

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain penelitian *laboratory experimental pre test and post test* dengan menggunakan metode dilusi tabung (*tube dilution test*) untuk membuktikan efek antifungi ekstrak etanol rimpang jahe gajah (*Zingiber officinale var. Roscoe*) sebagai antifungi dalam menghambat pertumbuhan *C. albicans* secara *in vitro*. Proses ekstraksi rimpang jahe gajah (*Zingiber officinale var. Roscoe*) menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol. Metode dilusi tabung meliputi dua tahap, yaitu tahap pengujian bahan atau ekstrak untuk menentukan Kadar Hambat Minimal (KHM) dengan mengamati tingkat kekeruhan tabung. Tahap kedua dari dilusi tabung adalah tahap penanaman pada medium SDA (*Saboraud Dextrose Agar*) dengan metode penggoresan pada SDA *plate* untuk menentukan Kadar Bunuh Minimal (KBM). Besarnya konsentrasi ekstrak etanol rimpang jahe gajah yang digunakan ditetapkan melalui penelitian pendahuluan.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dengan waktu pelaksanaan penelitian pada bulan September s/d Oktober 2015.

4.3 Variabel Penelitian

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari dua macam variabel yaitu variabel bebas dan variabel tergantun.

4.3.1 Variabel Bebas (*Independent*)

Variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak etanol rimpang jahe gajah (*Zingiber officinale var. Roscoe*).

4.3.2 Variabel Tergantung (*Dependent*)

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah pertumbuhan *C. albicans* yaitu dengan melihat kekeruhan pada tabung *broth* untuk menentukan KHM dan jumlah koloni *C. albicans* pada media *Saboraud Dextrose Agar* (SDA) untuk menentukan KBM.

4.4 Sampel Penelitian

Pada penelitian ini sampel yang digunakan adalah jamur *C. albicans* swab vagina penderita kandidiasis vulvovaginitis yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4.5 Jumlah Pengulangan

Jumlah pengulangan dalam penelitian ini dihitung dengan rumus Federer

(Pratiwi dkk., 2011):

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

Keterangan:

t = jumlah kelompok perlakuan

n = jumlah sampel

Penelitian ini menggunakan 7 macam dosis yang berbeda, serta satu kontrol jamur. Maka memiliki total delapan dosis perlakuan. Jumlah sampel yang didapatkan sebagai berikut:

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

$$(8-1)(n-1) \geq 15$$

$$7(n-1) \geq 15$$

$$7n \geq 22$$

$$n \geq 3$$

Berdasarkan perhitungan di atas, maka dalam penelitian ini dilakukan 3 kali pengulangan.

4.6 Definisi Operasional

- 1) Bubuk kering rimpang jahe gajah yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari Materia Medica Batu, Malang.
- 2) Ekstrak etanol rimpang jahe gajah (*Zingiber officinale var. Roscoe*) adalah hasil ekstraksi metode maserasi bubuk kering rimpang jahe gajah sebanyak 500 gram dengan menggunakan pelarut etanol 96% yang akan menghasilkan konsentrasi 100%.

- 3) Isolat *C. albicans* yang digunakan berasal dari swab vagina penderita kandidiasis vulvovaginitis yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
- 4) Kadar Hambat Minimal (KHM) adalah kadar atau konsentrasi minimal larutan ekstrak etanol rimpang jahe gajah yang mampu menghambat pertumbuhan *C. albicans* yang ditandai dengan tidak terdapatnya kekeruhan pada larutan ekstrak etanol rimpang jahe gajah yang telah diberi fungsi uji setelah diinkubasi selama 18-24 jam.
- 5) Kadar Bunuh Minimal (KBM) adalah kadar atau konsentrasi minimal larutan ekstrak etanol rimpang jahe gajah yang mampu membunuh jamur *C. albicans* yang ditandai dengan tidak adanya pertumbuhan koloni *C. albicans* pada media padat setelah diinkubasi selama 18-24 jam dengan jumlah koloni fungi $< 0,1\%$ *original inoculum*.
- 6) *Original Inoculum* (OI) adalah inoculum jamur dengan konsentrasi 10^4 CFU/ml yang diinokulasikan pada media agar padat. OI merupakan inoculum awal dari jamur *C. albicans* yang diuji dan digunakan untuk menentukan kategori KBM.

4.7 Alat dan Bahan Penelitian

4.7.1 Untuk Pembuatan Ekstrak Etanol Rimpang Jahe Gajah

Alat: botol steril untuk menampung hasil ekstrak, oven, timbangan, gelas erlenmeyer, corong gelas, labu evaporator, labu penampung etanol, rotator evaporator, *water pump*, *water bath*, *vacum pump*.

Bahan : bubuk kering rimpang jahe gajah, etanol 96%.

4.7.2 Untuk Identifikasi *C. albicans*

Alat: mikroskop, gelas objek, gelas penutup, api bunsen, ose, minyak emersi.

Bahan: biakan murni *C. albicans*, medium SDA (*Saboraud Dextrose Agar*). Untuk pewarnaan Gram: Kristal violet, Lugol, alkohol 96%, Safranin.

4.7.3 Untuk *Tube Dilution Test*

Alat: tabung reaksi, rak tabung, mikropipet, inkubator, vortex, bunsen (lampu spiritus), korek api, SDA *plate*, kapas, *colony counter*.

Bahan: ekstrak etanol rimpang jahe gajah, pembedihan cair *C. albicans* dengan konsentrasi 10^4 CFU/ml, SDA (*Saboraud Dextrose Agar*).

4.8 Prosedur Penelitian

4.8.1 Persiapan Alat

Alat-alat yang akan digunakan dalam penelitian dipersiapkan dalam keadaan steril terlebih dahulu.

4.8.2 Persiapan Bahan

1. Rimpang jahe gajah yang sudah halus.
2. Aquades dan SDA disterilkan kemudian dimasukkan ke dalam lemari es.
3. *C. albicans* dari laboratorium mikrobiologi ditanam pada medium SDA kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam.

4.8.3 Pembuatan Bentuk Sediaan Ekstrak Etanol Rimpang Jahe Gajah dengan Metode Maserasi

4.8.3.1 Tahap Ekstraksi

- Sampel rimpang jahe gajah yang sudah halus ditimbang dengan menggunakan timbangan analitik sebanyak 500 gram.
- Sampel halus sebanyak 500 gram kemudian dimasukkan dalam labu erlenmeyer ukuran 1 liter.
- Kemudian ditambahkan etanol 96% hingga volumenya 1000 ml dan direndam.
- Dikocok sampai benar-benar tercampur (± 30 menit).
- Campuran didiamkan selama 1 malam sampai mengendap.
- Pisahkan cairan dari endapan.
- Ulangi proses perendaman sampai cairan tidak berwarna atau sampai hasil ekstraksi jernih.
- Hasil ekstraksi kemudian disaring dengan penyaring. Kemudian ekstrak tersebut siap untuk dievaporasi.

4.8.3.2 Tahap Evaporasi

- Masukkan cairan dalam labu evaporasi berukuran 1 liter.
- Labu evaporasi dipasang pada evaporator.
- *Water bath* diisi dengan air sampai penuh.
- Kemudian, semua rangkaian alat dipasang, termasuk *rotary evaporator*, pemanas *water bath* (suhu diatur sesuai dengan titik didih etanol), lalu disambungkan dengan aliran listrik.

- Larutan etanol dibiarkan sampai menguap yaitu memisah dengan zat aktif yang sudah ada dalam labu.
- Ditunggu sampai aliran etanol berhenti menetes pada labu penampung (\pm 1,5 sampai 2 jam untuk 1 labu).
- Ekstrak kemudian ditimbang dengan neraca analitik dan akan terbentuk ekstrak etanol rimpang jahe gajah. Kemudian, dimasukkan dalam botol plastik atau kaca dan disimpan dalam *refrigerator*.
- Hasil evaporasi ini merupakan stok ekstrak etanol rimpang jahe gajah dengan konsentrasi 100% yang akan digunakan sebagai bahan penelitian.

4.8.4 Identifikasi *C. albicans*

Sebelum digunakan untuk pengujian, jamur *C. albicans* yang diperoleh diidentifikasi ulang. Identifikasi *C. albicans* dapat dilakukan dengan beberapa cara yakni identifikasi koloni pada media SDA (*Saboroud Dextrose Agar*), pewarnaan Gram, dan *germinating tube test*.

4.8.4.1 Identifikasi Koloni pada SDA (*Saboroud Dextrose Agar*)

Isolat jamur dari laboratorium mikrobiologi diambil satu koloni dengan menggunakan ose. Kemudian dibiakkan pada media SDA (*Sabouraud Dextrose Agar*) sedemikian hingga dihasilkan koloni terpisah dan diinkubasi selama 18-24 jam. Setelah itu diamati karakteristik koloni jamur.

4.8.4.2 Pewarnaan Gram

- Gelas objek dibersihkan dengan kapas steril, kemudian dilewatkan di atas api untuk menghilangkan lemak dan dibiarkan dingin.
- Satu ose aquades steril diletakkan pada gelas objek.
- Dengan ose yang sudah steril dengan pembakaran, ambillah satu ose koloni *C. albicans* yang tumbuh pada media padat (SDA). Suspensikan dengan satu tetes aquades steril yang sudah ditetaskan terlebih dahulu pada gelas objek. Hapusan sebaiknya dibuat tipis.
- Sediaan dikeringkan di udara, kemudian difiksasi dengan memberikan pemanasan di atas api secukupnya, sediaan siap untuk diwarnai.
- Sediaan ditetesi dengan Kristal violet, lalu didiamkan selama satu menit, kemudian buang sisanya dan bilas dengan air mengalir.
- Sediaan ditetesi dengan larutan Lugol, lalu diamkan selama satu menit, kemudian buang sisa Lugol dan bilas dengan air mengalir.
- Sediaan ditetesi dengan alkohol 96% selama 10 detik atau sampai warna cat luntur, kemudian buang sisa alkohol dan bilas dengan air mengalir.
- Sediaan ditetesi dengan Safranin, lalu didiamkan selama 30 detik, kemudian buang sisa Safranin dan bilas dengan air mengalir.
- Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap untuk mengeringkan permukaan sediaan.
- Dilakukan pengamatan pada sediaan di bawah mikroskop dengan menggunakan lensa objektif yang pembesarannya 100 kali.
- Hasil positif bila ditemukan bentukan *budding cells* yang tercat ungu (bersifat Gram positif) dan sel berbentuk oval.

4.8.4.3 Tes Germinating Tube

Tahapan dari germinating tube test adalah sebagai berikut.

- Sediakan serum mamalia didalam tabung
- *C. albicans* yang telah dibiakkan pada media SDA (*Sabouraud Dextrose Agar*) diambil dengan menggunakan ose yang sudah disterilkan dengan cara pembakaran dan masukkan ke dalam tabung reaksi yang telah berisi serum mamalia 0,5 ml.
- Diinkubasi pada suhu 37°C selama ± 4 jam.
- Kultur yang terdapat didalam serum tersebut diambil dengan ose dan diletakkan pada gelas objek kemudian ditutup dengan penutupnya.
- Diamati dibawah mikroskop dengan pembesaran 400 kali dan dicari bentukan pseudohifa memanjang khas jamur *C. albicans* yaitu pemanjangan sel jamur.

4.8.5 Persiapan Suspensi Uji *C. albicans*

Cara persiapan suspensi uji jamur, dengan perhitungan jumlah koloni menggunakan spektrofotometer. *Optical Dencity* (OD) = 0,1 disebutkan setara dengan standar McFarland 0,5. Standar McFarland 0,5 setara dengan uji konsentrasi jamur sebesar 1×10^6 CFU/ml.

Dengan demikian, persiapan suspensi uji *C. albicans* dapat dilakukan sebagai berikut:

- 1) Disediakan jamur *C. albicans* dari SDA yang telah diuji konfirmasi.
- 2) Diambil 5 koloni (diameter ≥ 1 mm) dengan ose kemudian dimasukkan ke dalam 5 ml NaCl 0,85% steril. Kemudian diukur OD (*Optical Dencity*) atau kepadatan optisnya dengan spektrofotometer pada $\lambda = 530$ nm. Dari hasil

yang diperoleh dibuat suspensi yang mengandung 1×10^6 CFU/ml (sesuai standar McFarland 0,5) yang setara dengan OD=0,1 dilakukan perhitungan sebagai berikut:

$$N1 \times V1 = N2 \times V2$$

Keterangan:

- N1 : Hasil spektrofotometri
- V1 : Volume jamur yang akan ditambah pengencer
- N2 : OD (0,1 setara dengan 10^6 CFU/ml)
- V2 : Volume suspensi jamur uji (10 ml)

- 3) Untuk mendapatkan suspensi jamur dengan konsentrasi 10^4 CFU/ml, yaitu 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 dengan kepadatan 10^5 CFU/ml. Dilanjutkan lagi dengan mengambil 1 ml lagi (dari tabung yang mengandung 10^5 CFU/ml) untuk dicampur dengan 9 ml *Saboraud Dextrose Broth* sehingga didapatkan suspensi dengan kepadatan jamur 10^4 CFU/ml (Murray *et al.*, 1999).

4.8.6 Prosedur Uji Antifungi

Besarnya konsentrasi ekstrak etanol rimpang jahe gajah yang digunakan adalah 12,5%; 15%; 17,5%, 20%; 22,5%; 25%; 27,5% dan 0% (kontrol jamur).

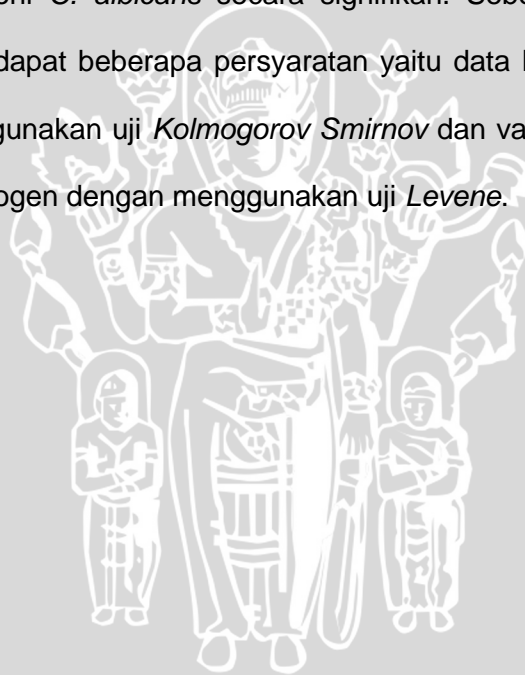
Langkah-langkah dalam menyiapkan dosis konsentrasi bahan uji sebagai berikut.

- Menyediakan 8 tabung reaksi steril untuk masing-masing perlakuan diberi tanda KJ=0% (kontrol jamur); 12,5%; 15%; 17,5%, 20%; 22,5%; 25%; dan 27,5%.
- Membuat konsentrasi 50% ekstrak jahe gajah sebanyak 4 ml (dengan memasukkan 2 ml ekstrak etanol rimpang jahe gajah 100% dan 2 ml aquades).
- Memasukkan 0,25 ml ekstrak jahe gajah 50% ke dalam tabung bertanda 12,5%, lalu tambahkan 0,75 ml aquades steril.
- Memasukkan 0,3 ml ekstrak jahe gajah 50% ke dalam tabung bertanda 15%, lalu tambahkan 0,7 ml aquades steril.
- Memasukkan 0,35 ml ekstrak jahe gajah 50% ke dalam tabung bertanda 17,5%, lalu tambahkan 0,65 ml aquades steril.
- Memasukkan 0,4 ml ekstrak jahe gajah 50% ke dalam tabung bertanda 20%, lalu tambahkan 0,6 ml aquades steril.
- Memasukkan 0,45 ml ekstrak jahe gajah 50% ke dalam tabung bertanda 22,5%, lalu tambahkan 0,55 ml aquades steril.
- Memasukkan 0,5 ml ekstrak jahe gajah 50% ke dalam tabung bertanda 25%, lalu tambahkan 0,5 ml aquades steril.
- Memasukkan 0,55 ml ekstrak jahe gajah 50% ke dalam tabung bertanda 27,5%, lalu tambahkan 0,45 ml aquades steril.

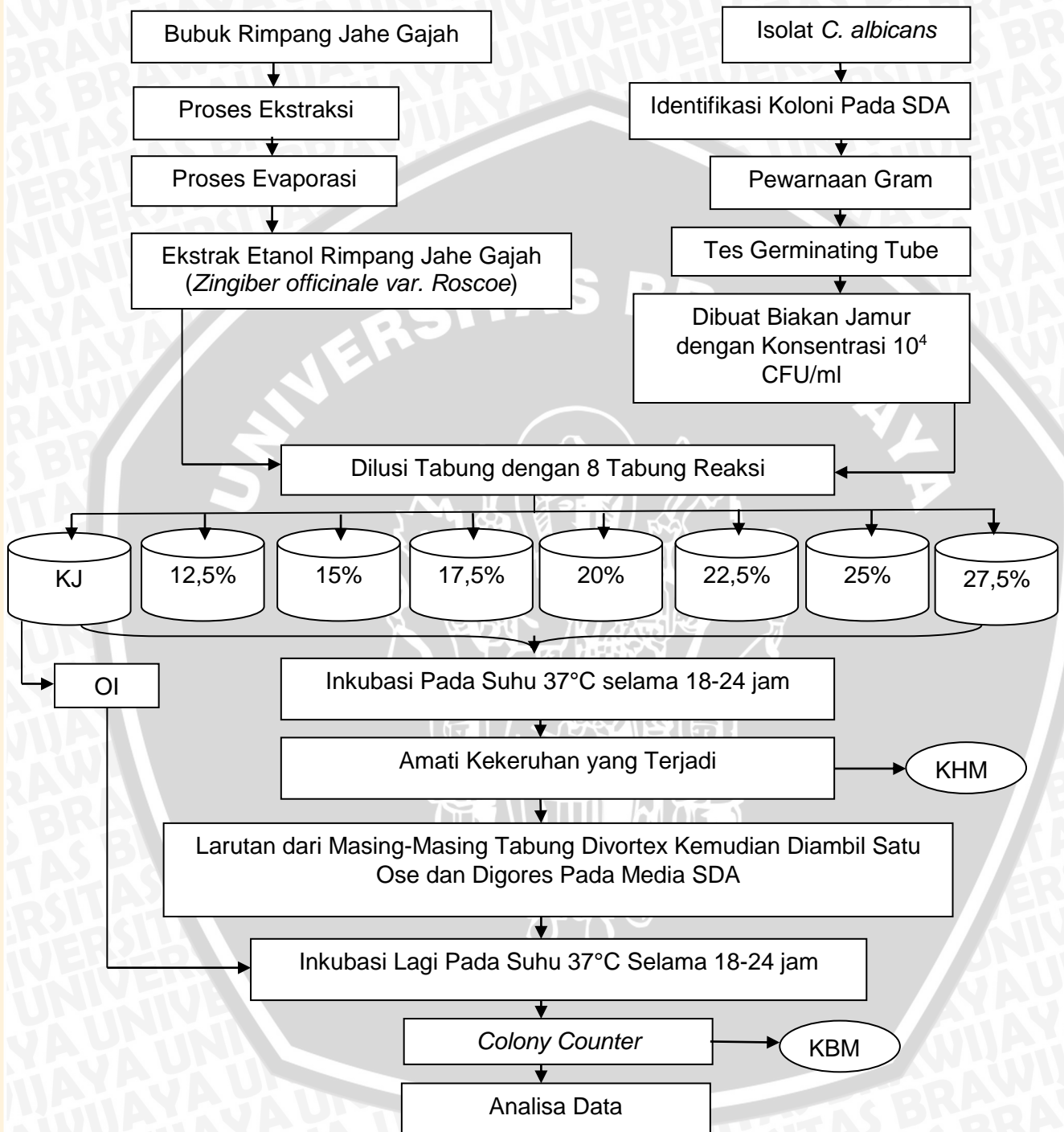
- Dimasukkan suspensi cair *C. albicans* dengan konsentrasi 10^4 CFU/ml pada tabung yang bertanda 12,5%; 15%; 17,5%, 20%; 22,5%; 25%; dan 27,5% masing-masing 1 ml.
- Kontrol jamur didapatkan dari suspensi *C. albicans* dengan konsentrasi 10^4 CFU/ml sebanyak 2 ml dimasukkan ke dalam tabung KJ.
- Dari tabung KJ diambil larutan sebanyak 1 ose kemudian dilakukan penggoresan pada SDA untuk membuat *original inoculum*, kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C selama 18-24 jam.
- Semua tabung divortex dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 18-24 jam
- Setelah 18-24 jam atau dihari kedua semua tabung dikeluarkan dari inkubator. Diperhatikan dan dicatat derajat kekeruhan pada semua tabung. Cara membaca derajat kekeruhan adalah dengan meletakkan sebuah kertas putih di belakang 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.
- Lalu untuk menentukan KBM, ambil larutan sebanyak 1 ose dari masing-masing tabung dilusi, kemudian dilakukan penggoresan pada delapan SDA *plate*. Masing-masing SDA *plate*, kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C selama 18-24 jam.
- Setelah diinkubasi 18-24 jam, jumlah koloni yang tumbuh pada SDA dihitung dengan *colony counter*, konsentrasi yang tidak terdapat pertumbuhan jamur adalah KBM. Skema prosedur penelitian dapat dilihat pada Gambar 4.1.

4.9 Analisis Data

Analisis statistik yang digunakan dalam penelitian ini adalah *One Way ANOVA* pada taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$). Uji ANOVA satu arah berfungsi untuk mengetahui signifikansi hasil perhitungan jumlah hambatan koloni *C. albicans* terhadap konsentrasi ekstrak etanol rimpang jahe gajah (*Zingiber officinale var. Roscoe*). Melalui uji ANOVA yang dilakukan terhadap ketujuh kelompok konsentrasi, maka dapat dilihat apakah pemberian ekstrak etanol rimpang jahe gajah (*Zingiber officinale var. Roscoe*) menyebabkan penambahan jumlah hambatan koloni *C. albicans* secara signifikan. 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*.



4.10 Diagram Alur Penelitian



Gambar 4.1 Skema Alur Penelitian

Keterangan:
 OI : Original Inoculum
 KHM : Kadar Hambat Minimal
 KBM : Kadar Bunuh Minimal

