

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Dalam penelitian ini menggunakan desain penelitian eksperimental laboratorik dengan metode tes difusi lubang/sumuran. Tes difusi lubang/sumuran dilakukan untuk mengetahui efek antifungal ekstrak daun nilam (*Pogostemon cablin*) terhadap pertumbuhan jamur *Candida albicans* secara *in vitro*. Prosedur ini dikerjakan dengan membuat lubang pada agar padar yang telah dicampur jamur. Jumlah dan letak lubang disesuaikan dengan tujuan penelitian, kemudian lubang diisi dengan larutan yang akan diuji. Setelah diinkubasi, pertumbuhan jamur yang diamati untuk melihat ada tidaknya daerah hambatan disekeliling lubang. Daya antifungal yang terbentuk ditentukan dengan mengukur diameter zona hambat pertumbuhan menggunakan jangka sorong dalam satuan milimeter.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Pembuatan ekstrak daun nilam dilakukan di Laboratorium Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Sedangkan penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada bulan Juli hingga September 2016.

4.3 Sampel Penelitian

Bahan sampel yang digunakan adalah daun nilam dari Lab. Materia Medica Batu. Sedangkan jamur *Candida albicans* yang digunakan diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.



4.4 Variabel Penelitian

- 1) Variabel bebas penelitian ini adalah ekstrak daun nilam (*Pogostemon cablin*) dengan konsentrasi 25%, 37,5%, 50%, 62,5%, 75%, 87,5%, dan 100%.
- 2) Variabel terikat penelitian ini adalah jumlah koloni jamur *Candida albicans*.

4.5 Jumlah Sampel dan Estimasi Jumlah Pengulangan

Pada penelitian ini digunakan tujuh dosis perlakuan yang berbeda.

Jumlah pengulangan dalam penelitian ini dihitung dengan rumus:

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

Sehingga jumlah pengulangan dapat dihitung sebagai berikut:

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

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

$$7n - 7 \geq 15$$

$$7n \geq 22$$

$$n \geq 3,143$$

Keterangan:

n = jumlah pengulangan

p = jumlah perlakuan(konsentrasi ekstrak etanol Daun Nilam).

4.6 Definisi Operasional

- 1) Daun nilam yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun dari tanaman nilam yang ditanam di Laboratorium Materia Medica Batu yang sudah dikeringkan
- 2) Ekstrak etanol daun nilam yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari Laboratorium Farmasi FKUB. Proses ekstraksi menggunakan cara maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 96%
- 3) Isolat jamur *Candida albicans* yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi FKUB.

4.7 Pengukuran Pertumbuhan Koloni *Candida albicans*

Untuk mengukur daya hambat pertumbuhan jamur *Candida albicans*, dilakukan penghitungan pada diameter zona hambat ekstrak terhadap pertumbuhan *Candida albicans*.

4.8 Alat dan Bahan Penelitian

4.8.1 Identifikasi Jamur *Candida albicans*

Alat: ose lurus, ose lengkung, kertas penghisap, minyak emersi, mikroskop, tabung reaksi, lampu spiritus dan oksidase detektor trips

Bahan: isolat *Candida albicans*, pewarnaan gram (kristal violet, lugol, alkohol 96%, safranin), nutrient broth, medium Mc Conkey Agar, TSI Agar dan bahan tes IMVIC-MU

4.8.2 Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Nilam

Alat: oven, timbangan, gelas Erlenmeyer, corong gelas kertas saring, labu evaporator, labu penampung etanol, evaporator, pendingin spiral, selang *Water pulp*, *Water pulp* dan *Water Bath*, *Vacum pulp*, *Grinder*, *Shaker*, aluminium foil dan kulkas

Bahan: daun Nilam (*Pogostemon cablin*), Etanol, akuades dan botol hasil ekstrak.

4.8.3 Uji Difusi Lubang/Sumuran

Alat: *plate* kosong dan steril, pelubang sumuran, mikropipet steril, ose, bunsen, korek api, inkubator, jangka sorong

Bahan: ekstrak etanoldaun nilam, suspensi jamur, aquades, medium agar

4.9 Prosedur Penelitian

4.9.1 Identifikasi *Candida albicans*

4.9.1.1 Pewarnaan Gram

- 1) Bersihkan gelas obyek dengan kapas dan lewatkan diatas api untuk menghilangkan lemak. Kemudian biarkan dingin.
- 2) Buat sediaan jamur diatas gelas objek dengan ketebalan yang cukup dan biarkan kering di udara. Kemudian difiksasi di atas lampu busen.
- 3) Sediaan dituangi dengan Kristal Violet. Setelah 1 menit, sediaan dibilas dengan air.
- 4) Kemudian sediaan dituangi dengan Lugol. Setelah 1 menit, sediaan dibilas dengan air.

- 5) Kemudian sediaan dituangi dengan alkohol 96%. Setelah 5-10 detik, sediaan dibilas dengan air
- 6) Kemudian sediaan dituangi dengan Safranin. Setelah 30 detik, sediaan dibilas dengan air
- 7) Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap, ditetesi minyak emersi selanjutnya dilihat dibawah mikroskop dengan objektif pembesaran 100x
- 8) Hasil positif bila ditemukan *budding cells* yang tercat ungu (bersifat gram positif) dan sel berbentuk oval.

(Dzen *et al.*, 2013)

4.9.1.2 Penanaman pada Media

- 1) Siapkan 1 buah cawan petri berisi media SDA yang sebelumnya telah didinginkan.
- 2) Ambil biakan jamur dengan ose kemudian lakukan *streaking* pada permukaan media secara merata.
- 3) Tutup cawan petri, kemudian letakkan dalam inkubator dengan suhu 37^o C untuk diinkubasi selama 24 jam.
- 4) Setelah 24 jam, lakukan pengamatan pada koloni jamur yang tumbuh
- 5) Hasil positif jika didapatkan koloni jamur yang berbentuk bundar dengan permukaan halus atau rata, berwarna kekuningan.

(Dzen *et al.*, 2013).

4.9.1.3 Germ Tube Test

- 1) Menyediakan serum mamalia di dalam tabung
- 2) *Candida albicans* yang telah dibiakkan pada media SDA (*Saboraud 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.

- 3) Diinkubasi pada suhu 37°C selama 4 jam
- 4) Kultur yang terdapat di dalam serum tersebut diambil dengan ose dan diletakkan pada gelas obyek kemudian ditutup dengan penutupnya
- 5) Dilakukan pengamatan di bawah mikroskop

4.9.2 Pembuatan Suspensi Jamur *Candida albicans*

- 1) Beberapa koloni *Candida albicans* dipindahkan ke tabung reaksi steril yang berisi *nutrient broth* dengan menggunakan ose.
- 2) Tabung reaksi lalu diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37° C selama 24-48 jam.
- 3) Untuk mendapatkan konsentrasi bakteri 10⁶ CFU/ml, lakukan perhitungan sebagai berikut:

$$N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2 \text{ (Doughari, 2006)}$$

Keterangan:

- V1 : Volume jamur yang akan ditambah pengencer
N1 : Nilai absorbansi suspensi (hasil spektrofotometri)
V2 : Volume suspensi jamur uji (10 ml)
N2 : Optical Density (0,1 = setara dengan 10⁶/ml)

Dari hasil perhitungan tersebut diperoleh volume (ml) jamur yang akan ditambah pengencer untuk mendapatkan jamur dengan konsentrasi 10⁶/ml sebanyak 10 ml.

4.9.3 Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Nilam (*Pogostemon cablin*)

4.9.3.1 Proses Pengeringan

- 1) Daun Nilam dibersihkan.

- 2) Memotong kecil-kecil
- 3) Daun Nilam yang telah dipotong kecil-kecil lalu dikeringkan dengan dioven atau dengan panas matahari sampai kering/ bebas kandungan air.

4.9.3.2 Proses Ekstraksi

- 1) Kemudian digrinder sampai halus dan jika telah halus.
- 2) Bubuk daun Nilam ditimbang dengan menggunakan timbangan sebanyak 1 kg kemudian dimasukkan dalam gelas Erlenmeyer ukuran 1 liter.
- 3) Kemudian direndam didalam campuran larutan etanol dengan volume 960ml dan akuades 240 ml yang ditutup aluminium foil setelah itu di *dishaker* dengan kecepatan 122 mot 1/min selama 1 jam 45 menit, lalu disimpan dalam kulkas.
- 4) Larutan di *dishaker* setiap hari selama 30 menit dalam waktu 1 minggu dan sampel disaring dengan kertas saring. Setelah itu dievaporasi sampai volume mencapai 1/10 volume awal.

4.9.3.3 Proses Evaporasi

- 1) Evaporator set dipasang pada tiang permanen agar dapat digantung dengan kemiringan 30 – 40 derajat terhadap meja dengan susunan dari bawah ke atas alat pemanas air, labu penampung hasil evaporasi, *rotary evaporator* dan tabung pendingin.
- 2) Kemudian tabung pendingin dihubungkan dengan pompa sirkulasi air dingin yang terhubung dengan bak penampung air dingin melalui pipa plastik. Tabung pendingin juga terhubung dengan pompa vakum dan penampung hasil penguapan.

- 3) Hasil ekstraksi dimasukkan dalam labu penampung sedangkan *rotary evaporator*, alat pompa sirkulasi air dingin dan alat pompa vakum dinyalakan.
- 4) Pemanas Akuades juga dinyalakan sehingga hasil ekstraksi dalam tabung penampung evaporasi mendidih dengan suhu 78°C (sesuai titik didih etanol) dan etanol mulai menguap.
- 5) Hasil penguapan etanol dikondensasikan menuju labu penampung etanol sehingga tidak tercampur hasil evaporasi dan uap lain tersedot pompa vakum.
- 6) Proses evaporasi dilakukan hingga volume hasil berkurang dan menjadi kental.
- 7) Setelah kental evaporasi dihentikan dan hasil evaporasi diambil.
- 8) Hasil evaporasi ditampung dalam cawan penguap kemudian di oven selama 2 jam pada suhu 78°C untuk menguapkan pelarut yang tersisa sehingga didapatkan hasil ekstrak 100% berbentuk cair sebanyak 500ml.

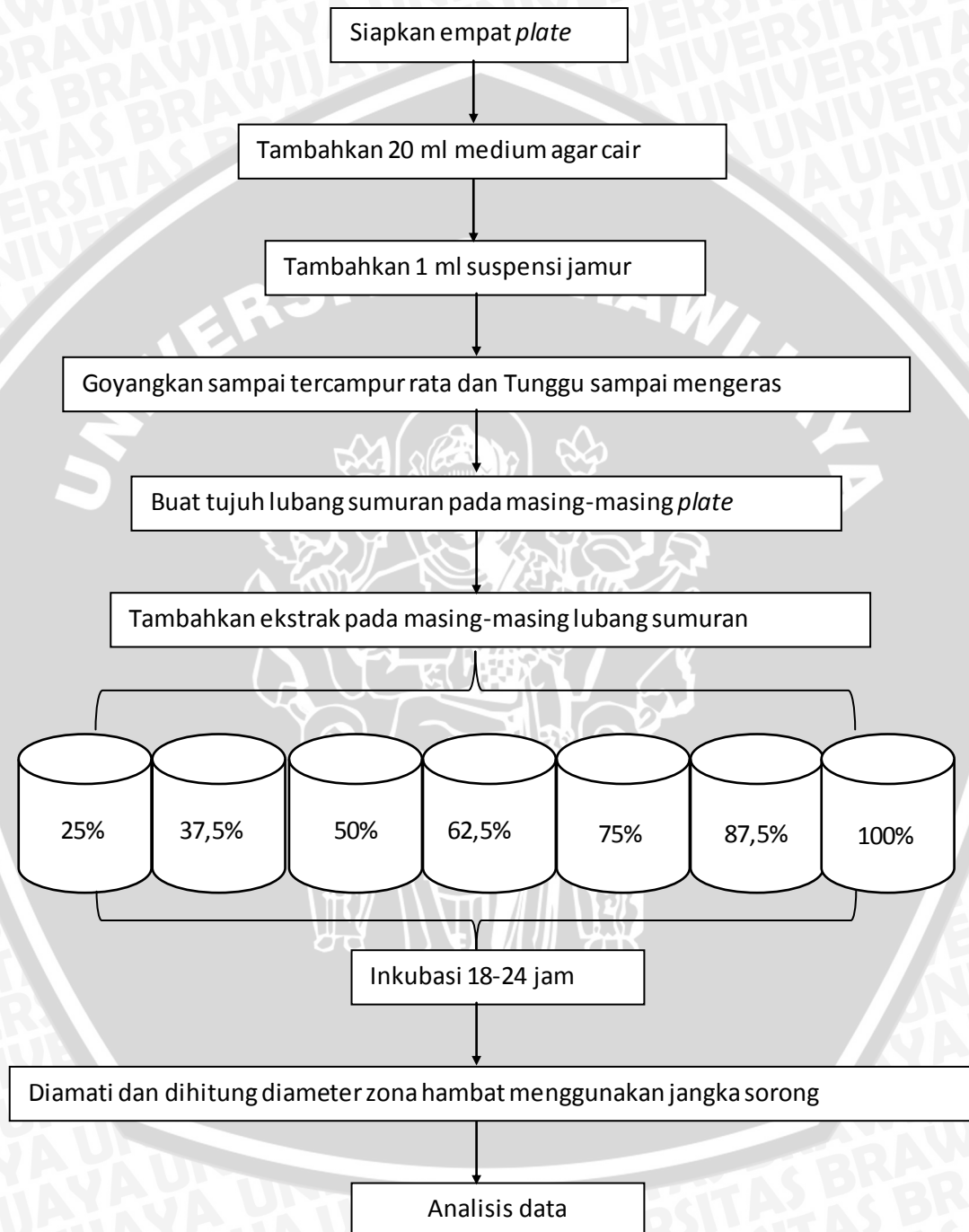
4.9.4 Uji Kepekaan Ekstrak Daun Nilam (*Pogostemon cablin*) terhadap *Candida albicans*

- 1) Menyiapkan *plate steril*
- 2) Menuangkan 20 ml medium agar pada *plate*
- 3) Menambahkan suspensi jamur *Candida albicans* sebanyak 1 ml dicampurkan pada medium agar dalam *plate*
- 4) *Plate* digoyang-goyangkan sehingga campuran tercampur dengan baik, lalu diamkan beberapa saat hingga mengeras

- 5) Lubang sumuran dibuat pada campuran yang sudah mengeras tersebut dengan menggunakan alat untuk membuat sumuran
- 6) Menambahkan ekstrak etanol daun nilam dengan konsentrasi 25%, 37,5%, 50%, 62,5%, 75%, 87,5%, dan 100%
- 7) Memasukkan *plate* ke dalam inkubator selama 18-24 jam pada suhu 37°C
- 8) Daya antifungal yang terbentuk ditentukan dengan mengukur diameter zona hambatan pertumbuhan menggunakan jangka sorong dalam satuan milimeter
- 9) Dilakukan analisis data



4.10 Skema Prosedur Penelitian



4.11 Analisis Data

Analisis data menggunakan uji statistik *One Way ANOVA* pada taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$). Uji ANOVA satu arah ini digunakan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol daun nilam terhadap pertumbuhan *Candida albicans* secara *in vitro*. Syarat dilakukannya uji ANOVA satu arah yaitu data harus terdistribusi normal dan varian antar variabel percobaan harus homogen. Untuk menguji apakah data hasil penelitian tersebar normal (*parametrik*) atau tidak tersebar normal (*non parametrik*) digunakan uji *Shapiro-Wilk test*. Sedangkan untuk melihat apakah data hasil penelitian bersifat homogen digunakan uji *Levene*. Apabila syarat ANOVA tidak terpenuhi maka uji statistik yang digunakan adalah *Kruskall-Wallis*.

Analisis data setelah ANOVA atau pasca ANOVA (*post hoc*) dilakukan apabila hipotesis nol (H_0) ditolak. Fungsi *post hoc* adalah untuk mencari kelompok mana yang berbeda. Contoh ujinya adalah *Mann-Whitney* atau *Turkey*. Uji *Turkey* digunakan jika datanya *parametrik*. Uji *Mann-Whitney* digunakan jika datanya *non parametrik*. Uji *Mann-Whitney* digunakan untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan respon dari dua populasi data yang saling independen. Tes ini merupakan tes paling kuat diantara tes-tes *non parametrik*.

Selanjutnya untuk mengetahui kekuatan dan keeratan hubungan antara ekstrak etanol daun nilam terhadap pertumbuhan *Candida albicans* (variabel dependen dan independen) dilakukan uji korelasi. Apabila sebaran data normal ($p > 0,05$) dan syarat linearitas terpenuhi dilakukan uji korelasi *Pearson*. Apabila sebaran data tidak normal ($p < 0,05$) dan syarat linearitas terpenuhi dilakukan uji korelasi *Spearman*. Uji regresi dilakukan untuk mengetahui besarnya pengaruh

satu variabel bebas (variabel independen) atau lebih terhadap satu variabel tergantung (variabel dependen).

