

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental. Uji antimikroba dilakukan secara *invitro* menggunakan metode dilusi tabung untuk mengetahui aktivitas ekstrak daun pacar air *Impatiens balsamina* sebagai antifungi terhadap jamur *Candida albicans*.

4.2 Sampel

Sampel dalam penelitian ini adalah jamur *Candida albicans* yang didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

Dasar dari perkiraan jumlah pengulangan yang akan dilakukan adalah berdasarkan rumus dibawah ini:

$$p(n-1) > 15$$

dengan: p = sebagai jumlah perlakuan
 n = jumlah pengulangan (Notobroto, 2005)

Dalam penelitian ini digunakan 6 konsentrasi ekstrak daun pacar air *Impatiens balsamina* maka;

$$p(n-1) > 15$$

$$6(n-1) > 15$$

$$6n - 6 > 15$$

$$6n > 21$$

$$n > 3,5 \approx 4$$

Jadi, dalam penelitian ini akan dilakukan pengulangan sebanyak 4 kali.

4.3 Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah daun pacar air *Impatiens balsamina* dengan konsentrasi 25%, 30%, 35%, 40%, 45% dan 50% yang didapatkan dengan rumus pengenceran $M1.V1 = M2.V2$.

4.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah pertumbuhan jamur *Candida albicans*. Parameter yang digunakan pada penentuan aktivitas antifungi terhadap *Candida albicans* yaitu Kadar Hambat Minimal (KHM) dan Kadar Bunuh Minimal (KBM).

4.5 Definisi Operasional

- Daun pacar air *Impatiens balsamina* dipetik secara acak di pinggiran jalan Kota Malang sebagai tanaman liar. Daun yang dipilih warnanya bervariasi dari hijau muda hingga hijau tua.
- Jamur *Candida albicans* yang digunakan didapat dari laboratorium klinik mikrobiologi FKUB.
- Standar kepadatan jamur yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebesar 10^6 CFU/ml (*ColonyForming Unit/ml*).
- Ekstrak daun pacar air *Impatiens balsamina* adalah sediaan yang diperoleh dengan cara ekstraksi daun pacar air *Impatiens balsamina* menggunakan ethanol 96%.
- Kadar Hambat Minimal (KHM) adalah kadar minimal ekstrak yang mampu menghambat jamur uji *Candida albicans* yang ditandai dari kejernihannya pada tabung.
- Kadar Bunuh Minimal (KBM) adalah kadar atau konsentrasi minimal ekstrak yang mampu membunuh jamur uji *Candida albicans*.

- Pengamatan secara kualitatif untuk melihat kejernihan ditetapkan melalui skor dibawah ini:
0 : jernih
1 : sedikit keruh
2 : keruh
3 : sangatkeruh
- Pengamatan secara kuantitatif digunakan untuk mengetahui jumlah koloni *Candida albicans* yang tumbuh menggunakan *colony counter*.

4.6 Alat dan Bahan

4.6.1 Alat

- | | | |
|-----------------|------------------|---------------------|
| - Pisau | - Blender | - Spektrumfotometer |
| - Alat inkubasi | - Evaporator set | - Mikroskop |
| - Ose | - Colonycounter | - Tabung reaksi |
| - Pipet ukur | - Beakerglass | - Obyek glass |
| - Bunsen | - Vortex | - Cawan petri |

4.6.2 Bahan

- Daun pacar air *Impatiens balsamina*
- Ethanol 96%
- Biakan murni jamur *Candida albicans*
- Bahan untuk pengecatan gram: *crystal violet*, *Lugol's iodine*, alkohol 96%, safranin
- Medium *Sabouraud Dextrosa Agar* (SDA)
- Medium *Sabouraud Dextrose Broth* (SDB)
- NaCl fisiologis steril
- Aquades steril

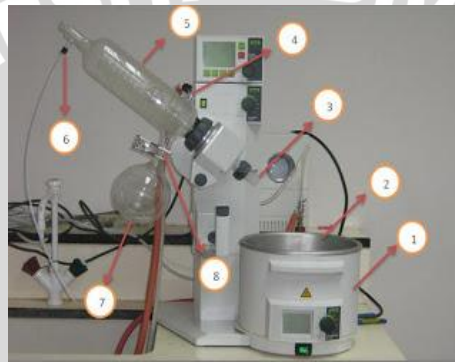
4.7 Persiapan Ekstrak Daun Pacar Air *Impatiensbalsamina*

4.7.1 Proses Ekstraksi

Daun pacar air *Impatiens balsamina* secukupnya dicuci dan dikeringkan menggunakan oven. Setelah kering, daun dipotong kecil-kecil kemudian dihaluskan dengan blender dan dicampur dengan ethanol 96%. Rendam dengan

ethanol 96% selama \pm 24jam. Ekstraksi dilakukan berulang kali hingga sampel daun pacar air *Impatiens balsamina* terekstraksi sempurna yang ditandai dengan terlihatnya warna asli pelarut. Sampel yang direndam dengan pelarut tadi disaring dengan kertas saring untuk mendapat maseratnya. Kemudian maserat tersebut dipisahkan dari pelarut dengan menguapkan secara *in vacuo* dengan *rotatory evaporator* (Puspita, 2012).

4.7.2 Proses Evaporasi



Gambar4.1 :Rotatory Evaporator (Anam, 2012).

Keteranggambar:

1. Hot plate
2. Waterbath
3. Ujung rotor sample
4. Lubang kondensor sebagai pintu masuk
5. Kondensor
6. Lubang kondensor sebagai pintu keluar
7. Labu alas bulat penampung
8. Ujung rotor penampung

Sampel atau ekstrak cair daun pacar air *Impatiens balsamina* yang ingin diuapkan, dimasukkan kedalam labu alas bulat dengan volume 2/3 bagian dari volume labu alas bulat yang digunakan. Selanjutnya *waterbath* dipanaskan sesuai dengan titik didih ethanol, 80°C. Setelah suhu tercapai, labu alas bulat dipasang dengan kuat pada ujung rotor yang menghubungkan dengan kondensor. Aliran air pendingin dan pompa vakum dijalankan, kemudian tombol

rotor diputar dengan kecepatan tertentu sekitar 5-8 putaran. Proses penguapan ini dilakukan hingga memperoleh ekstrak yang ditandai dengan terbentuknya gelembung-gelembung udara yang pecah pada permukaan ekstrak atau jika sudah tidak ada lagi pelarut yang menetes pada labu alas bulat penampung. Setelah proses penguapan selesai, *rotatory evaporator* dihentikan dengan cara memutar tombol rotor ke arah nol dan temperatur pada *waterbath* menjadi nol pula. Kemudian pompa labu alas bulat dikeluarkan setelah sebelumnya kran mengatur tekanan pada ujung kondensor dibuka (Muthia, 2011).

4.8 Prosedur Penelitian

4.8.1 Identifikasi dengan Pengecatan Gram

1. Bersihkan kaca objek kemudian panaskan diatas bunsen untuk menghilangkan lemak. Biarkan hingga dingin.
2. Dengan ose steril, ambil koloni *Candida albicans* dan dihapuskan tipis diatas kaca objek. Kemudian dibakar diatas bunsen agar terfiksasi.
3. Setelah dingin tetesi dengan *crystal violet* dan didiamkan selama 1 menit, kemudian bilas dengan air.
4. Berikutnya tetesi dengan *Lugol's iodine* selama 1 menit lalu bilas dengan air mengalir.
5. Teteskan alkohol 96% selama 5-10 detik kemudian bilas dengan air.
6. Tetesi safranin selama 1 menit kemudian bilas dengan air mengalir.
7. Keringkan kaca objek dengan tisu atau kertas.
8. Amati dibawah mikroskop dengan perbesaran 100x.
9. Hasil positif: bentukan bulat atau oval *Candida albicans* yang berwarna ungu atau gram positif (Lindh *et al.*, 2010).

4.8.2 Identifikasi dengan Uji *Germinating Tube*

1. Campurkan 5 koloni *Candida albicans* dengan 0.5ml serum mamalia dalam tabung steril.
2. Inkubasi pada suhu 37°C selama 2 jam.
3. Ambil kultur menggunakan ose kemudian taruh diatas kaca objek dan tutup menggunakan kaca penutup.
4. Amati dibawah mikroskop.

5. Hasil positif: terdeteksi adanya pseudohifa *Candida albicans* (Omoregieet *al.*, 2005).

4.8.3 Persiapan Pembuatan Suspensi *Candida albicans*

1. *Candida albicans* dimurnikan pada media *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) menggunakan beberapa pola goresan yang berbeda dengan tujuan agar antar koloni jamur dapat terpisah.
2. Sekitar 5 koloni *Candida albicans* ($d \geq 1\text{mm}$) dari hasil pemurnian tersebut diambil menggunakan ose dan dimasukkan pada tabung berisi NaCl fisiologis. Kemudian dibandingkan dengan standar McFarland 0.5 hingga kerapatannya 10^6 CFU/ml.
3. Masukkan 1ml larutan pada tabung yang berisi jamur dengan kerapatan 10^8 CFU/ml dengan 9ml SDB untuk menghasilkan kerapatan jamur 10^7 CFU/ml.
4. Kemudian masukkan 1ml larutan dengan kerapatan jamur 10^7 CFU/ml kedalam tabung berisi 9ml SDB. Kini kerapatan jamur menjadi 10^6 CFU/ml dan siap untuk digunakan.

4.8.4 Pengujian Aktivitas Antijamur

4.8.4.1 Penelitian Pendahuluan

1. Menyiapkan 8 tabung steril yang telah diberi nomor 1-8 pada masing-masing tabungnya.
2. Kemudian memberikan 1 ml aquades steril pada tabung nomor 2-6.
3. Berikutnya, menambahkan 1 ml ekstrak daun pacar air *Impatiens balsamina* pada tabung nomor 1 dan nomor 2, sehingga tabung nomor 1 berisikan ekstrak daun pacar air *Impatiens balsamina* dengan konsentrasi 100% dan tabung nomor 2 dengan konsentrasi 50%.
4. Tahap berikutnya dilakukan pengenceran secara serial dari tabung nomor 2 sampai tabung nomor 6. Cara yang digunakan dengan mengocok tabung nomor 2 sampai homogen, setelah itu memindahkan 1 ml ekstrak daun pacar air *Impatiens balsamina* dari tabung nomor 2 ke tabung nomor 3 dan dicampur hingga homogen pula. Sedangkan 1 ml dari tabung nomor 3 diberikan pada tabung nomor 4 begitu seterusnya dengan cara yang sama hingga tabung nomor 6. Jadi

- konsentrasi akhir ekstrak daun pacar air *Impatiens balsamina* setelah ditambahkan jamur uji menjadi: tabung nomor 1: 100%; tabung nomor 2: 50%; tabung nomor 3: 25%; tabung nomor 4: 12.5%; tabung nomor 5: 6,25%; tabung nomor 6: 3,125%.
5. Tabung nomor 7 hanya diisi ekstrak daun pacar air *Impatiens balsamina* sebagai kontrol negatif.
 6. Proses selanjutnya adalah menambahkan masing-masing 1 ml suspensi *Candida albicans* dengan konsentrasi 10^6 CFU/ml pada tabung nomor 1-6 dan tabung nomor 8 sebagai kontrol pertumbuhan kuman atau kontrol positif.
 7. Setelah itu tabung-tabung tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam.
 8. Mengamati ada tidaknya pertumbuhan *Candida albicans* dengan melihat kejernihan tabung berisi suspensi uji.
 9. Isi seluruh tabung selanjutnya digoreskan pada media *Sabouraud Dextrosa Agar* (SDA) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam.
 10. Mengamati pertumbuhan koloni *Candida albicans* pada masing-masing konsentrasi, kemudian menetapkan *range* konsentrasi antara konsentrasi yang tidak ditumbuhi jamur dengan konsentrasi dibawahnya yang tampak pertumbuhan koloni *Candida albicans* untuk dilakukan penelitian berikutnya sehingga mendapat hasil KHM dan KBM secara tepat.

4.8.4.2 Penelitian Lanjutan

1. Siapkan dan beri label 8 tabung reaksi steril yaitu; konsentrasi 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, kontrol positif dan kontrol negatif.
2. Untuk membuat konsentrasi 50% perhitungan yang digunakan:

$$100\% \cdot x = 8\text{ml} \cdot 50\%$$

$$x = 4\text{ml}$$

dari perhitungan diatas, mencampurkan 4ml dari konsentrasi 100% dengan 4ml aquades untuk menghasilkan 8ml dari campuran konsentrasi 50%.Kemudian beri label 50%.

3. Selanjutnya, membuat konsentrasi 25%, 30%, 35%, 40%, 45% menggunakan penghitungan:

$$50\%. X_{ml} = 1 \cdot X_{\%}$$

- a) Tabung 1 = 25% konsentrasi ekstrak

Mencampurkan 0.5 ml dari larutan konsentrasi 50% dengan 0.5 ml aquades untuk menghasilkan larutan dengan konsentrasi 25%.

- b) Tabung 2 = 30% konsentrasi ekstrak

Mencampurkan 0.6 ml dari larutan konsentrasi 50% dengan 0.4 ml aquades untuk menghasilkan larutan dengan konsentrasi 30%.

- c) Tabung 3 = 35% konsentrasi ekstrak

Mencampurkan 0.7 ml dari larutan konsentrasi 50% dengan 0.3 ml aquades untuk menghasilkan larutan dengan konsentrasi 35%.

- d) Tabung 4 = 40% konsentrasi ekstrak

Mencampurkan 0.8 ml dari larutan konsentrasi 50% dengan 0.2 ml aquades untuk menghasilkan larutan dengan konsentrasi 40%.

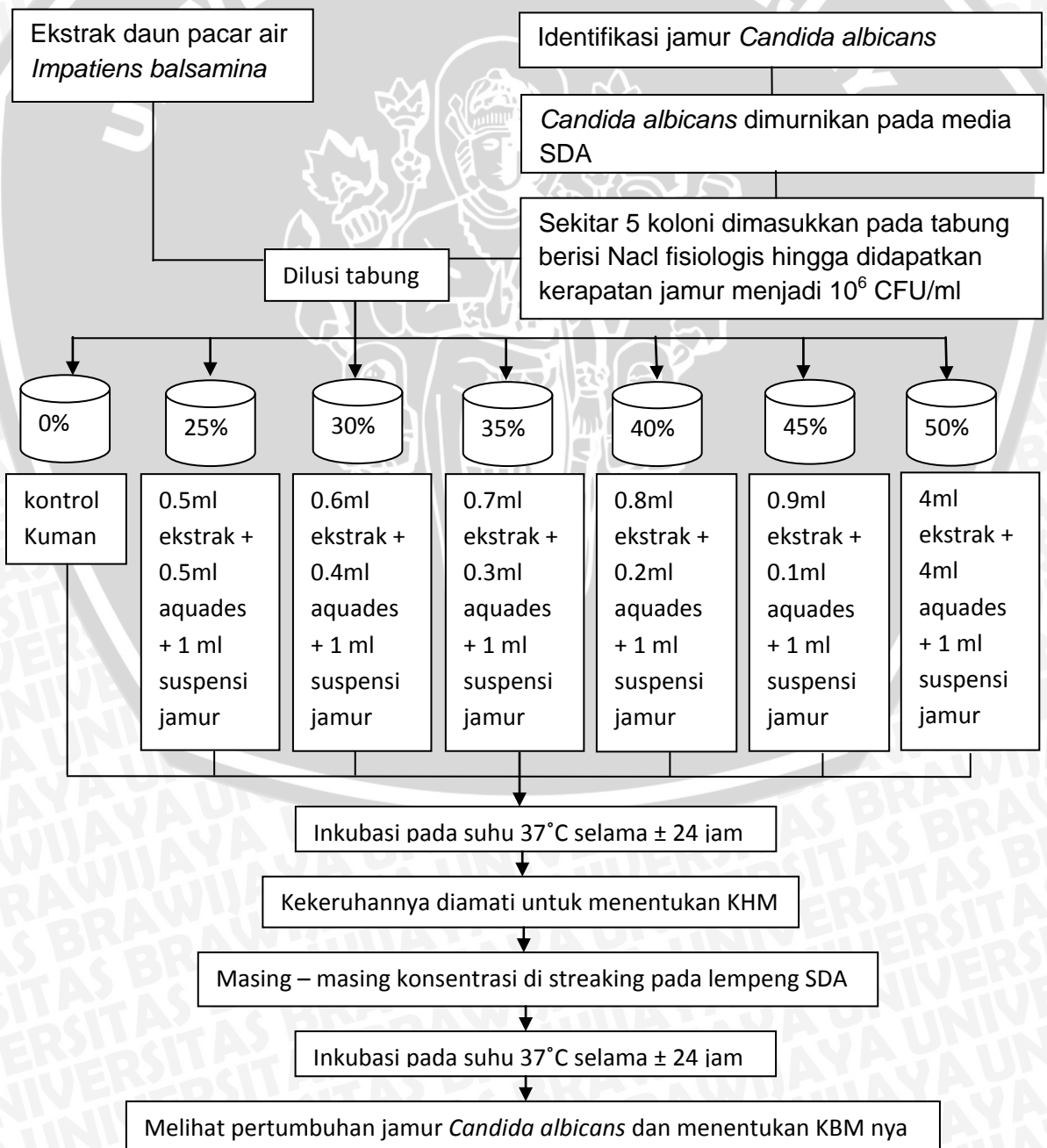
- e) Tabung 5 = 45% konsentrasi ekstrak

Mencampurkan 0.9 ml dari larutan konsentrasi 50% dengan 0.1 ml aquades untuk menghasilkan larutan dengan konsentrasi 45%.

4. Kemudian, masukkan 1ml of 10^6 CFU/ml *Candida albicans* kedalam tabung 1, 2, 3, 4 dan 5.
5. Masukkan 2ml dari *Candida albicans* 10^6 CFU/ml sebagai kontrol kuman atau kontrol positif.
6. Masukkan 2ml ekstrak daun pacar air *Impatiens balsamina* sebagai kontrol negatif.
7. Inkubasi semua tabung pada suhu 37°C selama 18-24 jam.

8. Setelah diinkubasi, amati kekeruhan pada tiap tabung untuk menentukan Kadar Hambat Minimal (KHM).
9. Goreskan isi masing-masing konsentrasi pada media *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA).
10. Inkubasi SDA pada suhu 37°C selama 18-24 jam.
11. Setelah inkubasi, mengamati dan menghitung jumlah koloni pada SDA menggunakan *colony counter* untuk menentukan Kadar Bunuh Minimal (KBM).

4.8 Alur Kerja



4.10 Analisa Data

Dari data yang diperoleh, dibuat grafik yang akan menggambarkan adanya hubungan antara ekstrak daun pacar air *Impatiens balsamina* dalam berbagai konsentrasi. Dengan adanya data jumlah koloni pada perlakuan berbagai konsentrasi ekstrak daun pacar air *Impatiens balsamina*, maka penelitian ini dapat dibahas secara analitik dengan menggunakan uji *one-way ANOVA (Analysis of Variance)*, analisa *Post Hoc Test (Tukey Test)*, analisa regresi linier, dan uji korelasi Spearman. Analisis tersebut menggunakan *software SPSS release 15*, dengan derajat kepercayaan 95%, ($\alpha=0,05$). Bermakna bila $p < 0,05$.

