

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Pada penelitian ini, digunakan metode *true experimental design* dengan *post test only control group design*. Pada penelitian ini dilakukan uji laboratorium *in vitro* untuk mengetahui efek ekstrak etanol daun anting-anting (*Acalypha indica*) sebagai antifungi pada jamur *Candida albicans*. Uji laboratorium yang digunakan adalah dengan menggunakan metode Rancang Acak Lengkap dengan uji dilusi tabung. Metode dilusi tabung ini, meliputi 2 tahap, yaitu tahap pengujian bahan pada media *broth* (*Mueller Hinton Broth*) yang digunakan untuk menentukan Kadar Hambat Minimal (KHM), kemudian dilanjutkan dengan tahap *streaking* pada media SDA (*Saboraud Dextrose Agar*) untuk menentukan Kadar Bunuh Minimum (KBM) dari ekstrak etanol daun anting-anting tersebut dalam kaitannya dengan penghambatan pertumbuhan koloni *Candida albicans*.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya pada tahun 2013

4.3 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah daun anting-anting (*Acalypha indica*) yang diambil dari UPT Balai Materia Medica Dinas Kesehatan,

Batu dan sampel koloni fungi *Candida albicans* yang diambil dari *stock culture* milik Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.4 Penentuan jumlah pengulangan

Banyaknya jumlah pengulangan yang diperlukan untuk penelitian ini dapat dihitung dengan menggunakan rumus Federer (Ariyani dkk, 2007):

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

Keterangan :

t = jumlah kelompok perlakuan

n = besar sampel

Karena penelitian ini menggunakan 6 kelompok perlakuan, 5 konsentrasi dari ekstrak etanol daun anting-anting dan satu kontrol fungsi. ($t = 5+1 = 6$), maka:

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

$$6n - 6 \geq 15$$

$$6n \geq 15 + 6$$

$$n \geq 3,5$$

$$n \sim 4$$

Dari perhitungan di atas, diperoleh setiap kelompok perlakuan minimal harus memiliki 4 sampel, sehingga pada penelitian ini, akan digunakan 4 kali pengulangan pada masing-masing kelompok perlakuan

4.5 Variabel Penelitian

4.5.1 Variabel bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak ethanol daun anting-anting dengan konsentrasi tertentu yang diperoleh melalui uji pendahuluan

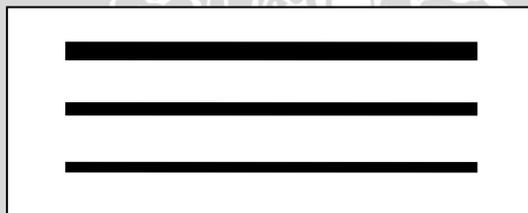
4.5.2 Variabel tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah pertumbuhan koloni *Candida albicans* yaitu dengan melihat kekeruhan pada tabung *broth* untuk menentukan KHM dan jumlah koloni *Candida albicans* pada media agar padat (SDA) untuk menentukan KBM.

4.6 Definisi Operasional

- a. Daun anting-anting (*Acalypha indica*) yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari UPT Dinas Kesehatan, Balai Materia Medica Batu.
- b. Ekstrak daun anting-anting adalah kadar atau konsentrasi daun anting-anting yang dilakukan ekstraksi dingin (maserasi) dengan menggunakan etanol 96%. Menghasilkan ekstrak daun anting-anting (*Acalypha indica*) dengan konsentrasi 100 % sebanyak 10 ml.
- c. Fungi *Candida albicans* yang digunakan pada penelitian ini adalah koloni fungi yang diambil dari *stock culture* Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
- d. Uji efektivitas adalah uji untuk menentukan efektif tidaknya ekstrak etanol daun anting-anting (*Acalypha indica*) sebagai antifungi terhadap *Candida albicans* melalui hasil KHM (Kadar Hambat Minimum) dan KBM (Kadar Bunuh Minimum).
- e. KHM (Kadar Hambat Minimum) adalah kadar atau konsentrasi minimal larutan ekstrak etanol kulit daun anting-anting yang mampu menghambat pertumbuhan fungi *Candida albicans*.

- f. KBM (Kadar Bunuh Minimum) adalah konsentrasi minimal larutan ekstrak etanol daun anting-anting yang mampu membunuh fungsi pada SDA atau dengan jumlah koloni fungsi $< 0,1\%$ *original inoculum*.
- g. Kontrol fungsi (tabung dengan fungsi tanpa larutan ekstrak etanol daun anting-anting).
- h. Pengamatan kualitatif digunakan untuk menentukan skor pertumbuhan *Candida albicans* berdasarkan bayangan tiga garis hitam yang tampak di balik tabung. Kriteria skoring adalah sebagai berikut:
- 0 : jernih (ketiga garis nampak jelas)
 - 1 : agak keruh (garis pertama dan kedua tampak, garis ketiga tidak tampak)
 - 2 : keruh (garis pertama tampak, garis kedua dan ketiga tidak tampak)
 - 3 : sangat keruh (ketiga garis tidak tampak)



Semakin rendah skor, menunjukkan semakin efektifnya bahan coba.

- i. Pengamatan kuantitatif digunakan untuk menentukan pertumbuhan fungsi *Candida albicans* secara kuantitatif dengan cara menghitung jumlah koloni pada SDA.

4.7 Alat dan Bahan

4.7.1 Ekstraksi

Alat yang digunakan untuk melakukan ekstraksi adalah kertas saring, gelas ekstraksi, neraca analitik, oven, *shaker* dan perangkat evaporator vakum, yang terdiri dari alat pemanas air, labu penampung hasil evaporator, *rotary evaporator*, tabung pendingin, alat pompa sirkulasi air dingin, bak penampung air dingin, pipa plastik, pompa vakum, tabung penampung etanol, batu didih, dan cawan penguap.

Dan bahan yang digunakan adalah daun segar anting-anting, ethanol 96%, dan aquades.

4.7.2 Uji Dilusi

Alat yang digunakan untuk melakukan uji dilusi penelitian adalah cawan petri, ose, tabung reaksi, labu erlenmeyer, termometer, inkubator, gelas obyek, *cover glass*, bunsen, korek api, spidol permanen, pipet steril 0,1 ml dan 10 ml, mikroskop, penggaris, neraca analitik, *colony counter*, autoklaf, aluminium foil, sarung tangan, masker.

Dan bahan yang digunakan adalah ekstrak daun anting-anting, fungi isolat *Candida albicans*, nutrient broth, nutrient agar plate, aquades, *Gram staining kit* (kristal violet, lugol, alkohol 96%, dan safranin), minyak emersi, H_2O_2 3%, serum plasma mamalia (uji *Germ tube*), NaCl

4.8 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian meliputi pembuatan ekstrak etanol daun anting-anting, identifikasi fungi uji (*Candida albicans*), persiapan suspensi uji *Candida*

albicans, uji efektivitas antifungi ekstrak etanol daun anting-anting dan uji penentuan KHM dan KBM ekstrak.

4.8.1 Pembuatan Ekstrak Etanol Daun anting-anting

Proses persiapan, dimulai dengan mencuci daun segar anting-anting sampai bersih, kemudian dikeringanginkan, dan dipotong kecil-kecil. Selanjutnya, dimasukkan oven dengan suhu 30-37° C selama 60 menit. Terakhir, sampel diblender, hingga didapat serbuk halus.

Proses ekstraksi, diawali dengan menimbang 100 gram sampel serbuk daun anting-anting. Kemudian, sampel tersebut dimasukkan ke dalam gelas erlenmeyer ukuran 1 liter. Kemudian masukkan 300 ml etanol 96%, dan dikocok dengan shaker kecepatan 150 rpm selama 5 jam. Selanjutnya, direndam selama 24 jam hingga mengendap. Kemudian disaring, dan ampas yang didapat diperlakukan mengulang dari point c, hingga 4 kali perlakuan sampai didapatkan filtrat yang pucat.

Proses Evaporasi, diambil lapisan atas campuran etanol 96% dengan zat aktif daun anting-anting yang sudah terlarut, lalu dimasukkan dalam labu evaporasi 1 liter. Labu evaporasi dipasang pada evaporator, dan *Water bath* diisi dengan air sampai penuh. Semua rangkaian alat dipasang, termasuk *rotary evaporator*, pemanas *water bath* (diatur sampai suhu 90°C, sesuai dengan titik didih etanol), lalu disambungkan dengan aliran listrik. Larutan etanol 96% dibiarkan memisah dengan zat aktif yang sudah ada dalam labu. Ditunggu sampai aliran etanol 96% berhenti menetes pada labu penampung ($\pm 1,5$ sampai 2 jam untuk 1 labu). Hasil evaporasi dimasukkan oven dengan suhu sekitar 80° C selama 2 jam untuk menguapkan ethanol yang tersisa. Ekstrak kemudian

ditimbang dengan neraca analitik. Hasil ekstraksi dimasukkan dalam botol plastik dan disimpan dalam freezer.

4.8.2 Identifikasi *Candida albicans*

Untuk meyakinkan bahwa yang digunakan adalah benar-benar fungi *Candida albicans* maka dilakukan uji identifikasi berikut. Dengan dua uji berikut, sudah cukup untuk meyakinkan penggunaan *Candida albicans*

4.8.2.1 Pewarnaan Gram

Ose dipanaskan hingga membara, untuk menghilangkan lemak dan dibiarkan dingin. Sediaan fungi diambil dengan ose, diratakan pada obyek gelas. Untuk sediaan padat, perlu pengencer aquades, untuk sediaan cair, tidak perlu. Kemudian, obyek gelas dikeringkan di udara terbuka. Kemudian dilakukan fiksasi dengan cara melewatkan sediaan di atas api sebanyak 3 kali. Selanjutnya, sediaan pada gelas objek ditetesi dengan kristal violet sebagai pewarna utama, selama 1 menit. Sisa kristal violet dibuang dan dibilas dengan air. Kemudian, sediaan ditetesi dengan lugol sebagai penguat warna selama 1 menit. Sisa lugol dibuang dan dibilas dengan air. Kemudian, sediaan ditetesi dengan alkohol 96% sebagai peluntur, selama 5-10 detik atau sampai warna cat luntur. Sisa alkohol dibuang dan dibilas dengan air. Sediaan ditetesi safranin sebagai *counterstaining*, selama ½ menit. Sisa safranin dibuang dan dibilas dengan air. Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap. Kemudian, sediaan dilihat di bawah mikroskop dengan lensa objektif perbesaran 1000x. Hasil positif : *Candida albicans* tercatat ungu (Gram positif), dan dicari bentuk *budding*.

4.8.2.2 Uji *Germinating Tube*

Sampel fungi diambil dengan ose yang sudah dibakar hingga membara, dan dimasukkan ke tabung yang berisi serum mamalia 0,5 ml. Kemudian, diinkubasikan pada 37°C selama \pm 4 jam. Kultur di dalam serum diambil menggunakan ose dan diletakkan pada gelas objek, lalu ditutup dengan gelas penutup. Diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran lensa objektif 40x. Dicari bentukan *pseudohifa* memanjang khas *Candida albicans*

4.8.3 Persiapan Suspensi Uji *Candida albicans*

Pertama, menyiapkan koloni *candida albican* dari medium pembiakan. Kemudian, diambil beberapa koloni *Candida albicans* dan dimasukkan ke larutan NaCl 0.9%. Bandingkan kekeruhan larutan dengan larutan standar McFarland 0.5 secara berdampingan, dengan latar belakang garis-garis warna hitam. Bila terlalu encer, tambahkan koloni *Candida albican*, jika terlalu keruh tambahkan NaCl 0.9%, hingga kekeruhannya sesuai dengan standar 0.5 Mc farland. Sebagai standar turbiditas digunakan Barium Sulfat

4.8.4 Uji pendahuluan

Dilakukan untuk menentukan konsentrasi ekstrak daun anting-anting yang dipakai pada penelitian. Pada uji pendahuluan ini, zona hambatan pada masing-masing konsentrasi ekstrak daun anting-anting akan dibandingkan dengan zona hambatan pada kontrol bahan. Konsentrasi ekstrak daun anting-anting yang memiliki zona hambatan paling mendekati kontrol bahan akan digunakan sebagai konsentrasi acuan untuk menentukan konsentrasi yang akan digunakan pada penelitian.

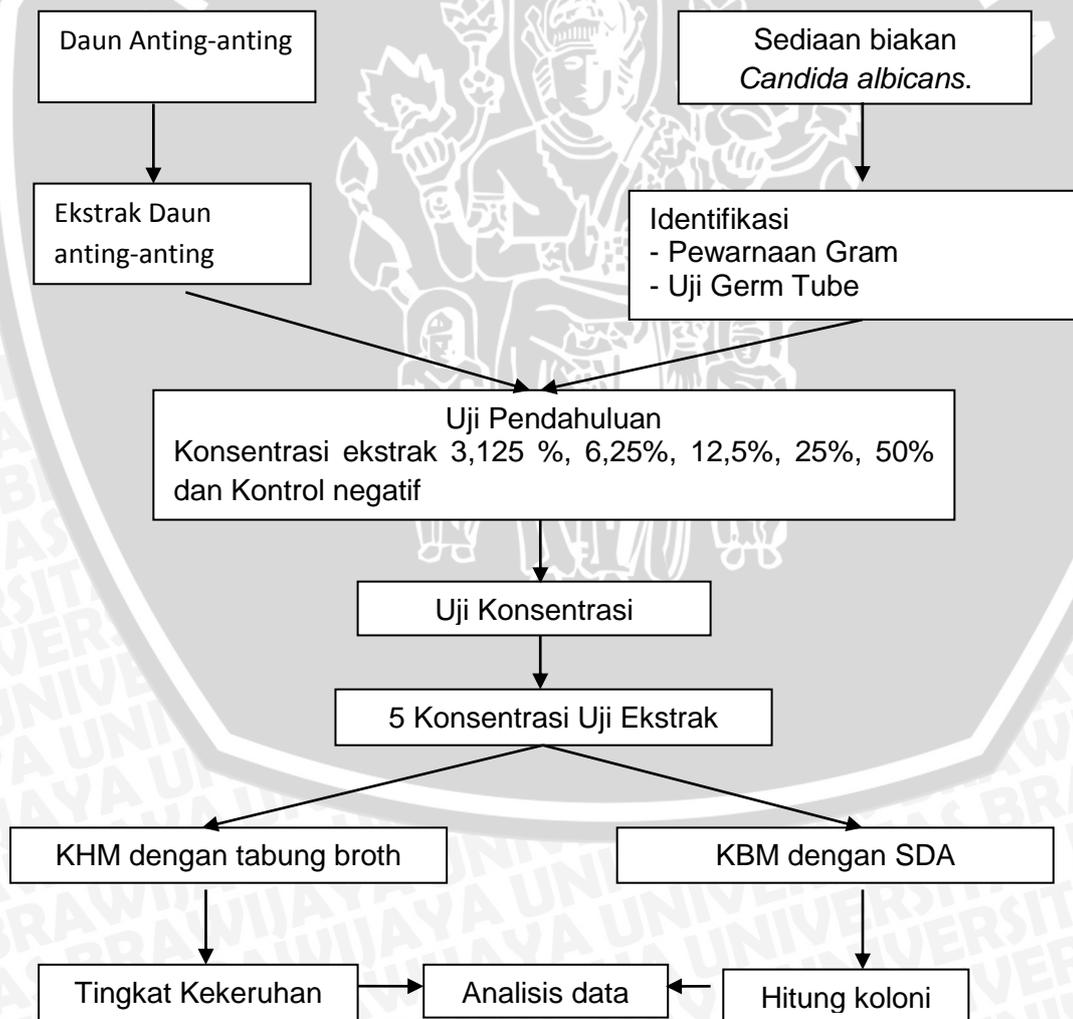
Pada uji pendahuluan ini digunakan konsentrasi 3,125%, 6,25%, 12,5%, 25%, dan 50%. Awalnya, disiapkan 6 tabung steril, beri tanda KF, 3,125 %, 6,25

%, 12,5 %, 25 %, dan 50 %. Kontrol fungsi (KF) adalah biakan fungsi *Candida albicans* tanpa penambahan ekstrak. Kemudian, dimasukkan 5 konsentrasi yang berbeda sebanyak 1 ml pada tabung 3.125 %, 6.25 %, 12.5 %, 25 %, dan 50 %. Untuk KF, dimasukkan 1 ml aquades steril. Ditambahkan 1 ml biakan cair *Candida albicans* ke dalam setiap tabung. Semua tabung diinkubasikan pada suhu 37°-37,5° C selama 18-24 jam. Setelah 18-24 jam, diperhatikan dan dicatat derajat kekeruhan pada semua tabung. Cara membaca derajat kekeruhan adalah dengan meletakkan sebuah kertas putih dibelakang tabung, dimana sebelumnya pada kertas tersebut digambar sebuah garis hitam, kemudian garis hitam tersebut diperhatikan dari depan tabung. Kemudian, dilakukan penggoresan dari seluruh tabung pada media SDA, kemudian diinkubasikan pada suhu 37°-37,5° C selama 18-24 jam. Setelah 18-24 jam hitung jumlah koloni *Candida albicans* yang tumbuh dengan *colony counter*. Dan dilakukan berulang, hingga mendapatkan konsentrasi uji yang sesuai (Tanjong, 2011)

4.8.5 Uji Efek Antifungi Ekstrak Daun anting-anting

Disiapkan 7 tabung steril, beri tanda KF, A, B, C, D, dan E. Kontrol fungsi (KF) adalah biakan fungsi *Candida albicans*. Masukkan 5 konsentrasi yang berbeda sebanyak 1 ml pada tabung A, B, C, D dan E. Untuk KF, masukkan 1 ml aquades steril ke dalam tabung. Tambahkan 1 ml biakan cair *Candida albicans* ke dalam setiap tabung. Dari tabung bertanda KF diambil 1 ose untuk diinokulasikan pada SDA (sebagai *original inoculum* (OI)). Semua tabung dan plate *original inoculum* diinkubasikan pada suhu 37°-37,5° C selama 18-24 jam. Setelah 18-24 jam, diperhatikan dan dicatat derajat kekeruhan pada semua tabung. Cara membaca derajat kekeruhan adalah dengan meletakkan sebuah

kertas putih dibelakang tabung, dimana sebelumnya pada kertas tersebut digambar sebuah garis hitam, kemudian garis hitam tersebut diperhatikan dari depan tabung. Konsentrasi paling rendah yang tidak menunjukkan kekeruhan adalah KHM. Jumlah koloni pada *original inoculum* dihitung dengan menggunakan *colony counter*. Untuk mengetahui KBM, lakukan penggoresan dari seluruh tabung pada media SDA, kemudian diinkubasikan pada suhu 37°-37,5° C selama 18-24 jam. Setelah 18-24 jam hitung jumlah koloni *Candida albicans* yang tumbuh dengan *colony counter*, konsentrasi terendah dengan jumlah koloni kurang dari 0,1% *original inoculum* adalah KBM.



Gambar 4.1 Diagram Kerja

4.9 Analisis dan Pengumpulan Data

Dari data yang diperoleh, maka dapat dibuat grafik yang menggambarkan adanya hubungan antara larutan ekstrak daun anting-anting dalam berbagai konsentrasi dengan tingkat kekeruhan larutan suspensi bakteri uji, dimana semakin tinggi konsentrasi larutan yang digunakan, maka semakin jernih larutan suspensi bakteri uji.

Jika memenuhi uji asumsi normalitas dan homogenitas, maka analisis data menggunakan uji statistik parametrik (*one way ANOVA*, *Post Hoc Tukey*, dan Korelasi *Pearson*). Jika tidak memenuhi uji asumsi, maka digunakan uji non parametrik (*Kruskal Wallis*, *Mann Whitney*, dan Korelasi *Spearman's*), pada taraf kepercayaan 95% ($\alpha < 0,05$). Uji statistik ini digunakan untuk mengetahui pengaruh pemberian berbagai macam konsentrasi larutan ekstrak daun anting-anting terhadap jumlah koloni fungi *Candida albicans*.