

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode true eksperimental *Candida albicans* dilakukan dengan design *post test control design only* karena penelitian ini dilihat hasilnya setelah dilakukan penelitian untuk mengetahui efek antimikroba berbagai konsentrasi ekstrak flavonoid mahkota dewa terhadap *Candida albicans*.

4.2 Sampel Penelitian

Sampel pada penelitian ini adalah berupa koloni *Candida albicans* dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Jumlah pengulangan penelitian menggunakan sebagai berikut :

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

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

$$8n-8 \geq 15$$

$$8n \geq 23 \rightarrow n \geq 2,875$$

Keterangan:

P = jumlah perlakuan (8, yaitu 7 konsentrasi ekstrak flavonoid mahkota dewa, 1 kontrol)

n = jumlah pengulangan (3 kali pengulangan)

4.3 Variabel Penelitian

Variable pada penelitian ini ada dua yaitu variable tergantung dan variable bebas :

4.3.1 Variabel Terikat

Variable tergantung pada penelitian ini adalah jumlah koloni *Candida albicans*

4.3.2 Variabel Bebas

Variable bebas adalah ekstrak flavonoid mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) dengan konsentrasi 0%, 7,5%, 15%, 22,5%, 30%, 37,5%, 45%, 52,5% yang didapatkan dengan melakukan studi pendahuluan terlebih dahulu.

4.4 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, proses pengekstrakan senyawa flavonoid dilakukan di Laboratorium Teknik Kimia Politeknik Negeri Malang. Lama penelitian selama 3 bulan

4.5 Definisi Operasional

1. *Candida albicans* yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan isolate dari swab vagina Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya
2. Ekstrak flavonoid mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan buah mahkota dewa yang di didapatkan di perkebunan milik salah satu warga di daerah Lawang, Malang. Sediaan ekstrak yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan pelarut etanol 96% dan dibuat dengan metode maserasi dari buah dengan menggunakan metode maserasi dari buah mahkota dewa yang masih segar. Pembuatan ekstrak menggunakan 2500 gram buah mahkota dewa yang

diekstrak dengan etanol 96%, lalu dipartisi sebanyak 2 tahap. Tahap pertama menggunakan n-heksana, tahap kedua menggunakan n-butanol untuk menarik senyawa flavonoid dari ekstrak total. Kemudian dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm untuk memisahkan senyawa berdasarkan berat molekul.

3. Kadar hambat minimum (KHM) adalah konsentrasi terendah dari ekstrak flavonoid buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) yang mampu mengurangi jumlah koloni *Candida albicans* yang ditandai tidak terdapatnya kekeruhan pada ekstrak flavonoid buah mahkota dewa dalam tabung yang telah diberi mikroba tersebut
4. Kadar Bunuh Minimum (KBM) adalah konsentrasi terendah dari ekstrak flavonoid buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) yang mampu membunuh jamur *Candida albicans* ditandai dengan jumlah koloni yang semakin sedikit bahkan tidak terdapat pertumbuhan
5. Kontrol positif yaitu tabung dengan konsentrasi 0% atau tanpa ekstrak flavonoid buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*)
6. Kontrol negatif yaitu tabung dengan konsentrasi 100% ekstrak flavonoid buah mahkota dewa atau tanpa jamur *Candida albicans*
7. *Original Inoculum* adalah inoculum jamur dengan konsentrasi 10^4 CFU/ml, digunakan sebagai konsentrasi awal bakteri untuk menentukan kategori KBM

4.6 Instrumen Penelitian

Instrument yang digunakan pada penelitian ini terdiri dari alat dan bahan

4.6.1 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain petrisidik, pipa plastik, tabung pendingin, labu evaporator, bak penampung hasil evaporasi, pompa sirkulasi air, pompa vakum, alat penamas air, pipet, tabung reaksi, rak tabung, gelas ukur, beaker glass, Erlenmeyer, corong Buchner, pengaduk, Bunsen, ose, inkubator, *rotary evaporator*, timbangan analitik, korek api, autoklaf, spektrofotometer, *colony counter*, Sentrifugator.

4.6.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain buah mahkota dewa, pelarut etanol 96%, air, isolate *Candida albicans*, media Sabouraud Dextrose Agar (SDA), alkohol 96%, NaCl, HCl, Kristal violet, lugol, safranin, aquades, n-heksana, n-butanol, minyak inersi, kertas penghisap, kapas, H₂O₂ 3%

4.7 Operasional Penelitian

4.7.1 Pembuatan Ekstrak Buah Mahkota Dewa

4.7.1.1 Tahap Pengeringan

1. Mencuci bersih buah mahkota dewa yang akan dikeringkan
2. Buah mahkota dewa dioven dengan suhu 80°C (bebas kandungan air)
3. Menggiling mahkota dewa untuk dijadikan bubuk sebanyak 2500 gram

4.7.1.2 Tahap Ekstraksi

Bubuk mahkota dewa ditimbang dengan menggunakan timbangan sebanyak 2500gram.

1. Kemudian direndam di dalam larutan etanol 96% sebanyak 30 liter pada dan diaduk sampai benar-benar tercampur (± 30 menit)
2. Diamkan selama 5 malam sampai mengendap
3. Dilakukan penyaringan dengan corong Buncher hingga didapatkan filtrate yang terpisah dengan ampas

4.7.2 Pemisahan Senyawa Flavonoid

4.7.2.1 Partisi dengan n-heksana

Pemisahan pertama dilakukan dengan menggunakan n-heksana, ekstrak etanol dilarutkan pada n-heksana sebanyak 1 liter untuk memisahkan lemak dan getah, proses ini ditambahkan air sebagai pemisah antara etanol dan air. Setelah didapatkan endapan etanol dan n-heksana, maka larutan n-heksana dihilangkan dan endapan etanol diuapkan kembali dengan suhu $\pm 45^{\circ}\text{C}$.

4.7.2.2 Partisi dengan n-butanol

Hasil pemisahan dengan menggunakan n-heksana dilanjutkan lagi dengan menggunakan n-butanol. Dilakukan pemisahan dengan n-butanol dikarenakan n-butanol dapat mengikat senyawa semi-polar, dan flavonoid merupakan salah satu senyawa semi-polar. Larutan etanol dicampurkan dengan larutan n-butanol, setelah itu dibiarkan sampai tercampur.

4.7.2.3 Proses Sentrifugasi

Hasil campuran larutan etanol dan n-butanol kemudian dilanjutkan dengan proses sentrifugasi. Menggunakan alat sentrifugator dengan kecepatan putaran 3000rpm selama 10 menit. Hasil endapan (supernatan) dari proses sentrifugasi

diambil lalu diuapkan kembali dengan suhu $\pm 60^{\circ}\text{C}$. Dan didapatkan larutan flavonoid pekat 100%

4.7.3 Identifikasi *Candida albicans*

Tes yang akan dilakukan untuk mengidentifikasi jamur *Candida albicans* antara lain adalah identifikasi koloni pada *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA), pewarnaan gram, dan *Germinating Tube Test*.

4.7.3.1 Identifikasi Koloni pada Sabouraud Dextrose Agar (SDA)

Isolate jamur dari Laboratorium Mikrobiologi diambil satu koloni dengan menggunakan ose. Kemudian dibiakkan pada media SDA sedemikian hingga dihasilkan koloni terpisah dan diinkubasi selama 24 jam. Setelah itu diamati karakteristik koloni jamur.

4.7.3.2 Pewarnaan Gram

- a. Satu ose aquades steril diteteskan pada gelas objek, kemudian ditambah sedikit biakan jamur yang disuspensikan dengan aquades ada gelas objek tersebut lalu diratakan
- b. Sediaan dikeringkan kemudian difiksasi dengan cara dilewatkan diatas api.
- c. Sediaan diberi tetesan Kristal violet dan ditunggu selama 1 menit kemudian sisa Kristal violet dibuang dan dibilas dengan air
- d. Sediaan diberi tetesan ugol dan ditunggu selama 1 menit kemudian sisa lugol dibuang dan dibilas dengan air
- e. Sediaan diberi tetesan alkohol 96% dan ditunggu selama 5-10 detik kemudian sisa alcohol dibuang dan dibilas dengan air

- f. Sediaan diberi tetesan safranin dan ditunggu selama 30 detik kemudian sisa alcohol dibuang dan dibilas dengan air
- g. Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap
- h. Sediaan dilihat dibawah mikroskop
- i. Hasil positif : *Candida albicans* berwarna ungu (Gram positif) dan berbentuk oval

4.7.3.3 Germinating Tube Test

- a. Disediakan serum mamalia dalam tabung 0,5 ml
- b. Diambil pembedihan *Candida albicans* pada SDA dengan ose yang telah disterilkan dengan cara pembakaran dan dimasukkan ke dalam tabung yang berisi serum mamalia 0,5 ml
- c. Diinkubasi pada suhu 37°C selama kurang lebih 24 jam
- d. Diambil kultur didalam serum tersebut menggunakan ose dan diletakkan pada gelas objek kemudian ditutup dengan penutupnya
- e. Diperiksa di bawah mikroskop dengan perbesaran 400x. dicari bentuk pseudohia memanjang khas *Candida albicans*

4.7.4 Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

- a. Mempersiapkan bakteri *Candida albicans* dari media SDA yang telah diuji konfirmasi
- b. Mengambil 5 koloni ($d \geq 1\text{mm}$) dengan menggunakan ose kemudian dimasukkan ke dalam 5 ml NaCl 0,85%. Kemudian diukur Optical Density (OD) atau kepadatan optisnya dengan spektrootometer pada $\lambda_{\text{maks}} = 520 \text{ nm}$.

Dari hasil yang diperoleh kemudian dibuat suspense sel yang mengandung 10^6 CFU/ml dengan rumus $n_1 \times v_1 = n_2 \times v_2$

- c. Untuk mendapatkan suspense sel yang mengandung 10^4 CFU/ml dilakukan 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 suspense sel dengan konsentrasi 10^5 CFU/ml. proses kemudian dilanjutkan sekali lagi hingga mencapai konsentrasi suspensi yang digunakan untuk tes yaitu 10^4 CFU/ml

4.7.5 Uji Anti Jamur

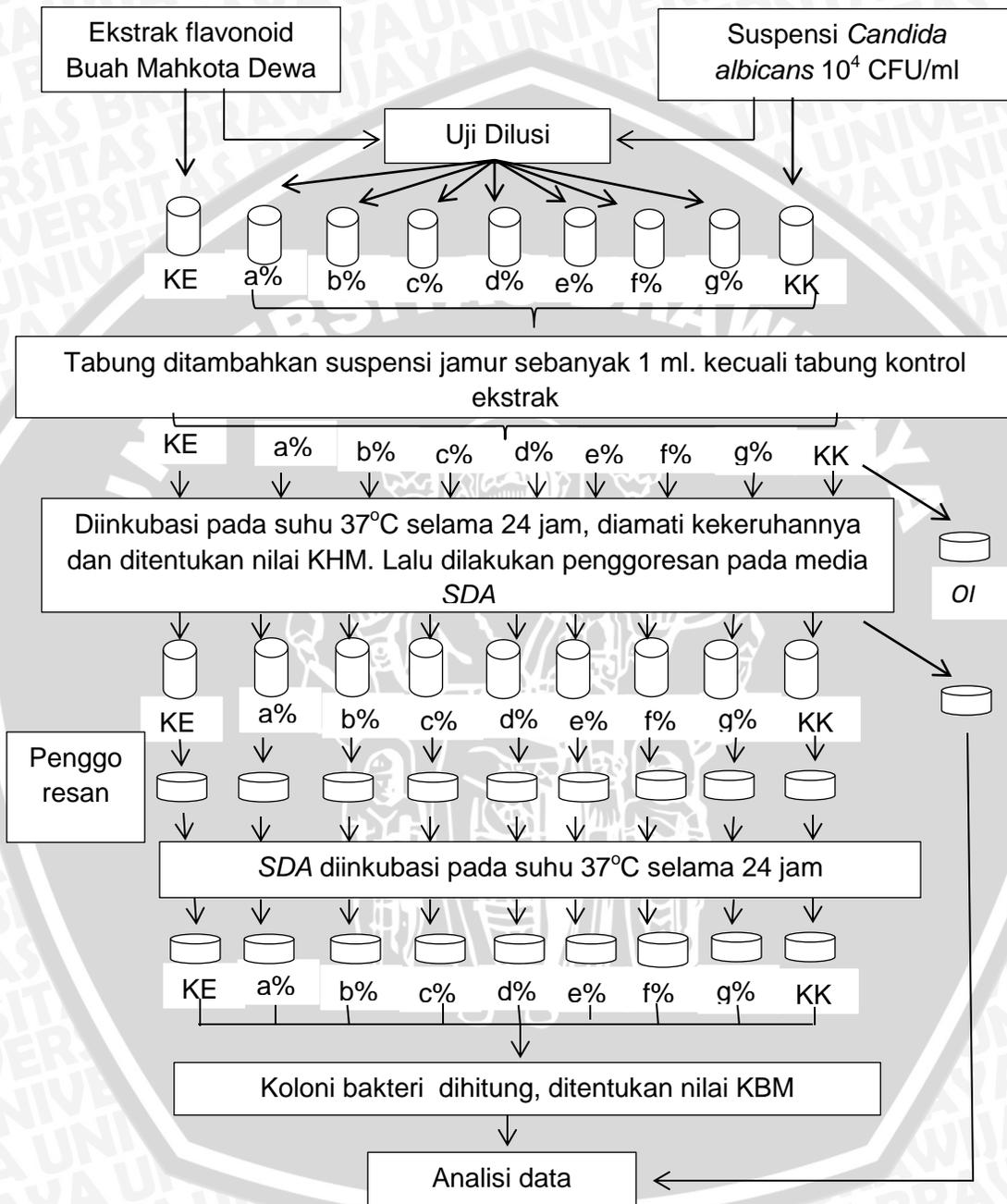
1. Disediakan 8 tabung reaksi steril dan diberi tanda 1,2,3,4,5,6,7, dan 8 dengan konsentrasi a%, b%, c%, d%, e%, f%, g% dan kontrol negatif serta 1 tabung reaksi dengan ukuran besar.
2. Dilakukan pembuatan larutan dengan konsentrasi a%, b%, c%, d%, e%, f%, g% pada tabung 1-7 sesuai dengan dosis yang didapatkan dengan melakukan penelitian sebelumnya
3. Tabung 8 diberikan konsentrasi bakteri *Candida albicans* 10^4 CFU/ml sebanyak 1 ml
4. Tabung 1-7 diberikan konsentrasi bakteri *Candida albicans* 10^4 CFU/ml sebanyak 1 ml dan divortex hingga homogen. Seluruh tabung termasuk kontrol negative kemudian diinkubasikan dalam inkubator pada suhu 37°C selama 18-24 jam.
5. Hari kedua semua dikeluarkan dari inkubator. Tabung 1-7 dibandingkan kekeruhannya dengan tabung kontrol negatif untuk menentukan KHM. Kekeruhan tabung dilihat dengan membandingkan dengan kontrol ekstrak dan

menempelkan kertas putih dengan beberapa garis hitam dengan ketebalan yang berbeda pada belakang tabung. Jika seluruh garis terlihat, berarti tabung sudah jernih.

8. Dari tabung yang tidak menunjukkan kekeruhan, diambil sebanyak 1 ose kemudian digoreskan pada SDA dan diinkubasi selama 18-24 jam dengan suhu 37°C
9. Jumlah colony pada SDA dihitung dengan menggunakan *colony counter* dan tentukan KBM. KBM ditandai dengan tidak adanya pertumbuhan koloni bakteri atau pertumbuhan bakteri kurang dari 0,1% *Original Inoculum* (OI) (Mpila, 2012)



Alur Kerja Penelitian



Gambar 4.1 Alur Penelitian Metode Dilusi Tabung

Keterangan : KE: Kontrol Ekstrak, KK: Kontrol Kuman, OI: Original Inoculum, SDA: Sabouraud Dextrose Agar

4.8 Analisis data

Analisa data yang digunakan dalam penelitian ini yaitu menggunakan analisa kuantitatif statistik *One Way ANOVA* dan uji statistik korelasi-regresi. Namun sebelumnya dilakukan uji distribusi dan homogenitas varian menggunakan Shapiro-Wilk. Uji statistik ANOVA one-way dengan derajat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$) digunakan untuk mengetahui signifikansi hasil perhitungan jumlah koloni bakteri *Candida albicans* terhadap ekstrak flavonoid buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*).

Sedangkan uji korelasi-regresi digunakan untuk mengetahui kekuatan hubungan dan besarnya pengaruh antara konsentrasi ekstrak flavonoid mahkota dewa terhadap bakteri *Candida albicans*. Analisis data menggunakan SPSS (Statistical Product of Service Solution) for Windows versi 17.0