

## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Desain Penelitian

Pada penelitian ini penulis menggunakan metode *true experimental design* dengan *post test only control group design*. Dalam penelitian ini dilakukan uji laboratorium yang bertujuan untuk mengetahui dan membuktikan efek antifungi dari ekstrak etanol kulit buah kakao (*Theobroma cacao*) terhadap pertumbuhan koloni *Candida albicans*. Adapun uji kepekaan antifungi yang dipakai adalah uji kepekaan antifungi dengan metode dilusi agar. Untuk menentukan Kadar Hambat Minimum (KHM) dari ekstrak etanol kulit buah kakao tersebut dalam kaitannya dengan penghambatan pertumbuhan koloni *Candida albicans*.

#### 4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya pada bulan April 2013 sampai bulan September 2013.

#### 4.3 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah fungi *Candida albicans* yang diambil dari *stock culture* milik Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang yang berasal dari isolat pasien Rumah Sakit Saiful Anwar Malang.

#### 4.4 Pengulangan

Banyaknya pengulangan yang diperlukan untuk penelitian ini dapat dihitung dengan menggunakan rumus :

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

Keterangan :

P = jumlah perlakuan

n = jumlah ulangan yang diperlukan

Penelitian ini menggunakan 6 konsentrasi dari ekstrak etanol kulit buah kakao dan satu kontrol fungsi ( $p = 6 + 1 = 7$ ) maka didapatkan jumlah pengulangan:

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

$$7n - 7 \geq 15$$

$$7n \geq 22$$

$$n \geq 3,143 \approx 4$$

Jadi jumlah pengulangan yang perlu dilakukan penelitian ini adalah 4 kali.

#### 4.5 Variabel Penelitian

##### 4.5.1 Variabel bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak etanol kulit buah kakao dengan konsentrasi tertentu.

##### 4.5.2 Variabel tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah pertumbuhan *Candida albicans*

#### 4.6 Definisi Operasional

- a. *Candida albicans* diambil dari *stock culture* milik Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang yang berasal dari isolat pasien Rumah Sakit Saiful Anwar Malang.
- b. Kulit buah kakao (*Theobroma cacao*) yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari UPT Materia Medica, Batu.
- c. Ekstrak kulit buah kakao adalah kadar atau konsentrasi kulit buah kakao yang dilakukan ekstraksi dingin (maserasi) dengan menggunakan etanol 96%.
- d. KBM (Kadar Bunuh Minimum) adalah konsentrasi minimal larutan ekstrak etanol kulit buah kakao yang mampu membunuh fungsi *Candida albicans* dengan mengamati hasil streaking fungsi dari dilusi tabung.
- e. (Kadar Hambat Minimum) adalah kadar atau konsentrasi minimal larutan ekstrak etanol kulit buah kakao yang mampu menghambat pertumbuhan fungsi *Candida albicans* dengan menggunakan uji efektivitas dilusi agar.
- f. Kontrol fungsi (*plate* dengan fungsi tanpa larutan ekstrak etanol kulit buah kakao) adalah *plate* dengan konsentrasi 0%.
- g. % adalah persentase konsentrasi akhir larutan ekstrak etanol kulit buah kakao setelah ditambah fungsi.

#### 4.7 Bahan dan Alat

##### 4.7.1 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan sebagai berikut :

1. Sabouraud Dextrose Agar
2. Ekstrak Kulit Buah Kakao
3. *Candida albicans* kultur murni
4. Gram stain dyes, Krystal violet, Lugol's iodine, 96% Alkohol, Safranin
5. Aquades steril

#### 4.7.2 Alat

1. Cawan petri
2. Pisau
3. Pipet ukur
4. Ose
5. Api bunset
6. Kompor listrik
7. Aluminium foil
8. Corong
9. Spektrofotometri
10. Mikroskop
11. Alat untuk inkubasi
12. Alat sterilisasi

#### **4.8 Prosedur Penelitian**

Prosedur penelitian meliputi pembuatan ekstrak etanol kulit buah kakao, identifikasi fungi uji (*Candida albicans*), persiapan suspensi uji *Candida albicans*, dan uji antifungi ekstrak etanol kulit buah kakao.

##### **4.8.1 Pembuatan Ekstrak Etanol Kulit Buah kakao**

Proses ekstraksi:

- a. Sampel kulit buah kakao yang telah dikeringkan ditimbang  $\pm 2\text{kg}$ .

- b. Sampel tersebut dimasukkan ke dalam gelas erlen meyer ukuran 1 liter.
- c. Kemudian direndam dengan 900 ml etanol 96%.
- d. Dikocok hingga benar-benar tercampur ( $\pm$  30 menit).
- e. Didiamkan selama 1 malam sampai mengendap.
- f. Proses ekstraksi ini dilakukan sampai hasil ekstraksi jernih. Kemudian hasil ekstraksi siap untuk dievaporasi.

#### Proses Evaporasi:

- a. Diambil lapisan atas campuran etanol 96% dengan zat aktif kulit buah kakao yang sudah terlarut, lalu dimasukkan dalam labu evaporasi 1 liter.
- b. Labu evaporasi dipasang pada evaporator.
- c. *Water bath* diisi dengan air sampai penuh.
- d. Semua rangkaian alat dipasang, termasuk *rotary evaporator*, pemanas *water bath* (diatur sampai suhu  $\pm$  78,4 °C, sesuai dengan titik didih etanol), lalu disambungkan dengan aliran listrik.
- e. Larutan etanol 96% dibiarkan memisah dengan zat aktif yang sudah ada dalam labu.
- f. Ditunggu sampai aliran etanol 96% berhenti menetes pada labu penampung ( $\pm$  1,5 sampai 2 jam untuk 1 labu).
- g. Ekstrak kemudian ditimbang dengan neraca analitik.
- h. Masukkan hasil ekstraksi dalam botol plastik dan masukkan dalam freezer.

#### 4.8.2 Identifikasi *Candida albicans*

#### 4.8.2.1 Saboraud Dextrose Agar

Sebelum digunakan untuk pengujian, jamur *Candida albicans* yang diperoleh diidentifikasi ulang dengan melihat karakteristik koloni pada *Saboraud Dextrose Agar (SDA)*. Setelah itu isolat jamur dari Laboratorium Mikrobiologi menggunakan ose. Kemudian distreaking pada media SDA sehingga dihasilkan koloni terpisah dan diinkubasi selama 24-48 jam. Setelah itu diamati lagi karakteristik koloni jamur tersebut dan dilakukan pewarnaan gram serta *Germinating Test Tube*. Di bawah ini adalah prosedur yang dilakukan untuk pengujian karakteristik koloni *Candida albicans*.

#### 4.8.2.2 Pewarnaan Gram

1. Gelas objek dibersihkan dengan kapas, kemudian dilewatkan di atas api untuk menghilangkan lemak dan dibiarkan dingin.
2. Satu ose (1  $\mu$ l) aquades steril diteteskan pada gelas objek ditambah sedikit biakan *Candida albicans* yang diambil menggunakan ose, selanjutnya disuspensikan dengan aquades pada gelas objek dan diratakan. Untuk sediaan cair tidak perlu disuspensikan dengan aquades.
3. Sediaan dikeringkan di udara, kemudian dilakukan fiksasi dengan cara melewatkan sediaan di atas api.
4. Sediaan pada gelas objek ditetesi dengan kristal violet selama 1 menit. Sisa kristal violet dibuang dan dibilas dengan air.
5. Sediaan ditetesi dengan lugol selama 1 menit. Sisa lugol dibuang dan dibilas dengan air.

6. Sediaan ditetesi dengan alkohol 96% selama 5-10 detik atau sampai warna cat luntur. Sisa alkohol dibuang dan dibilas dengan air.
7. Sediaan ditetesi safranin selama ½ menit. Sisa safranin dibuang dan dibilas dengan air.
8. Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap.
9. Sediaan dilihat di bawah mikroskop dengan lensa objektif perbesaran 1000x.
10. Hasil positif : *Candida albicans* tercat ungu (Gram positif), bentuk *budding*.

#### 4.8.2.3 Tes *Germinating Tube*

1. Isolat fungi diambil dari perbenihan menggunakan ose yang sudah disterilisasi dengan cara pembakaran.
2. Dimasukkan tabung yang berisi serum mamalia 0,5 ml.
3. Diinkubasikan pada 37°C selama ± 4 jam.
4. Kultur di dalam serum diambil menggunakan ose dan diletakkan pada gelas objek, lalu ditutup dengan gelas penutup.
5. Diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran lensa objektif 40x.
6. Dicari bentukan *pseudohifa* memanjang khas *Candida albicans*

#### 4.8.3 Persiapan Suspensi Uji *Candida albicans*

1. Dipersiapkan fungi *Candida albicans* dari SDA yang telah diuji konfirmasi.

2. Diambil 5 koloni ( $d \geq 1\text{mm}$ ) dengan ose kemudian dimasukkan ke dalam 9 ml NaCl 0,85% steril. Kemudian diukur Optical Density (OD) atau kepadatan optisnya dengan spektrofotometer pada  $\lambda = 530\text{ nm}$ . Dari hasil yang diperoleh dibuat suspensi sel yang mengandung  $1 \times 10^6$  CFU/ml dengan rumus  $n_1 \times v_1 = n_2 \times v_2$  (Murray *et al.*, 1999).
3. Untuk mendapatkan suspensi sel yang mengandung  $1 \times 10^4$  CFU/ml dilakukan dengan cara mengambil 1 ml (dari tabung yang mengandung  $1 \times 10^6$  CFU/ml) untuk dicampur dengan 9 ml NaCl 0,85% steril. Maka akan didapatkan suspensi sel dengan konsentrasi  $1 \times 10^5$  CFU/ml. Proses dilanjutkan dua kali hingga mencapai konsentrasi suspensi fungi yang digunakan untuk tes, yaitu  $1 \times 10^4$  CFU/ml (Murray *et al.*, 1999).

#### 4.8.4 Tahap perlakuan

##### 4.8.4.1 Penentuan Konsentrasi

###### a. Metode dilusi tabung

Konsentrasi awal standar yang digunakan dalam metode dilusi tabung dengan penurunan setengah kali konsentrasi terbesar. Maka melalui penelitian pendahuluan, ekstrak Kulit Buah Kakao yang digunakan dalam metode dilusi tabung adalah pada konsentrasi 3,125%, 6,25%, 12,5%, 25%, dan 50%.

###### b. Metode dilusi agar

Telah diuji sebelumnya bahwa buah kakao memiliki efek antimikroba dengan Kadar Hambat Minimum 8% pada bakteri penghasil glukon (John Nsor, 2012). Maka konsentrasi yang digunakan dengan *range*

berdasarkan jurnal penelitian yang telah ada. Ekstrak Kulit Buah Kakao pada metode dilusi agar adalah pada konsentrasi 0%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%.

#### 4.8.4.2 Perlakuan Ekstrak Kulit Buah Kakao metode dilusi

Penyediaan ekstrak dengan konsentrasi berbeda

- Dengan menggunakan rumus

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

Penerangan:

V1 = Volume fungi yang akan ditambah pengencer

N1 = Nilai absorpsi suspensi (hasil spektrofotometri)

V2 = Volume suspensi fungi uji (10 ml)

N2 = OD (0,1 = setara dengan  $10^7$  /ml)

##### a. Dilusi Tabung

- Siapkan 7 tabung steril, beri tanda KK, A, B, C, D, E, dan KB (kontrol bahan). Kontrol bahan (KB) adalah ekstrak kulit buah kakao. Kontrol fungsi (KF) adalah biakan fungi *Candida albicans* dengan konsentrasi  $10^4$  CFU/ml.
- Masukkan  $1-x_1$  ml aquades steril ke dalam tabung bertanda A, lalu tambahkan  $x_1$  ml ekstrak kulit buah kakao.
- Masukkan  $1-x_2$  ml aquades steril ke dalam tabung bertanda B, lalu tambahkan  $x_2$  ml ekstrak kulit buah kakao.
- Masukkan  $1-x_3$  ml aquades steril ke dalam tabung bertanda C, lalu tambahkan  $x_3$  ml ekstrak kulit buah kakao.

- Masukkan 1-x<sub>4</sub> ml aquades steril ke dalam tabung bertanda D, lalu ditambahkan x<sub>4</sub> ml ekstrak kulit buah kakao.
- Masukkan 1-x<sub>5</sub> ml aquades steril ke dalam tabung bertanda E, lalu ditambahkan x<sub>5</sub> ml ekstrak kulit buah kakao.
- Masukkan 1 ml aquades steril ke dalam tabung bertanda konsentrasi 0%.
- Tambahkan 1 ml biakan cair *Candida albicans* ke dalam setiap tabung kecuali tabung kontrol bahan.
- Dimasukkan 2 ml ekstrak kulit buah kakao ke dalam tabung bertanda KB.
- Dari tabung bertanda KF diambil 1 ose untuk diinokulasikan pada NAP (sebagai *original inoculum* (OI)).
- Semua tabung dan plate *original inoculum* diinkubasikan pada suhu 37°-37,5° C selama 18-24 jam.
- Setelah 18-24 jam, diperhatikan dan dicatat derajat kekeruhan pada semua tabung. Cara membaca derajat kekeruhan adalah dengan meletakkan sebuah kertas putih dibelakang 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.
- Jumlah koloni pada *original inoculum* dihitung dengan menggunakan *colony counter*.
- Untuk mengetahui KBM, lakukan penggoresan dari seluruh tabung pada media NAP, kemudian diinkubasikan pada suhu 37°-37,5° C selama 18-24 jam.

- Setelah 18-24 jam hitung jumlah koloni *Candida albicans* yang tumbuh dengan *colony counter*, konsentrasi terendah dengan jumlah koloni kurang dari 0,1% *original inoculum* adalah KBM.

#### b. Dilusi Agar

Konsentrasi awal ekstrak (V1) adalah 100%. Konsentrasi ekstrak dicampur agar (V2) yang diinginkan adalah 0%, 2%, 3%, 4%, 5%, dan 6%.

- Untuk mendapatkan konsentrasi 0% maka diperlukan 0 ml ekstrak etanol kulit buah kakao dan 10 ml agar
- Untuk mendapatkan konsentrasi 2% maka diperlukan 0,2 ml ekstrak etanol kulit buah kakao dan 9,8 ml agar
- Untuk mendapatkan konsentrasi 3% maka diperlukan 0,3 ml ekstrak etanol kulit buah kakao dan 9,7 ml agar
- Untuk mendapatkan konsentrasi 4% maka diperlukan 0,4 ml ekstrak etanol kulit buah kakao dan 9,6 ml agar
- Untuk mendapatkan konsentrasi 5% maka diperlukan 0,5 ml ekstrak etanol kulit buah kakao dan 9,5 ml agar
- Untuk mendapatkan konsentrasi 6% maka diperlukan 0,6 ml ekstrak etanol kulit buah kakao dan 9,4 ml agar

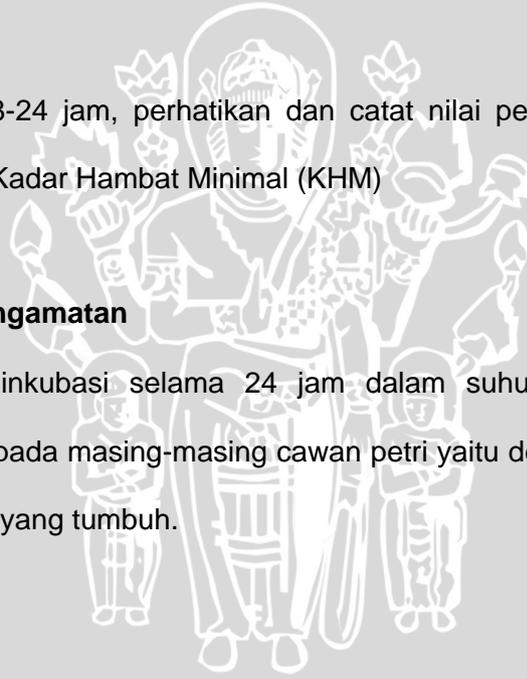
Ekstrak kulit buah Kakao dengan konsentrasi tertentu dicampur dengan Saboraud Dextrose Agar yang masih hangat (40-45°C). Campuran dihomogenkan dengan memutar searah jarum jam.

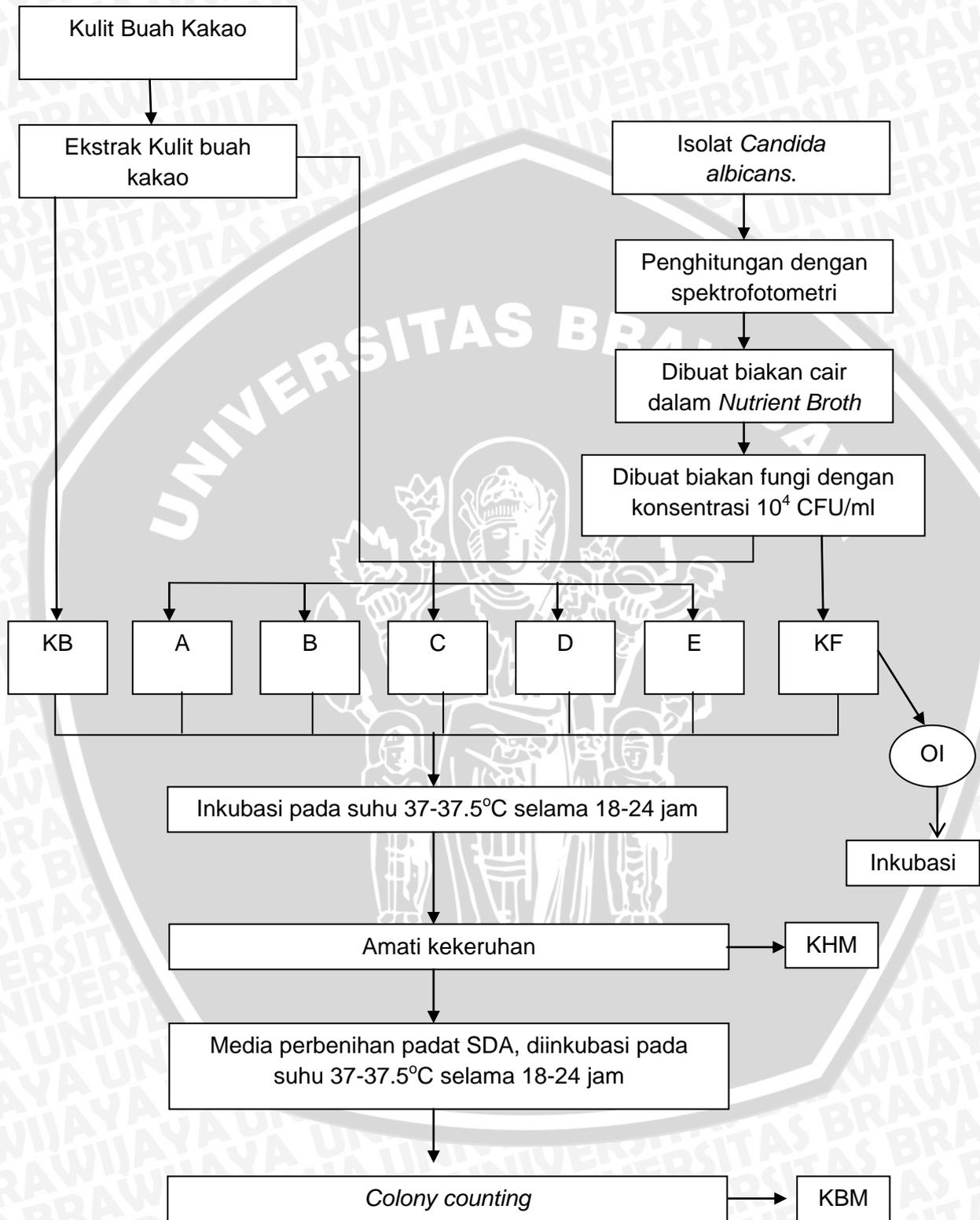
Biarkan cairan mengeras dan dimasukkan ke dalam inkubator selama 18-24 jam pada suhu 37-37,5°C. Untuk sterilitas medium;

- a) Berikan identitas kepada setiap plate agar. Labelkan KF (Kontrol Fungi) pada konsentrasi 0% untuk kontrol *Candida albicans*.
- b) Teteskan 10µl suspensi kultur *Candida albicans* 10<sup>4</sup> CFU/ml dengan mikro pipet pada permukaan agar yang telah disterilisasikan secara tegak lurus. Biarkan suspensi meresap ke dalam agar dalam 2 jam.
- c) Masukkan semua plate ke inkubator selama 18-24 jam pada suhu 37-37,5°C
- d) Setelah 18-24 jam, perhatikan dan catat nilai pertumbuhan koloni. Tentukan Kadar Hambat Minimal (KHM)

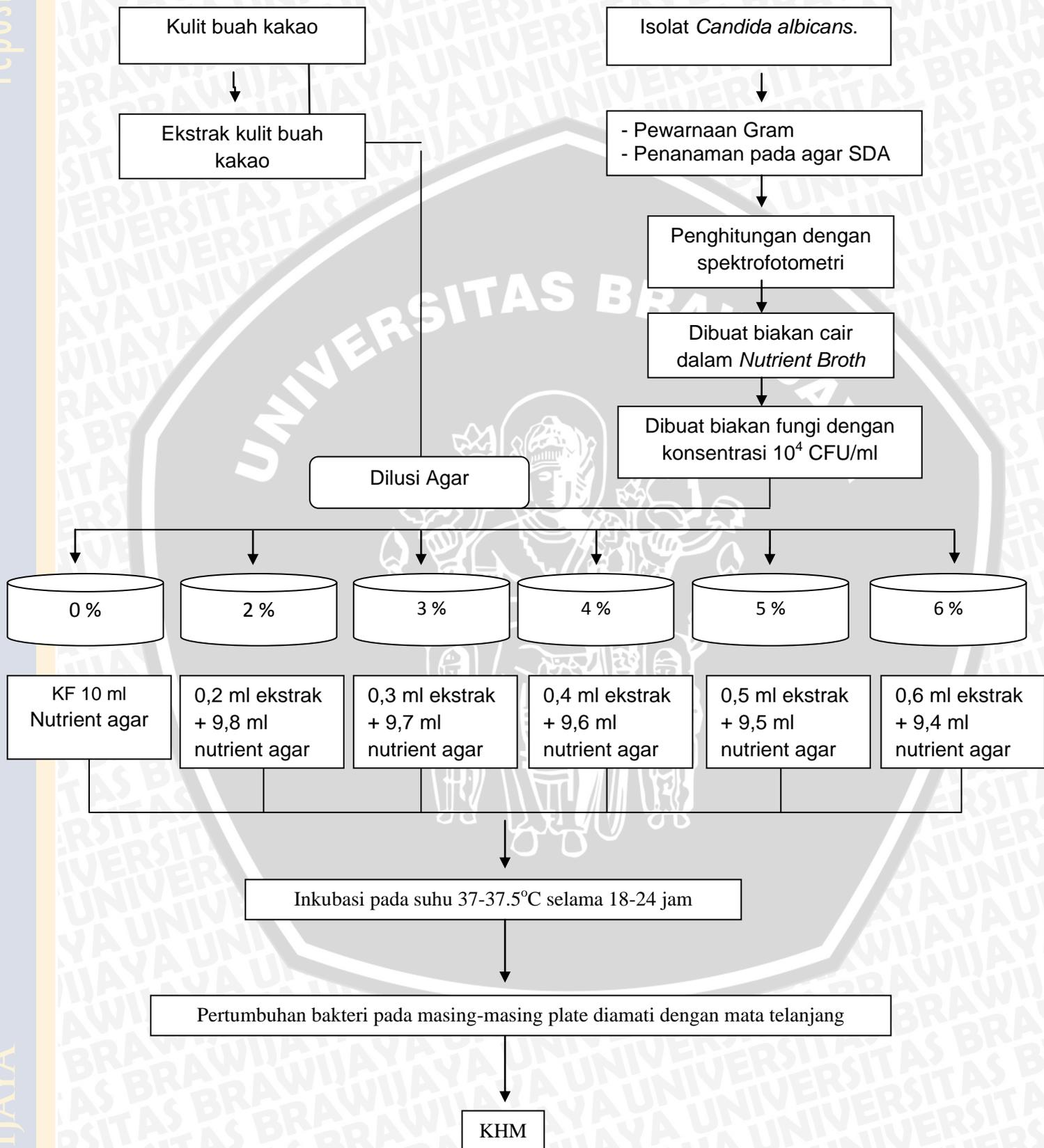
#### 4.8.5 Tahap Pengamatan

Setelah diinkubasi selama 24 jam dalam suhu 37°C, dilakukan pengamatan pada masing-masing cawan petri yaitu dengan menghitung jumlah koloni yang tumbuh.





Gambar 4.1 Alur Kerja Penelitian metode dilusi tabung



Gambar 4.2 Alur Kerja Penelitian metode dilusi agar

#### 4.9 Analisis Data

Penelitian ini menggunakan variabel ordinal yaitu yaitu data kualitatif mengenai pertumbuhan *Candida albicans* yang dihasilkan pada agar plate. Data ordinal terdiri atas >2 kelompok yang tidak berpasangan sehingga uji statistik yang digunakan adalah uji Kruskal Wallis untuk mengetahui adanya perbedaan efektivitas tiap variabel konsentrasi ekstrak kulit buah kakao (*Theobroma cacao*) terhadap pertumbuhan *Candida albicans*. Selain itu, dilakukan uji Mann Whitney untuk mengetahui perlakuan mana saja yang menyebabkan perbedaan pertumbuhan *Candida albicans* secara signifikan, serta uji Korelasi Spearman untuk mengetahui besarnya pengaruh pemberian ekstrak kulit buah kakao (*Theobroma cacao*) terhadap pertumbuhan jamur *Candida albicans*.

