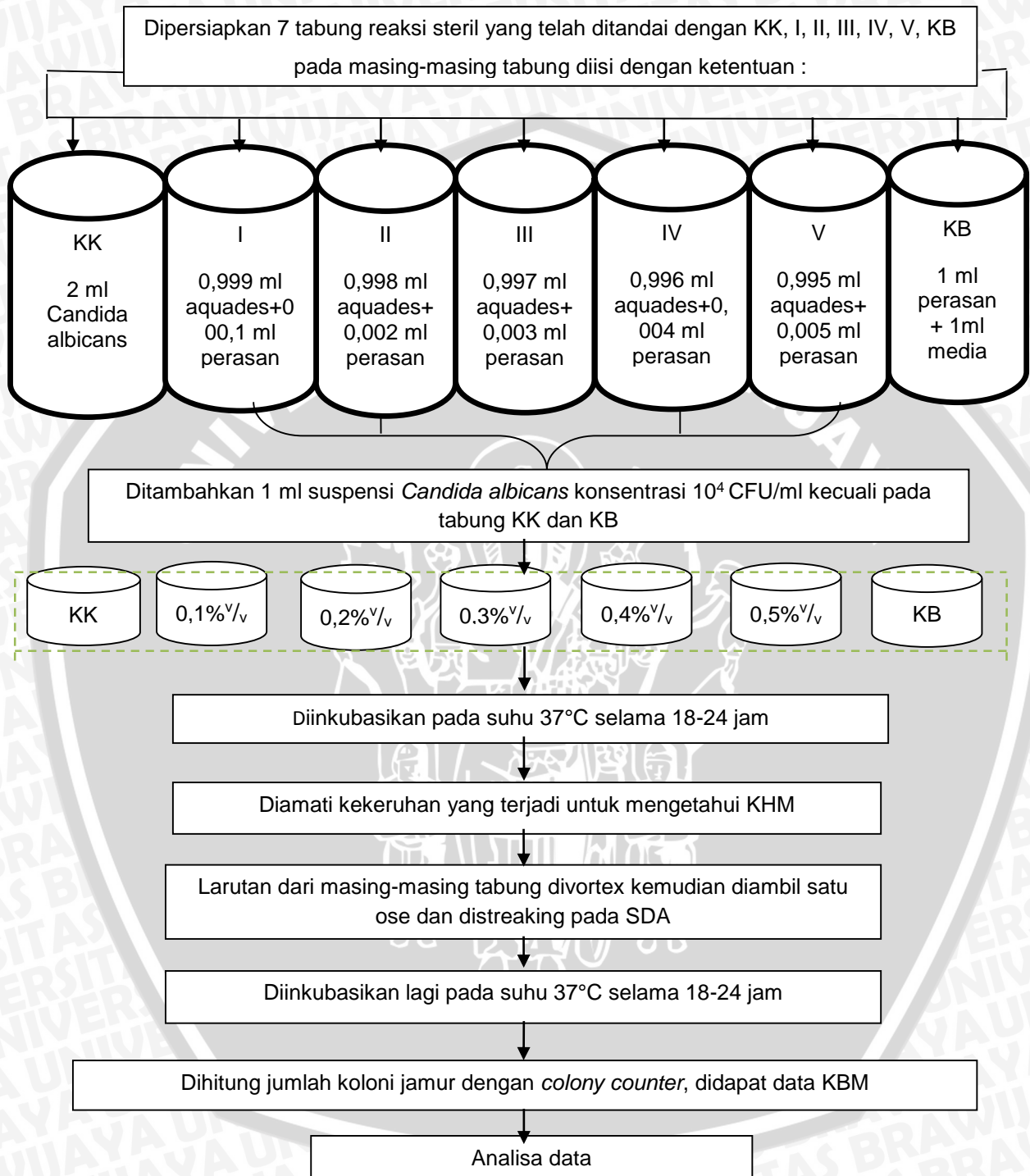
Hasil penelitian ketiga menunjukkan bahwa untuk konsentrasi 1%, 0,9%, 0,8%, 0,7%, 0,6% dan 0,5% tidak menunjukkan adanya pertumbuhan koloni *Candida albicans* sedangkan untuk konsentrasi 0,2% dan 0,1% menunjukkan ada pertumbuhan koloni *candida albicans*. Dan untuk konsentrasi 0,3% dan 0,4% ada sedikit sekali pertumbuhan koloni *candida albicans* yang tumbuh. Dari penelitian yang ketiga ini dapat ditentukan KBM dari bahan uji. Dan dilanjutkan untuk dilakukan pengulangan dengan konsentrasi dari 0,5%, 0,4%, 0,3%, 0,2%, 0,1%.

Langkah-langkah dalam menyiapkan dosis konsentrasi bahan uji adalah sebagai berikut:

- 7 tabung reaksi steril disiapkan yang ditandai KK, I, II, III, IV, V, KB
- Tabung KK (Kontrol Kuman) diisi dengan 2 ml suspensi *Candida albicans* dengan kepadatan 10^4 CFU/ml. Tabung ini digunakan sebagai kontrol positif.
- Tabung KB (Kontrol Bahan) diisi dengan perasan bawang putih sebanyak 1 ml dan ditambahkan 1 ml media. Tabung ini digunakan sebagai kontrol negatif.

- Tabung I, II, III, IV, V diisi dengan aquades steril masing-masing sebanyak 0,999 ml; 0,998 ml, 0,997 ml; 0,996ml; 0,995ml.
- Selanjutnya tabung I, II, III, IV, V diisi dengan perasan bawang putih masing-masing sebanyak 0,001 ml; 0,002 ml; 0,003 ml; 0,004 ml; 0,005 ml sehingga konsentrasi perasan bawang putih berturut-turut adalah 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%.
- Dimasukkan suspensi jamur *Candida albicans* dengan kepadatan 10^4 CFU/ml pada tabung I, II, III, IV, V masing-masing sebanyak 1 ml.
- Ketujuh tabung divortex kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C selama 18-24 jam.
- Setelah selesai diinkubasi, semua tabung dikeluarkan dari inkubator dan dilakukan pengamatan pada kekeruhan tabung dengan membandingkan larutan tersebut dengan kontrol bahan dan jamur untuk menentukan Kadar Hambat Minimal (KHM).
- Selanjutnya seluruh tabung divortex kemudian diambil 1 ose larutan pada masing-masing tabung kemudian dilakukan penanaman atau streaking pada medium SDA.
- Semua medium SDA diinkubasikan lagi pada suhu 37°C selama 18-24 jam pada suhu 37°C.
- Setelah selesai diinkubasi, koloni yang tumbuh pada SDA dihitung dan ditentukan Kadar Bunuh Minimal (KBM) perasan bawang putih tersebut dengan menggunakan *colony counter*.

4.8.7 Skema Pelaksanaan Penelitian



Gambar 4.1 Skema Pelaksanaan Penelitian

Keterangan : KB : Kontrol Bawang putih

KK : Kontrol Kuman

4.9 Analisis Data

Hasil data yang didapatkan setelah dilakukan pengamatan dari perbenihan jamur *Candida albicans* pada masing-masing konsentrasi perasan bawang putih akan dianalisis menggunakan analisis statistik SPSS versi 17.0 for Windows. Penelitian ini menggunakan variabel numerik dengan satu faktor yang ingin diketahui, yaitu perbedaan jumlah koloni jamur *Candida albicans* pada SDA berdasarkan factor perlakuan pemberian perasan bawang putih (*Allium sativum* Linn.).

Berdasarkan faktor perlakuan pemberian perasan bawang putih (*Allium sativum* Linn.) yang ditentukan secara kuantitatif, maka uji statistik yang digunakan adalah *One Way ANOVA* dengan $\alpha = 0,05$ (taraf kepercayaan 95%). Sedangkan untuk menentukan besar kuatnya arah hubungan antara pertumbuhan koloni *Candida albicans* dengan berbagai konsentrasi perasan bawang putih maka dilanjutkan dengan uji korelasi. Uji ANOVA satu arah berfungsi untuk mengetahui signifikansi hasil perhitungan jumlah koloni *Candida albicans* terhadap konsentrasi perasan bawang putih. Dari uji ANOVA yang dilakukan terhadap ketujuh kelompok konsentrasi, maka dapat dilihat apakah pemberian perasan bawang putih menyebabkan penurunan jumlah koloni *Candida albicans* secara signifikan (Riduwan, 2010). Penelitian ini merupakan penelitian analisis bivariat dengan dua kelompok yang tidak berpasangan. Sebelum dilakukan uji ANOVA satu arah terdapat beberapa persyaratan yaitu data harus berdistribusi normal dengan menggunakan uji Kolmogorov Smirnov dan varian antar variabel percobaan harus homogen dengan menggunakan uji Levene (Dahlan, 2010).

Dalam penghitungan hasil penelitian ini digunakan tingkat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$). Dari hipotesis tersebut, maka data dilanjutkan dengan uji korelasi

Pearson untuk mengetahui kekuatan dan keeratan hubungan pemberian perlakuan konsentrasi perasan bawang putih terhadap jumlah koloni *Candida albicans*. Angka korelasi di atas 0,5 menunjukkan korelasi kuat, sedangkan jika angka korelasi di bawah 0,5 menunjukkan korelasi yang lemah. Apabila hasil ANOVA bermakna ($p < 0,05$), kemudian dilakukan analisis *Post Hoc Test* (*Tukey Test*), untuk mengetahui perlakuan mana saja yang menyebabkan jumlah koloni jamur *Candida albicans* menunjukkan perbedaan yang bermakna dan tidak bermakna.

