

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1. Rancangan Penelitian

Desain penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah desain penelitian *true experimental post control design only* untuk mengetahui efek antifungi berbagai konsentrasi ekstrak etanol lengkuas putih (*Alpinia galanga* L.Willd.) terhadap jamur *Candida albicans* dengan menggunakan metode *tube dilution test* yang dilanjutkan dengan penggoresan pada media *Saboaroud Dextrose Agar*.

4.2. Sampel Penelitian

4.2.1 Jenis dan Kriteria Sampel

Koloni *Candida albicans* dapat dari stok kultur murni Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, tidak bercampur dengan jenis mikroba atau fungi lainnya. Lengkuas putih (*Alpinia galanga* L.Willd) yang didapatkan dari Materia Medika Batu.

4.2.2 Jumlah Pengulangan Sampel

Sampel pada penelitian ini adalah jumlah koloni jamur *Candida albicans* dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dengan kepadatan 10^4 CFU/ml per *tube*. Jumlah pengulangan penelitian menggunakan rumus Lukito sebagai berikut :(Loekito, 1998).

$$p(n-1) \geq 16$$

$$6(n-1) \geq 16$$

$$6n-6 \geq 16$$

$$6n \geq 22 \rightarrow n \geq 3,67 \approx 4$$

Keterangan:

p = jumlah perlakuan (6, yaitu 5 konsentrasi ekstrak lengkuas putih, 1 kontrol)

n = jumlah pengulangan (4 kali pengulangan).

4.3. Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

Ekstrak etanol maserasi lengkuas putih (*Alpinia galanga* L.Willd.) dengan konsentrasi 23%, 21%, 19%, 17%, 15%, 0% (yang didapatkan dari penelitian pendahuluan sebelumnya).

4.3.2 Variabel Terikat

Pertumbuhan *Candida albicans* (kekeruhan pada dilusi tabung dan jumlah koloni di SDA).

4.3.3 Variabel Kendali

Cara pembuatan ekstrak etanol metode maserasi lengkuas putih (*Alpinia galanga* L.Willd.), cara perkembangbiakan jamur, media pembiakan, cara penyimpanan hasil percobaan.

4.4. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada bulan April - Mei 2013.

4.5 Alat dan Bahan

4.5.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah cawan petri, oese, pinset, spreader, brander spiritus, alat inkubator, *autoclave*, tabung reaksi, centrifugator, mikropipetalat, penumbuk botol, kedap udara, *rotary shaker*, *vacum evapourator*, wadah steril untuk menyimpan hasil ekstrak.

4.5.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah ekstrak etanol lengkuas putih (*Alpinia galanga* L.Willd.) dengan menggunakan metode maserasi, koloni *Candida albicans* dari kultur murni, *Saboroud Dextrose Broth*, *Saboroud Dextrose Agar*, Larutan PZ steril.

4.6 Definisi Operasional

- a) Ekstrak lengkuas putih (*Alpinia galanga* L.Willd.) merupakan hasil ekstraksi etanol 96% dengan metode ekstraksi maserasi lengkuas putih yang telah dihaluskan sehingga sudah dalam bentuk bubuk didapatkan dari Materia Medika Batu.
- b) Isolat *Candida albicans* adalah stok kultur murni Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang tidak bercampur dengan jenis mikroba atau fungi lainnya dan telah diidentifikasi di Laboratorium mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
- c) *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) adalah media selektif untuk pertumbuhan jamur.
- d) Standar kepadatan (kekeruhan) Mc Farland 0,5 adalah suatu standar yang digunakan sebagai referensi untuk menentukan tingkat kekeruhan suspensi

jamur sehingga jumlah jamur yang terdapat dalam suspensi tersebut $\pm 1,5 \times 10^8$ CFU/ml. Dalam penelitian ini tingkat kekeruhan yang digunakan 10^4 CFU/ml.

- e) Kontrol positif merupakan kontrol untuk mengetahui apakah terjadi kontaminasi terhadap *C.albicans* yang diuji atau tidak. Dilihat dari tabung reaksi yang berisi *C.albicans* ditambah dengan aquades steril
- f) Kontrol negatif merupakan kontrol tabung reaksi berisi ekstrak etanol lengkuas putih (*Alpinia galanga* L.Willd.), tanpa diberi *C.albicans* untuk melihat kesterilan bahan ekstrak.
- g) Kadar Hambat Minimum (KHM) adalah konsentrasi terendah dari ekstrak etanol metode maserasi lengkuas putih (*Alpinia galanga* L.Willd.) yang mampu menghambat pertumbuhan *Candida albicans* yang ditunjukkan dengan melihat kejernihan tabung pada dilusi tabung.
- h) Kadar Bunuh Minimum (KBM) adalah konsentrasi terendah dari ekstrak etanol metode maserasi lengkuas putih (*Alpinia galanga* L.Willd.) yang ditunjukkan dengan tidak adanya pertumbuhan koloni *Candida albicans* pada SDA plate atau dengan colony counter menunjukkan jumlah koloni *Candida albicans* pada biakkan agar SDA $< 0,1\%$ original inoculums (OI).
- i) Original inoculum adalah inokulasi bakteri dengan konsentrasi 10^4 CFU/mL yang diinokulasikan pada media agar padat dan digunakan untuk mencari kategori KBM.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Sterilisasi Alat

Semua alat yang akan digunakan dalam penelitian, sebelumnya disterilkan dalam autoclave dengan suhu 121 °C selama 15 menit.

4.7.2 Proses Pembuatan Ekstrak Etanol Metode Maserasi Lengkuas Putih

(*Alpinia galanga* L.Willd.)

Lengkuas putih didapatkan dari Materia Medika Batu. Lengkuas putih dibersihkan dengan air suling. Dikeringkan dengan diangin-anginkan tanpa terkena sinar matahari langsung dan dihomogenisasi dengan cara digiling atau ditumbuk menjadi bubuk halus kemudian disimpan dalam botol kedap udara (Hena, 2010).

Untuk pembuatan dalam pelarut organik (etanol), dari tiap 25 gram bubuk lengkuas putih yang telah dikeringkan di tempatkan dalam 100 ml etanol dan disimpan dalam *rotary shaker* pada 190-220 rpm selama 24 jam kemudian diistirahatkan selama 5 jam untuk mengendapkan material tanaman (Cock, 2008; Hena, 2010; Khan et al., 2010). Hasilnya kemudian disaring dan disentrifugasi pada kecepatan 5000 pm selama 15 menit. Supermatan diambil dan pelarut diuapkan pada suhu 45°C dalam *vacuum evaporator* hingga didapatkan ekstrak murni tanpa pelarut (Hena, 2010).

4.7.3 Pemeriksaan Gram *Candida albicans*

- Gelas objek dibersihkan dengan kapas, kemudian dilewatkan di atas api untuk menghilangkan lemak dan dibiarkan dingin.
- Satu ose aquades steril diteteskan pada gelas objek ditambah sedikit biakan jamur yang diambil menggunakan ose, selanjutnya disuspensikan dengan

aquades pada gelas objek dan diratakan. Untuk sediaan cair tidak perlu disuspensikan dengan aquades.

- c. Sediaan dikeringkan di udara, kemudian dilakukan fiksasi dengan cara melewatkan sediaan di atas api.
- d. Sediaan pada gelas objek ditetesi dengan kristal violet selama 1 menit. Sisa kristal violet dibuang dan dibilas dengan air.
- e. Sediaan ditetesi dengan lugol selama 1 menit. Sisa lugol dibuang dan dibilas dengan air.
- f. Sediaan ditetesi dengan alkohol 96% selama 5-10 detik atau sampai warna cat luntur. Sisa alkohol dibuang dan dibilas dengan air.
- g. Sediaan ditetesi safranin selama $\frac{1}{2}$ menit. Sisa safranin dibuang dan dibilas dengan air.
- h. Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap.
- i. Sediaan dilihat di bawah mikroskop dengan lensa objektif perbesaran 1000x.
- j. Hasil positif : *Candida albicans* tercat ungu (Gram positif), berbentuk oval dan terdapat *budding*.

4.7.4 Tes Germinating Tube

- a. Isolat jamur diambil dari perbenihan dengan menggunakan ose yang sudah disterilisasi dengan cara pembakaran.
- b. Dimasukkan tabung yang berisi plasma 0,5 ml.
- c. Diinkubasikan pada 35°C selama \pm 4 jam.
- d. Kultur di dalam serum diambil menggunakan ose dan diletakkan pada gelas objek, lalu ditutup dengan gelas penutup.
- e. Diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran lensa objektif 40x.

- f. Bila (+) maka didapatkan bentukan seperti kecambah.

4.7.5 Persiapan Suspensi Uji *Candida albicans*

- Dipersiapkan jamur *Candida albicans* dari SDA yang telah diuji konfirmasi.
- Ambil 5 koloni ($d \geq 1\text{mm}$) dengan ose kemudian dimasukkan ke dalam 5 ml NaCl 0,85% steril. Kemudian diukur Optical Density (OD) atau kepadatan optisnya dengan spektrofotometer pada $\lambda_{\text{maks}} = 530\text{ nm}$. Dari hasil yang diperoleh dibuat suspensi sel yang mengandung 1×10^6 hingga 5×10^6 CFU/ml dengan rumus $n_1 \times v_1 = n_2 \times v_2$ (Murray *et al.*, 1999).
- Untuk mendapatkan suspensi sel yang mengandung $0,5 \times 10^3$ hingga $2,5 \times 10^3$ 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 suspensi sel dengan konsentrasi 10^5 CFU/ml. Proses dilanjutkan dua kali hingga mencapai konsentrasi suspensi jamur yang digunakan untuk tes, yaitu $0,5 \times 10^3$ hingga $2,5 \times 10^3$ CFU/ml (Murray *et al.*, 1999).

4.7.6 Uji Aktivitas Antifungi Ekstrak Etanol Lengkuas putih (*Alpinia galanga* L.Willd.) terhadap *Candida albicans*

Rangkaian uji aktivitas antifungi ekstrak etanol lengkuas putih adaah sebagai berikut:

- Disediakan 7 tabung steril, 5 tabung sebagai uji antifungi dan 1 tabung sebagai kontrol jamur , 1 kontrol bahan.
- Ekstrak etanol lengkuas putih (dalam bentuk cairan) dimasukkan pada tabung reaksi steril masing-masing sebanyak 0 μl , 1000 μl , 500 μl , 250 μl , 125 μl , 62,5 μl . Aquades steril dimasukkan pada masing-masing tabung sebanyak 1000 μl , 0 μl , 500 μl , 750 μl , 875 μl , 937,5 μl .

- c. Menyiapkan perbenihan cair perbenihan jamur dengan konsentrasi jamur $0,5 \times 10^4$ hingga $2,5 \times 10^4$ CFU/ml. Perbenihan cair jamur dimasukkan pada semua tabung konsentrasi, masing-masing sebanyak 1 ml. Sehingga konsentrasi akhir ekstrak etanol lengkuas putih (*Alpinia galanga* L.Willd.) adalah 0% (kontrol jamur), 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%.
- d. Kontrol jamur (0%) digoreskan pada SDA sebagai *original inoculum* kemudian diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu 35°C .
- e. Masing-masing tabung di-*vortex* dan diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu 35°C .
- f. Pada hari kedua, semua tabung dikeluarkan dari inkubator. KHM didapatkan dengan cara melihat kejernihan tabung.
- g. Kemudian dari masing-masing tabung dilusi diambil satu ose kemudian diinokulasikan pada SDA. Kemudian diinkubasi 24-48 jam pada suhu 35°C .
- h. Pada hari ketiga didapatkan data KBM dan dilakukan pengamatan kuantitatif pada masing-masing konsentrasi dengan cara menghitung jumlah koloni jamur dengan *colony counter*. KBM ditentukan dari tidak adanya jumlah koloni yang tumbuh pada SDA atau jumlah koloninya kurang dari 0,1% jumlah koloni di OI.
- i. Setelah ditemukan konsentrasi KBM kemudian dilakukan penelitian yang sesungguhnya dengan prosedur yang sama seperti pada penelitian pendahuluan dengan 5 konsentrasi 23%, 21%, 19%, 17% dan 15%. Konsentrasi tersebut ditentukan berdasarkan hasil eksplorasi dari penelitian pendahuluan.

4.8 Analisis Data

Data terlebih dahulu dilakukan uji distribusi dan homogenitas varian menggunakan *kolmogorov smirnov*. Apabila data terdistribusi normal dan homogen, maka analisis data yang digunakan adalah uji statistik *one way ANOVA*. Apabila distribusi data tidak normal dan tidak homogen maka digunakan uji statistik *Kruskal-Wallis*. Uji statistik *one way ANOVA* dengan derajat kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$) digunakan untuk mengetahui adanya pengaruh pemberian berbagai konsentrasi ekstrak etanol lengkuas putih (*Alpinia galanga* L.Willd.) terhadap jumlah koloni jamur *Candida Albicans*. Kemudian dilakukan analisis Post Hoc Test (Tukey Test), untuk mengetahui perlakuan mana saja yang menyebabkan jumlah koloni jamur *Candida albicans* menunjukkan perbedaan yang bermakna dan tidak bermakna. Selanjutnya dilakukan uji korelasi, untuk mengetahui keeratan hubungan pemberian perlakuan terutama yang disebabkan oleh pemberian ekstrak lengkuas putih (*Alpinia galanga* L.Willd) dengan jumlah koloni jamur *Candida albicans*, serta uji regresi untuk mengetahui pengaruh pemberian perlakuan terutama yang disebabkan oleh pemberian ekstrak lengkuas putih (*Alpinia galanga* L.Willd) dengan jumlah koloni jamur *Candida albicans*.

4.9 Diagram Alur Penelitian

