

## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Desain Penelitian

Desain pada penelitian ini menggunakan *experimental laboratories (true experiment-post test only control group design)*. Uji antifungi dilakukan secara *in vitro* dengan menggunakan metode dilusi tabung untuk mengetahui aktivitas ekstrak etanol akar kemangi (*Ocimum sanctum L.*) dalam menghambat *Candida albicans*. Proses ekstraksi akar kemangi menggunakan metode maserasi dengan menggunakan pelarut etanol.

Pada metode dilusi tabung terdapat dua tahap. Tahap pertama yaitu pengujian bahan atau ekstrak untuk menentukan KHM dilihat dari tingkat kekeruhan pada tabung. Tahap kedua dilusi tabung adalah tahap penanaman pada medium SDA dengan menggunakan metode penggoresan pada SDA *plate* untuk menentukan KBM.

#### 4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juli - November 2016 di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Proses ekstraksi akar kemangi dilakukan di Laboratorium Teknik Kimia Politeknik Negeri Malang.

#### 4.3 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah jamur *candida albicans vaginal swab* yang dimiliki oleh Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.

#### 4.4 Variabel Penelitian

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

##### 4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak etanol akar kemangi (*Ocimum sanctum L.*) dengan konsentrasi 0%, 8%, 10%, 12%, 14%, 16%, 18% yang diperoleh dari uji pendahuluan.

##### 4.4.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah pertumbuhan *Candida albicans* yang dapat dilihat dari kekeruhan yang terdapat pada tabung reaksi untuk menentukan KHM dan jumlah koloni *Candida albicans* pada media agar untuk menentukan KBM.

#### 4.5 Jumlah Pengulangan

Dasar perhitungan pengulangan adalah sebagai berikut :  $p(n-1) \geq 15$   
(Notobroto, 2005)

Keterangan : n = pengulangan

P = jumlah perlakuan

Dalam penelitian ini digunakan 6 konsentrasi ekstrak dan 1 konsentrasi kontrol jamur. Sehingga didapatkan perhitungan pengulangan sebagai berikut :

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

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

$$7n - 7 \geq 15$$

$$7n \geq 22$$

$$n \geq 3,34$$

Berdasarkan perhitungan tersebut adalah 3,34 setelah dibulatkan maka besar sampel minimal yang diperlukan pada penelitian ini adalah 4 kali.

#### 4.6 Definisi Operasional

1. Tanaman kemangi (*Ocimum sanctum L.*) yang digunakan dalam penelitian ini adalah bagian akar sebanyak 500 gram basah yang didapat dari ladang kemangi di daerah pakis Malang.
2. Ekstrak etanol akar kemangi merupakan hasil ekstraksi maserasi bubuk 100 gram kering akar kemangi dengan menggunakan pelarut etanol 96% yang akan menghasilkan konsentrasi 100%
3. Isolat *C.albicans* yang digunakan diperoleh dari *vaginal swab* yang dimiliki oleh Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya sebanyak 1 isolat.
4. Kadar Hambat Minimal (KHM) atau fungistatik adalah kadar atau konsentrasi ekstrak akar kemangi yang mampu menghambat pertumbuhan jamur *Candida albicans* yang ditandai dengan penampakan jernih awal pada biakan cair setelah diinkubasi selama 18-24 jam.
5. Kadar Bunuh Minimal (KBM) atau fungisida adalah kadar atau konsentrasi minimal larutan ekstrak etanol akar kemangi terendah yang mampu membunuh jamur *Candida albicans* yang ditandai dengan tidak adanya pertumbuhan koloni *Candida albicans* pada media padat setelah diinkubasi selama 18-24 jam.
6. Kejernihan larutan ekstrak etanol akar kemangi (*Ocimum sanctum L.*) dikonfirmasi dengan larutan Kontrol Jamur (KJ) yaitu konsentrasi ekstrak etanol akar kemangi 0% dan konsentrasi jamur *Candida albicans* 100%.

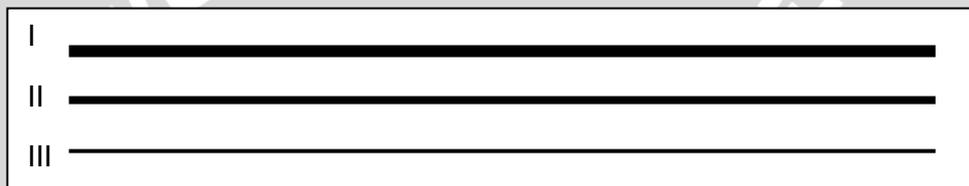
7. Pengamatan kualitatif digunakan untuk menentukan skor pertumbuhan *Candida albicans* berdasarkan bayangan tiga baris hitam yang tampak dibalik tabung. Kriteria scoring adalah sebagai berikut:

0 = jernih (ketiga garis nampak jernih)

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)



8. Pengamatan Kuantitatif untuk menentukan pertumbuhan jamur *Candida albicans* dilakukan dengan cara menghitung koloni jamur uji menggunakan *colony counter*.

#### 4.7 Alat dan Bahan Penelitian

##### 4.7.1 Persiapan Alat

Oven, timbangan ukur, labu Erlenmeyer, corong gelas, kertas saring, labu vaporator, labu penampung, evaporator, *ratory evaporator*, selang *water pump*, *water pump*, *water bath*, *vacum pump*, dan botol penampung hasil.

##### 4.7.1.1 Germinating Tube Test

Persiapan alat untuk *germinating tube test* adalah Mikroskop, gelas ukur, gelas penutup, api Bursen, ose, dan minyak emersi.

#### 4.7.1.2 Pewarnaan Gram

Persiapan alat untuk pewarnaan gram adalah gelas objek, gelas ukur, gelas penutup, api Bursen, ose, mikroskop, bahan pewarna (kristal violet, lugol, alkohol 96%, safranin), dan minyak emersi.

#### 4.7.2 Persiapan Bahan

Akar kemangi (*Ocimum sanctum L.*) yang telah dikering, etanol 96%, dan aquades steril.

##### 4.7.2.1 Germinating Tube Test

Bahan untuk germinating tube test terdiri dari biakan murni *C.albicans*, medium SDA, dan serum mamalia.

##### 4.7.2.2 Pewarnaan Gram

Bahan untuk pewarnaan gram terdiri dari aquades, dan jamur *C.albicans* hasil *vaginal swab* yang dimiliki Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

#### 4.7.3 Uji Dilusi Tabung

- Alat

Gelas objek, gelas ukur, gelas penutup, api Bursen, ose, mikroskop, bahan pewarna (Kristal violet, lugol, alkohol 96%, safranin), minyak emersi.

- Bahan

Aquades, jamur *Candida albicans* hasil *vaginal swab* yang dimiliki Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

## 4.8 Prosedur Penelitian

### 4.8.1 Pembuatan Bentuk Sediaan Ekstrak Etanol Akar Kemangi dengan Metode Maserasi.

Ekstrak dari akar kemangi didapatkan dari hasil metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Dengan pelarut etanol ini diharapkan zat-zat aktif antibakteri (alkaloid, saponin, flavonoid, dan tanin) yang terkandung dalam akar kemangi dapat larut dalam tahap ekstraksi.

### 4.8.2 Pembuatan Serbuk Akar Kemangi

Akar kemangi ditimbang sebanyak kurang lebih 500 gram basah dilakukan penimbangan sebanyak 3 kali, kemudian dijemur dibawah sinar matahari selama 7 hari hingga bobot konstan, selanjutnya diblender, sehingga didapat serbuk akar kemangi.

### 4.8.3 Pembuatan Ekstrak Etanolik Akar Kemangi

Serbuk akar kemangi ditimbang sebanyak 100 gram dimasukkan botol 1500 ml, kemudian direndam dengan etanol 96% sebanyak 750 ml selama 3-4 hari sambil digojog berulang-ulang. Hasilnya disaring dengan kain flannel sampai didapat ekstrak etanolik yang optimal, kemudian dipekatkan di dalam evaporator pada suhu 40°C hingga diperoleh ekstrak akar kemangi.

### 4.8.4 Identifikasi *Candida albicans*

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

#### 4.8.4.1 Identifikasi Koloni *Candida albicans* pada Sabouraud Agar (SDA)

Identifikasi jamur dari Laboratorium Mikrobiologi diambil satu koloni dengan menggunakan ose. Kemudian dibiakan pada media SDA hingga

dihasilkan koloni terpisah dan diinokulasikan selama 24-48 jam. Setelah itu diamati karakteristik koloni jamur.

#### 4.8.4.2 Pewarnaan Gram

1. Gelas objek dibersihkan dengan kapas steril, kemudian dilewatkan di atas api untuk menghilangkan lemak dan dibiarkan dingin.
2. Satu ose (1 $\mu$ l) aquades steril atau larutan saline diteteskan pada gelas objek.
3. Dengan ose yang sudah steril dengan pembakaran, ambillah satu ose koloni *C.albicans* yang tumbuh pada medium padat. Suspensikan dengan satu tetes aquades steril atau larutan saline yang sudah diteteskan terlebih dahulu pada gelas objek. Hapusan sebaiknya dibuat tipis.
4. Sediaan dikeringkan di udara, kemudian difiksasi dengan memberikan pemanasan di atas api secukupnya, sediaan siap untuk diwarnai.
5. Sediaan ditetesi dengan kristal violet, lalu didiamkan selama satu menit, kemudian buang sisa lugol dan bilas dengan air mengalir.
6. Sediaan ditetesi dengan lugol, lalu didiamkan selama satu menit, kemudian buang sisa lugol dengan di bilas air yang mengalir.
7. Sediaan ditetesi dengan alkohol 96% selama 10 detik atau sampai warna cat luntur, kemudian buang sisa alkohol dan bilas dengan air mengalir.
8. Sediaan ditetesi dengan safranin, lalu didiamkan selama 30 detik, kemudian dibuang sisa safranin dan bilas dengan air mengalir.
9. Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap untuk mengeringkan permukaan sediaan.
10. Dilakukan pengamatan pada sediaan di bawah mikroskop dengan menggunakan lensa obyektif yang pembesarannya 100 kali.

11. Hasil positif bila ditemukan bentukan *budding cells* yang tercatat ungu (bersifat gram positif) dan sel berbentuk oval.

#### 4.8.4.3 Germinating Tube

1. Menyediakan serum mamalia di dalam tabung.
2. *C.albicans* yang telah dibiakan pada medium SDA (*Saboured 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 kurang lebih 4 jam.
4. Kultur yang terapat di dalam serum tersebut diambil dengan ose dan diletakkan pada gelas obyek kemudian ditutup dengan pelarutnya.

#### 4.8.5 Persiapan Suspensi Uji *Candida albicans*

Cara persiapan suspensi uji jamur, dengan perhitungan jumlah koloni menggunakan spektrofotometer, OD=0,1 disebutkan setara dengan standar Mc Farland 0,5. Sementara itu standar Mc Farland 0,5 setara dengan konsentrasi jamur sebesar  $10^6$  CFU/ml. Dengan demikian, persiapan suspense uji *Candida albicans* dapat dilakukan sebagai berikut :

- Disediakan jamur *Candida albicans* dari SDA yang telah diuji konfirmasi
- Diambil 5 koloni (diameter  $\geq 1$  mm) dengan ose kemudian dimasukkan ke dalam 5 ml NaCl 0,85% steril. Kemudian diukur OD (Optical Density) atau kepadatan optisnya dengan spektrofotometer pada  $\lambda$  : 530 nm. Dari hasil yang diperoleh dibuat suspensi sel yang mengandung  $1 \times 10^6$  CFU/ml (sesuai standar Mc Farland 0,5) yang setara dengan OD=0,1 dilakukan perhitungan sebagai berikut:

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

Keterangan :

$V_1$  = volume jamur yang akan ditambah pengencer

$V_2$  = volume suspensi jamur uji (10ml)

$N_1$  = hasil spektrofotometer

$N_2$  = OD (0,1 setara dengan  $10^6$  CFU/ml) (Doughan, 2006)

Dari hasil perhitungan tersebut didapatkan volume jamur (ml) yang akan ditambah pengencer untuk mendapatkan 10 ml konsentrasi  $10^4$  CFU/ml.

- Dilakukan pengenceran suspensi jamur dengan konsentrasi  $10^6$  CFU/ml sebanyak 100 kali untuk mendapatkan konsentrasi jamur  $10^4$  CFU/ml.
- Diambil 1 ml larutan dengan konsentrasi jamur  $10^6$  CFU/ml kemudian dimasukkan ke dalam tabung yang telah diisi 9 ml NaCl sehingga konsentrasi jamur menjadi  $10^4$  CFU/ml.

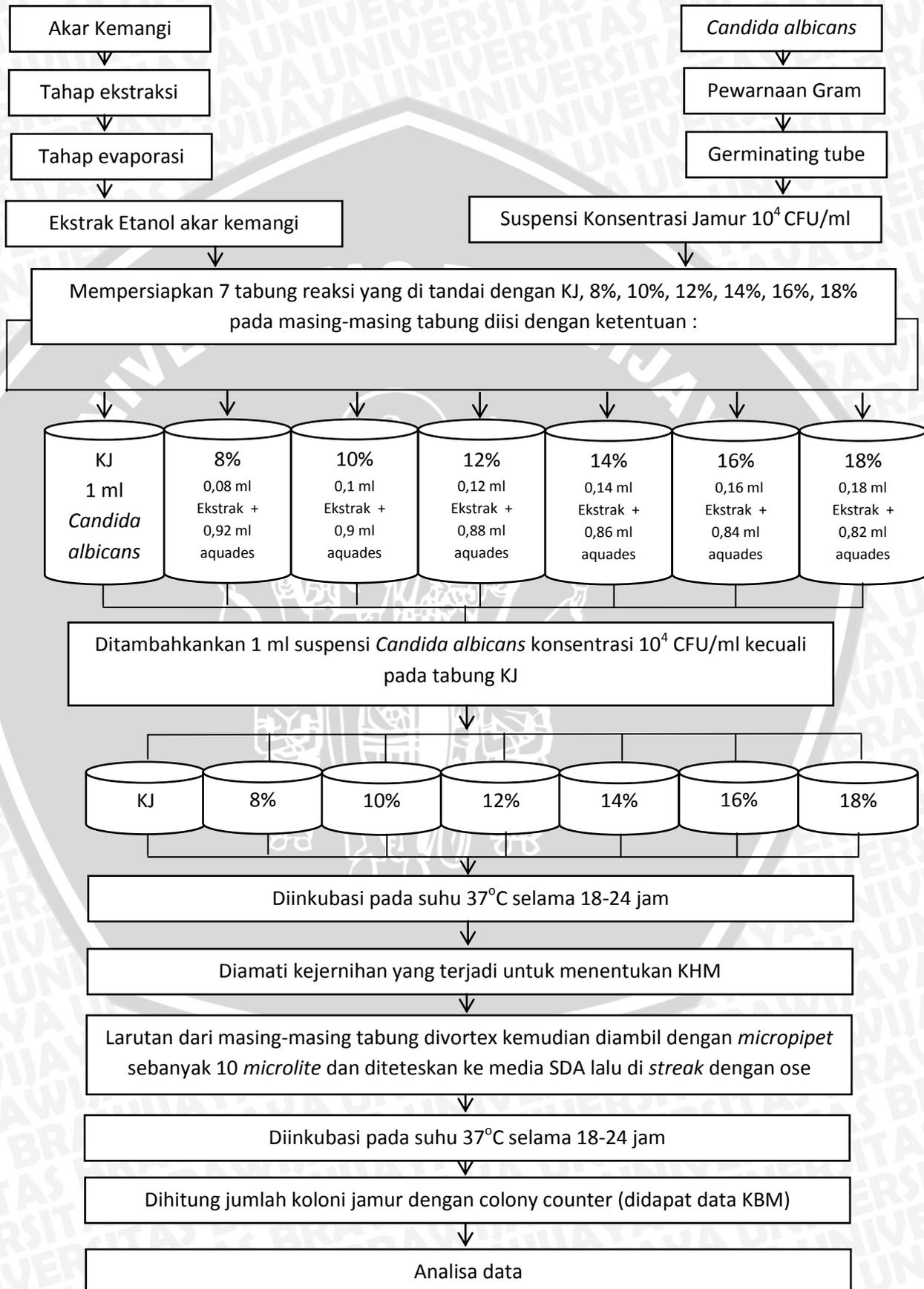
#### 4.8.6 Prosedur uji Antifungi

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

1. 7 tabung reaksi yang steril disiapkan dengan memberi label sesuai dengan dosis konsentrasinya yaitu 0%, 8%, 10%, 12%, 14%, 16%, 18%.
2. Tabung dengan dosis 0% (Kontrol Jamur) diisi dengan 2 ml suspensi *Candida albicans* dengan kepadatan  $10^4$  CFU/ml. Tabung ini digunakan sebagai kontrol positif.
3. Tabung dengan dosis 0%, 8%, 10%, 12%, 14%, 16%, 18% diisi dengan aquades steril.
4. Selanjutnya tabung dengan dosis 0%, 8%, 10%, 12%, 14%, 16%, 18% diisi dengan ekstrak etanol yang telah diencerkan.

5. Semua tabung dimasukkan ke inkubator selama 18-24 jam pada suhu 37°C.
6. Setelah diinkubasi semua tabung dikeluarkan dari inkubator dan dilakukan pengamatan pada kekeruhan tabung dengan membandingkan larutan tersebut dengan kontrol *c. albicans* untuk menentukan Kadar Hambat Minimum (KHM), kadar terendah pada tabung yang menunjukkan tidak ada kekeruhan merupakan Kadar Hambat Minimum (KHM).
7. Selanjutnya seluruh tabung yang di vortex dilakukan pengambilan larutan yang ada di dalamnya sebanyak 1 ose pada masing-masing tabung untuk dilakukan penanaman pada medium SDA.
8. Semua medium SDA diinkubasi, selama 18-24 jam dengan suhu 37°C.
9. Setelah diinkubasi, dilakukan penghitungan koloni yang tumbuh pada SDA dengan *colony counter* sehingga bisa di tentukan Kadar Bunuh Minimum (KBM).

### 4.8.7.1 Alur Skema Penelitian



#### 4.9 Analisa Data

Data dari pengamatan perbenihan *Candida albicans* dengan beberapa konsentrasi analisis dengan menggunakan uji statistik *one-way* ANOVA pada taraf kepercayaan 95% ( $\alpha = 0,05$ ). Hipotesis ditentukan melalui  $H_0$  dimana nilai signifikansi yang muncul  $p < 0,05$ . Perlu dilakukan uji normalitas data dan uji homogenitas varians karena terdapat syarat pada uji *one-way* ANOVA yaitu data yang diuji harus berdistribusi normal dan varians data harus sama. Uji normalitas dan homogenitas menunjukkan distribusi yang normal sehingga penelitian ini menggunakan uji statistik *one-way* ANOVA. Setelah itu dilakukan analisis *Post Hoc Tes (Tukey Test)*, untuk mengetahui perlakuan yang menyebabkan koloni jamur *Candida albicans* menunjukkan perbedaan bermakna atau tidak bermakna. Selanjutnya dilakukan uji korelasi untuk mengetahui keeratan hubungan pemberian perlakuan, terutama yang disebabkan oleh ekstrak etanol akar kemangi dengan jumlah koloni jamur *Candida albicans* serta uji regresi, untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak akar kemangi terhadap koloni jamur *Candida albicans*.