

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Pada penelitian ini digunakan *true experimental design* dengan *post test only control group design*. Dalam penelitian ini dilakukan uji laboratorium yang bertujuan untuk mengetahui dan membuktikan efek antijamur dari ekstrak cangkang buah kawis (*Limonia acidissima*) terhadap pertumbuhan koloni *Candida albicans* secara *in vitro*. Adapun uji kepekaan antijamur yang dipakai adalah dengan metode dilusi agar karena ekstrak cangkang buah kawis (*Limonia acidissima*) berwarna keruh. Tes dilusi agar dilakukan untuk menentukan KHM yang tidak dapat dilakukan dengan metode dilusi tabung oleh karena itu pada penelitian ini menggunakan tes dilusi agar.

4.2 Populasi dan Sampel

Sampel penelitian ini adalah 4 isolat bakteri *Candida albicans* dari pasien yang berbeda. Jumlah isolat tersebut dapat diketahui dengan menggunakan rumus $P(n-1) \geq 15$ (Notobroto, 2005):

Dari rumus diatas perhitungan untuk jumlah perlakuan adalah sebagai berikut:

$$6(n-1) \geq 15$$

$$6n - 6 \geq 15$$

$$6n \geq 21$$

$$n \geq 3,5$$

$$n \geq 4$$

Keterangan:

n = Jumlah isolat

p = Jumlah perlakuan (5 konsentrasi dan 1 kontrol jamur)

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

Variabel Bebas Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi bertingkat ekstrak cangkang buah kawi yaitu 7%; 8%; 9%; 10% dan 11% v/v yang didasarkan pada studi pendahuluan.

4.3.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah pertumbuhan koloni jamur *Candida albicans* yang tumbuh pada medium SDA.

4.4 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang. Pada bulan September 2013 sampai bulan Januari 2014.

4.5 Definisi Operasional

- 4.5.1 Cangkang buah kawis yang digunakan adalah cangkang buah kawis segar dan muda yang berwarna putih keabuan, diameter 9 cm, diperoleh dari Desa Peganden, Kecamatan Manyar, Kabupaten Gresik.
- 4.5.2 Ekstrak cangkang buah kawis adalah bentuk sediaan yang digunakan dalam penelitian ini yang dibuat dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%.
- 4.5.3 Jamur *C.albicans* yang digunakan dalam penelitian adalah 4 isolat jamur *Candida albicans* dari spesimen sekret vagina yang diperoleh dari penderita yang berbeda.
- 4.5.4 Pertumbuhan *C.albicans* dicatat sebagai data ordinal dalam bentuk *scoring* +4, +3, +2, +1, dan 0 yang berarti +4 koloni tumbuh sangat tebal dan tidak terhitung, +3 koloni tumbuh tipis dan tidak terhitung, +2 koloni tumbuh sangat tipis dan tidak terhitung, +1 koloni tumbuh dapat dihitung, dan 0 berarti tidak ada pertumbuhan koloni *C.albicans*

4.6 Instrumen Penelitian

4.6.1 Pembuatan Ekstraksi Cangkang Buah Kawis

Alat yang digunakan adalah timbangan ukur, labu Erlenmeyer, gelas *Beaker*, corong gelas, kertas saring, labu evaporator, labu penampung, evaporator, pendingin spiral, selang *water pump*, *water pump*, *water bath*, *vacuum pump*, botol untuk menampung hasil ekstrak. Bahan yang digunakan adalah cangkang buah kawis, aquades steril, dan etanol 96%.

4.6.2 Identifikasi *Candida albicans*

Alat yang digunakan adalah mikroskop, gelas objek, gelas penutup, api Bunsen, ose, dan minyak emersi. Bahan yang digunakan adalah biakan murni *Candida albicans*, medium *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA), serum mammalia.

4.6.3 Pewarnaan Gram

Alat yang digunakan adalah gelas objek, gelas penutup, api Bunsen, ose, mikroskop perbesaran 100x, bahan pewarna (Kristal violet, lugol, alkohol 96%, safranin), minyak emersi. Bahan yang digunakan adalah aquades dan isolat *Candida albicans*.

4.6.4 Metode Dilusi Agar

Alat yang digunakan adalah *plate* kosong dan steril, mikropipet steril, Bunsen, incubator, vertex. Bahan yang digunakan adalah ekstrak etanol cangkang buah kawis, suspensi jamur uji *C. albicans* dengan kepadatan 10^4 CFU/ml, *Sabouraud Dextrose Broth* (SDB), *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA), aquades steril.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Persiapan Alat

Seluruh alat yang akan digunakan dipersiapkan dalam kondisi steril kemudian disimpan dalam inkubator.

4.7.2 Pembuatan Ekstrak Cangkang Buah Kawis (*Limonia acidissima*)

A. Proses Ekstraksi

- Cangkang buah kawis yang masih segar dan muda (300 g) dicuci dengan air sampai bersih dan dirajang tipis-tipis, setelah itu dijemur dibawah sinar matahari sampai kering.

- Cangkang buah kawi yang sudah kering dihaluskan dengan blender.
- Cangkang buah kawi halus ditimbang dengan menggunakan timbangan analitik sebanyak 300 gram.
- Sampel halus sebanyak 300 gram kemudian dimasukkan ke dalam gelas Beaker.
- Kemudian tambahkan etanol 96%.
- Kocok sampai benar-benar tercampur kurang lebih 30 menit.
- Campuran didiamkan minimal 2 x 24 jam.
- Etanol 96% yang digunakan untuk merendam diganti beberapa kali, sampai air ekstrak jernih.

B. Proses Evaporasi

- Saring bahan dengan menggunakan kertas saring whatman no 40.
- Masukkan dalam labu evaporasi pada evaporator.
- Isi water bath dengan air sampai penuh.
- Pasang semua rangkaian alat, termasuk *rotary evaporator*, pemanas *water bath* atur sampai 90°C, sambungkan dengan aliran listrik.
- Biarkan larutan etanol memisah dengan zat aktif yang sudah ada dalam labu.
- Tunggu sampai aliran etanol berhenti menetes pada labu penampung, kurang lebih 1,5 sampai 2 jam untuk satu labu.
- Masukkan hasil ekstraksi dalam botol plastik atau kaca.
- Simpan dalam refrigerator.

4.7.3 Identifikasi *C.albicans*

A. Pembuatan Sediaan Apusan

- Gelas objek dibersihkan dengan kapas, kemudian dilewatkan di atas api untuk menghilangkan lemak dan biarkan dingin.
- Satu ose akuades 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.
- Sediaan dikeringkan di udara, kemudian dilakukan fiksasi dengan cara melewatkan sediaan di atas api.
- Sediaan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Akuades dan SDB disterilkan kemudian dimasukkan ke dalam lemari es.

B. Pewarnaan Gram

- Sediaan pada gelas objek ditetesi dengan kristal violet selama 1 menit. Sisa kristal violet dibuang dan dibilas dengan air.
- Sediaan ditetesi dengan lugol selama 1 menit. Sisa lugol dibuang dan dibilas dengan air.
- Sediaan ditetesi dengan alkohol 96% selama 5-10 detik atau sampai warna cat luntur. Sisa alkohol dibuang dan dibilas dengan air.
- Sediaan ditetesi safranin selama 30 detik. Sisa safranin dibuang dan dibilas dengan air.
- Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap.

- Sediaan dilihat dibawah mikroskop dengan lensa objektif perbesaran 40 kali.
- Hasil positif: ditemukan bentukan *budding cells* yang tercatat ungu (Gram positif) dan sel berbentuk oval.

4.7.4 Tes *Germinating Tube*

- Isolat jamur diambil dari perbenihan dengan menggunakan ose yang sudah disterilisasi dengan cara pembakaran.
- Isolat jamur dimasukkan ke dalam tabung yang berisi serum mammalia 0,5 mL.
- Diinkubasikan pada 37°C selama kurang lebih 4 jam.
- Kultur di dalam serum diambil menggunakan ose dan diletakkan pada gelas objek, lalu ditutup dengan gelas penutup.
- Diamati di bawah mikroskop dengan lensa objektif pembesaran 40 kali.
- Dicari bentukan *pseudohifa* memanjang khas *C. albicans*.

4.7.5 Persiapan Suspensi Jamur Uji *Candida albicans*

Cara mempersiapkan suspensi uji jamur yang jumlah koloninya ditentukan dengan menggunakan spektrofotometer. Dengan demikian, persiapan suspensi uji *C. albicans* dapat dilakukan sebagai berikut (Dzen *et al.*, 2003):

- Dipersiapkan jamur *Candida albicans* dari SDA yang telah diuji konfirmasi dengan pewarnaan gram dan *germinating tube test*.
- Ambil 5 koloni ($d \geq 1\text{mm}$) dengan ose kemudian dimasukkan dalam 5 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 1×10^6 CFU/mL dengan rumus:

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

Keterangan:

N_1 = hasil spektrofotometri

V_1 = volume suspensi jamur yang akan ditambah pengencer

N_2 = OD (0,1 setara dengan 10^6 CFU/mL)

V_2 = volume suspensi jamur uji (10 mL).

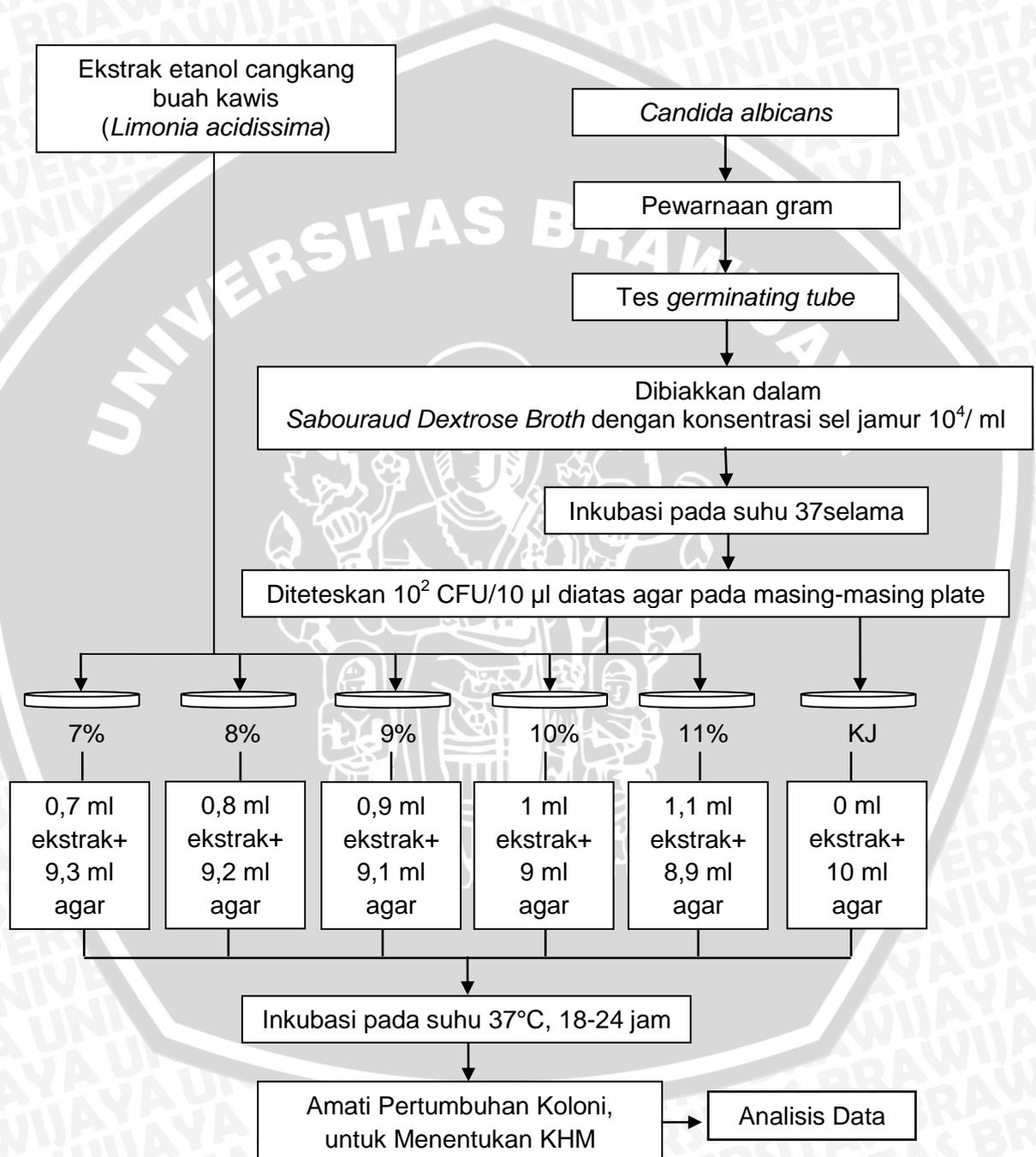
- Untuk mendapatkan suspensi jamur yang mengandung 10^4 CFU/mL yaitu dengan cara mengambil 1 mL dari tabung yang mengandung 10^6 CFU/mL untuk dicampur dengan 9 mL NaCl 0,85% steril, dan didapatkan suspensi dengan kepadatan 10^5 CFU/mL. Dilanjutkan dengan mengambil 1 mL dari tabung dengan 10^5 CFU/mL untuk dicampur dengan 9 mL SDB sehingga didapatkan suspensi jamur uji dengan kepadatan 10^4 CFU/mL.
- Sebelum dimulai penelitian, dilakukan uji pendahuluan dahulu untuk mendapatkan konsentrasi perlakuan. Uji pendahuluan cangkang buah kawis yang pertama digunakan konsentrasi yaitu 5%, 10%, 15%, dan 0%. Berdasarkan hasil uji pendahuluan didapatkan pada konsentrasi 15% cangkang buah kawis sudah tidak didapatkan pertumbuhan koloni jamur *Candida albicans*. Lalu dilakukan perapatan dosis yaitu konsentrasi 6%, 7%, 8%, 9%, dan 10%, karena hasil koloninya tidak signifikan maka dilakukan pengulangan dengan menambahkan 1 konsentrasi sehingga dapat ditentukan konsentrasi yang tepat pada penelitian. Konsentrasi ekstrak yang digunakan dalam penelitian ini adalah 7%, 8%, 9%, 10%, dan 11%; .

4.7.6 Uji Antijamur Ekstrak Etanol Cangkang Buah Kawis (*Limonia Acidissima*) terhadap *Candida albicans*

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

- Disediakan 6 *plate* steril berdiameter 9 cm dan telah diberi tanda berdasarkan presentase larutan ekstrak yang dicampur dalam dilusi agar, yaitu 7%; 8%; 9%; 10%; dan 11% v/v . Setelah dicampur larutan ekstrak agar kemudian dipanaskan, lalu ditunggu hingga agarnya dingin.
- Volume yang dipakai dalam setiap *plate* untuk mencampur agar adalah 10 ml, jadi volume ekstrak yang dimasukkan ke dalam *plate* 0%; 7%; 8%; 9%; 10% dan 11% adalah berturut-turut 0 ml; 0,7 ml; 0,8 ml; 0,9 ml; 1 ml dan 1,1 ml. Sedangkan sisanya adalah volume agar yang telah dipanaskan.
- Jumlah sel Jamur *C. albicans* yang dipakai adalah 10^4 CFU/ml.
- Setelah agar dingin, setiap *plate* tersebut ditandai menjadi 4 bagian yang pada setiap bagian ditetesi jamur *C. albicans* sebanyak 10^2 CFU/10 μ l.
- Biarkan suspensi meresap seluruhnya ke dalam agar dalam 2 jam. Kemudian semua *plate* diinkubasikan selama 18-24 jam pada suhu 37-37,5°C.
- Setelah itu koloni yang tumbuh pada agar *plate* dibaca. Konsentrasi ekstrak pada dilusi agar *plate* yang tidak ditemukan adanya pertumbuhan koloni dapat disebut sebagai KHM larutan ekstrak.

4.7.7 Skema Prosedur



Gambar 4.1 Alur Uji Antijamur Ekstrak Etanol Cangkang Buah Kawis terhadap *Candida albicans*

4.8 Analisis Data

Data hasil penelitian ini berupa data ordinal, karena itu digunakanlah uji statistik non parametrik untuk mengolah data. Uji statistik non parametrik yang digunakan antara lain yaitu *Kruskal-Wallis*, *Mann-Whitney*, dan korelasi *Spearman*, dengan derajat kepercayaan sebesar 95% ($\alpha=0,05$) (Patria, 2011).

