

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Desain penelitian yang dilakukan adalah penelitian *True Experimental – Post Test only Control Group Design* laboratorik dengan menggunakan metode dilusi tabung untuk mengetahui potensi ekstrak buah stroberi (*Fragaria ananassa*) dalam mempengaruhi pertumbuhan jamur *Candida albicans* secara *in vitro*. Pengujian ekstrak buah stroberi sebagai antifungi menggunakan metode dilusi meliputi 2 tahap, yaitu tahap pengujian bahan pada media *Sabouraud Dextrose Broth* untuk menentukan Kadar Hambat Minimum (KHM) dan tahap penanaman pada medium *Sabouraud Dextrose Agar* dengan metode *streaking* (penggoresan) yang bertujuan untuk menentukan Kadar Bunuh Minimal (KBM). Rancangan penelitian menggunakan lima kelompok perlakuan , ditambah dengan *Original Inoculum*.

4.2 Tempat dan Waktu penelitian

Pembuatan ekstrak buah stroberi dilakukan di Politeknik Negeri Malang. Sedangkan penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya pada bulan Maret 2014 sampai bulan April 2014.

4.3 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak buah stroberi (*Fragaria ananassa*) dan menggunakan jamur uji yaitu *Candida albicans* yang diambil dari *stock culture* milik Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4.4 Besar Sampel

Pada penelitian ini digunakan konsentrasi final buah stroberi 5% , 7,5%, 10%, 12,5%, 15% . Maka berdasarkan perhitungan rumus $p(n-1) \geq 15$ (Loekito, 1998) didapatkan besar pengulangan :

$$5(n-1) \geq 15$$

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 20/5$$

$$n \geq 4$$

Keterangan : n = jumlah sampel

P = jumlah perlakuan

Jadi pada penelitian ini menggunakan jumlah pengulangan sebanyak empat kali.

4.5 Variabel penelitian

4.5.1 Variabel bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak buah stroberi. Konsentrasi akhir buah stroberi yang diuji adalah 5%, 7,5%, 10%, 12,5%, 15%. Konsentrasi ditentukan berdasarkan penelitian eksplorasi awal.

4.5.2 Variabel tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah kekeruhan pada media *Sabouraud Dextrose Broth* untuk menentukan KHM dan jumlah koloni *Candida albicans* pada media *Sabouraud Dextrose Agar* untuk menentukan KBM.

4.6 Definisi operasional

- Ekstrak buah stroberi yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari toko buah di daerah Malang. Buah stroberi yang digunakan adalah yang masih segar dan berwarna merah.
- Ekstrak buah stroberi (*Fragaria ananassa*) adalah ekstraksi bahan aktif buah stroberi yang telah dikeringkan menggunakan etanol 96% dengan pemanasan menggunakan alat Soxhlet.

- Kadar Hambat Minimal (KHM) adalah kadar atau konsentrasi terendah larutan ekstrak buah stroberi (*Fragaria ananassa*) yang mampu menghambat pertumbuhan jamur uji (*Candida albicans*), yang ditandai konsentrasi pertama yang tidak terjadi kekeruhan pada tabung.
- Kadar Bunuh Minimal (KBM) adalah konsentrasi terendah larutan ekstrak buah stroberi yang mampu membunuh jamur uji (*Candida albicans*), ditandai dengan tidak adanya pertumbuhan koloni jamur.

4.7 Alat dan Bahan

4.7.1 Alat Untuk Pembuatan Ekstrak:

- Labu *Elenmeyer*
- Alkohol
- Gelas ekstrak
- Botol steril 1 buah
- Tabung ekstraktor Soxhlet
- *Evaporator*
- Tabung reaksi steril
- Gelas obyek
- Kapas
- Spidol permanen
- Stiker label
- Kertas saring

4.7.2 Alat Untuk Penelitian:

- Gelas objek
- Ose
- Bunsen
- Tabung reaksi kosong
- *Vortex*
- Inkubator dengan suhu 37°C
- Korek api
- Plate kosong steril
- Mikroskop
- Spektrofometri
- *Colony counter*
- Mikropipet
- Kapas

4.7.3 Bahan :

- Jamur uji *Candida albicans* dengan kepadatan 10^6 CFU/ml (*Colony Forming Unit/ml*)
- Ekstrak buah stroberi yang telah dikeringkan 50 gram
- Etanol 96% 1000ml
- Akuades steril
- NaCl 0,85%
- Minyak emersi
- Pewarnaan *Gram* : *crystal violet*, lugol, Alkohol 96%, safranin
- Alkohol 70%

- *Sabouraud Dextrose Agar dan Sabouraud Dextrose Broth*

4.8 Prosedur Penelitian

4.8.1 Ekstrak Etanol Buah Stroberi

4.8.1.1 Proses Ekstraksi

Buah stroberi dipotong kecil-kecil kemudian dikeringkan di bawah sinar matahari sampai benar-benar kering. Setelah kering, haluskan dengan blender dan timbang berat seberat 50 gram. Buah stroberi yang sudah halus tersebut kemudian dibungkus kertas saring dan dimasukkan ke dalam tabung ekstraktor Soxhlet. Kemudian ke dalam tabung tersebut ditambahkan pelarut etanol 96% dan dimasukkan ke dalam labu *erlenmeyer*. Kocok sampai benar-benar tercampur (\pm 30 menit). Selanjutnya labu yang telah berisi pelarut etanol didiamkan selama 1 malam sampai mengendap.

4.8.1.2 Proses Evaporasi

Diambil lapisan atas campuran etanol dengan zat aktif buah stroberi yang sudah terlarut, lalu dimasukkan dalam labu evaporasi 1 liter pada *evaporator*. Selanjutnya labu evaporasi dipasang pada *evaporator* dan *water bath* diisi dengan air sampai penuh. Kemudian semua rangkaian alat dipasang, termasuk *rotary evaporator* dan pemanas *water bath*, diatur hingga suhu 90°C sesuai titik didih etanol, sambungkan dengan listrik. Biarkan larutan etanol memisah dengan zat aktif yang sudah ada dalam labu. Hasil penguapan etanol dikondensasikan menuju labu

penampung etanol agar tidak tercampur hasil evaporasi dan uap lain tersedot pompa vakum.

Evaporasi dihentikan setelah aliran etanol berhenti menetes pada labu penampung (\pm 1,5 sampai 2 jam untuk 1 labu). Hasil ekstraksi buah stroberi diperoleh ekstrak berupa cairan sebanyak 5 ml dan dianggap sebagai konsentrasi 100%

4.8.2 Identifikasi *Candida albicans*

4.8.2.1 Pengecatan Gram

- Bersihkan gelas objek dengan kapas steril, kemudian lewatkan diatas api dan dinginkan sebentar
- Satu tetes akuades steril diteteskan ke gelas obyek
- Satu ose jamur dari biakan cair diletakkan pada gelas obyek lalu ditunggu hingga kering
- Fiksasi dengan melewati gelas obyek di atas api
- Beri larutan *crystal violet* pada sediaan, lalu biarkan selama 1 menit
- Bilas sediaan dengan air yang mengalir
- Beri larutan *lugol* pada sediaan, lalu dibiarkan selama 1 menit
- Bilas sediaan dengan air mengalir
- Beri larutan alkohol 96% pada sediaan selama 5-10 detik
- Bilas kembali sediaan dengan air yang mengalir
- Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap, ditetesi minyak emersi dan dilihat dibawah mikroskop dengan lensa objektif 100x

- Dicari adanya jamur *Candida albicans* bersifat gram positif (tercatungu) berbentuk *budding*

4.8.2.2 Uji *Germinating Tube*

- Isolat jamur diambil menggunakan ose yang sudah disterilisasi menggunakan pembakaran.
- Dimasukkan tabung yang berisi serum mamalia 0,5 ml.
- Diinkubasikan dengan suhu 37⁰ C selama kurang lebih 4 jam.
- Kultur dalam serum diambil menggunakan ose dan diletakkan pada gelas objek lalu ditutup dengan penutup.
- Diamati dibawah mikroskop dengan lensa objektif perbesaran 40x.
- Dicari bentukan pseudohifa memanjang khas *Candida albicans*.

4.8.2.3 Pembuatan Suspensi Jamur *Candida albicans*

- Dipersiapkan jamur *Candida albicans* dari SDA yang telah diuji konfirmasi.
- Diambil beberapa koloni dengan ose kemudian dimasukkan ke dalam NACl 0,85% steril. Kemudian diukur dengan OD 0,1 dan *spektrofotometer* pada panjang gelombang 530 nm. Dari hasil yang diperoleh suspensi sel untuk *yeast* yang mengandung 1×10^6 hingga 5×10^6 CFU/ml.
- Untuk mendapatkan suspensi sel yang mengandung (0,5 - 2,5) $\times 10^3$ CFU/ml dilakukan dengan cara mengambil 1 ml (dari tabung yang mengandung 10^6 CFU/ml) untuk dicampur dengan 9ml NACl 0,85% steril. Maka akan didapatkan suspensi sel dengan

konsentrasi 10^5 CFU/ml. Proses dilanjutkan 2 kali untuk mendapatkan konsentrasi suspensi jamur yang digunakan untuk tes, yaitu $(0,5 - 2,5) \times 10^3$ CFU/ml. (Murray *et al*, 1999)

4.8.3 Penelitian Pendahuluan

Penelitian eksplorasi dilakukan terlebih dahulu sebelum menentukan konsentrasi perlakuan. Pada penelitian kali ini dilakukan 1 kali penelitian pendahuluan untuk mengetahui efek dan rentang dosis yang tepat dari ekstrak tanaman stroberi yang dapat menghambat bahkan membunuh jamur *Candida albicans*. Penelitian eksplorasi dilakukan dengan menggunakan rentang dosis konsentrasi final 0%, 5%, 10%, 15%, 20%, dan 25% yang kemudian dilakukan *streaking* pada media SDA dan diinkubasikan selama kurang lebih 18-24 jam. Dari penelitian tersebut didapatkan pada konsentrasi final 15% tidak didapatkan pertumbuhan koloni jamur *Candida albicans*. Konsentrasi final yang digunakan dalam penelitian berikutnya adalah 5%, 7,5%, 10%, 12,5%, 15%. Konsentrasi-konsentrasi tersebut digunakan dalam penelitian ini karena berdasarkan hasil eksplorasi jamur tidak tumbuh di SDA pada konsentrasi 15% keatas, sementara rentang konsentrasi kecil digunakan untuk mendapatkan persamaan regresi yang lebih teliti. Berapapun jarak antar konsentrasinya, hal pokok yang perlu ditekankan adalah mencari bukti adanya *dose-effect relationship* antara konsentrasi ekstrak stroberi dan pertumbuhan koloni *Candida albicans*.

4.8.4 Uji Kepekaan Ekstrak Tanaman Stroberi Terhadap Jamur

Candida Albicans

- Sediakan 5 tabung reaksi steril kemudian diberi label 5%, 7,5%, 10%, 12,5%, dan 15% .
- Pada tabung reaksi dengan label 5%, 7,5%, 10%, 12,5%, 15% masing masing diisi dengan ekstrak tanaman stroberi , akuades serta 1ml jamur. Sehingga didapatkan konsentrasi ekstrak tanaman stroberi yang bertingkat pada masing masing tabung yang ditentukan sudah dilakukan penelitian pendahuluan.
- Sebelumnya dipersiapkan tabung dengan konsentrasi ekstrak 50% dengan cara memasukkan 1,5ml ekstrak tanaman stroberi dengan konsentrasi 100% ditambahkan dengan 1,5ml akuades ke dalam tabung sehingga konsentrasi ekstrak tanaman stroberi sebesar 50%. Hal ini dilakukan untuk memudahkan pengambilan ekstrak menggunakan pipet.
- Pada tabung dengan label buah stroberi 5% tersebut, dimasukkan 0,2 ml ekstrak dengan konsentrasi 50% ditambah dengan akuades sebanyak 0,8ml, sehingga konsentrasi ekstrak stroberi sebanyak 10%.
- Pada tabung dengan label buah stroberi 7,5% tersebut, dimasukkan 0,3 ml ekstrak dengan konsentrasi 50% ditambah dengan akuades sebanyak 0,7ml , sehingga konsentrasi ekstrak stroberi 15%.

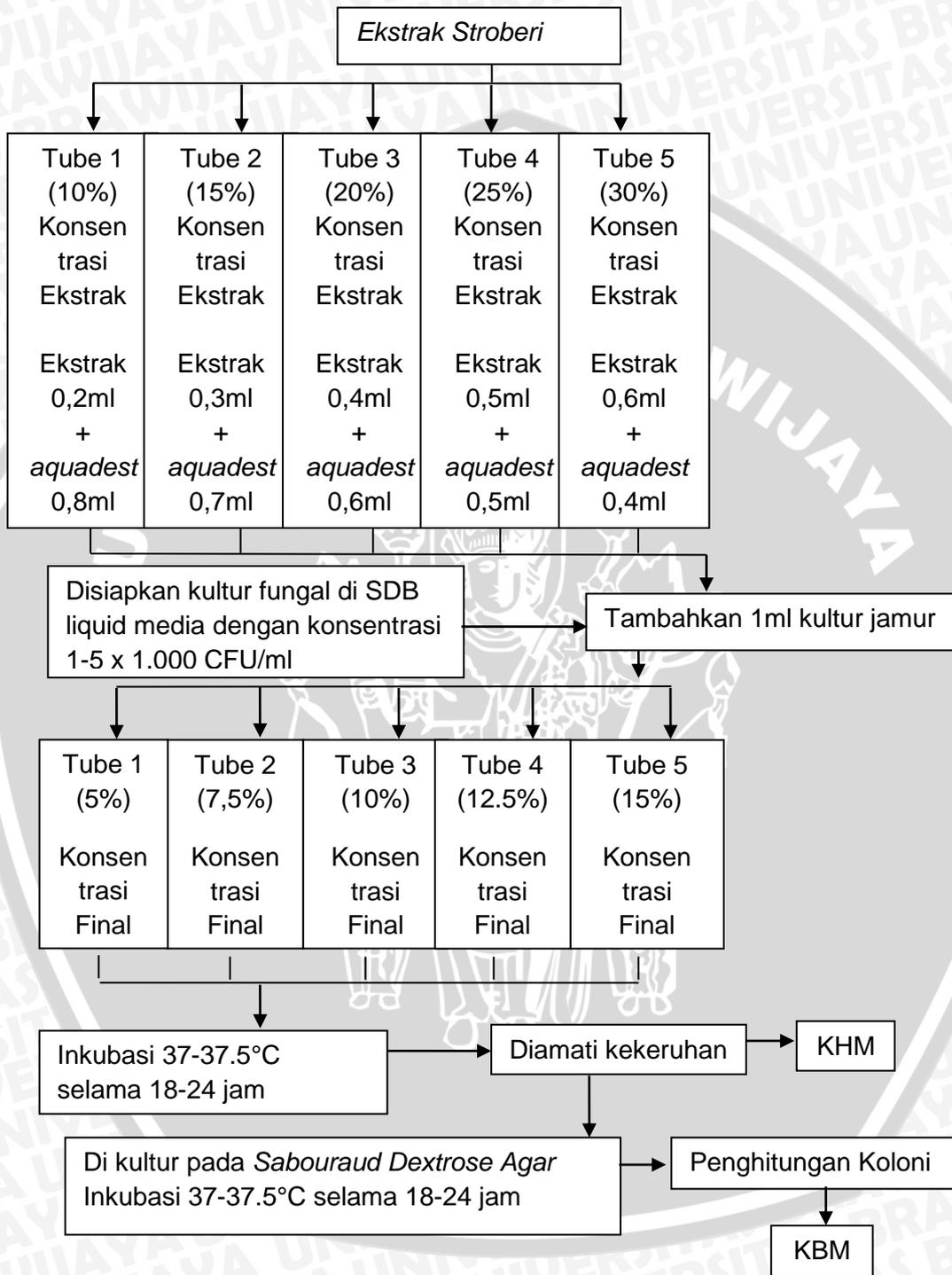
- Pada tabung dengan label buah stroberi 10% tersebut, dimasukkan 0,4 ml ekstrak dengan konsentrasi 50% ditambah dengan akuades sebanyak 0,6 ml, sehingga konsentrasi ekstrak stroberi sebanyak 20%.
- Pada tabung dengan label buah stroberi 12,5% tersebut, dimasukkan 0,5 ml ekstrak dengan konsentrasi 50% ditambah dengan akuades sebanyak 0,5ml, sehingga konsentrasi ekstrak stroberi sebanyak 25%.
- Pada tabung dengan label buah stroberi 15% tersebut, dimasukkan 0,6 ml ekstrak dengan konsentrasi 50% ditambah dengan akuades sebanyak 0,4ml, sehingga konsentrasi ekstrak stroberi sebanyak 30%.
- Pada ke 5 tabung reaksi diatas masing masing ditambahkan 1ml jamur *Candida albicans* yang diambil dari *stock culture* sehingga konsentrasi akhir menjadi 5%, 7,5%, 10%, 12,5%, dan 15%.
- Semua tabung diinkubasikan pada suhu 37°C – 37,5°C selama 18 - 24 jam.
- Setelah 18 - 24 jam, perhatikan dan catat derajat kekeruhan pada semua tabung, Konsentrasi paling rendah yang tidak menunjukkan kekeruhan adalah KHM.
- Untuk mengetahui KBM, lakukan penggoresan sebanyak 1 ose pada media *Sabouraud Dextrose Agar*, kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C-37,5°C selama 18 - 24 jam.
- Setelah 18 - 24 jam, hitung jumlah koloni *Candida albicans* yang tumbuh dengan *colony counter*.

4.9 ANALISIS DATA

Analisis data yang digunakan adalah uji statistik *one way ANOVA*. Uji statistik *one way ANOVA* dengan derajat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$) digunakan untuk mengetahui adanya pengaruh pemberian berbagai konsentrasi ekstrak tanaman stroberi (*Fragaria ananassa*) terhadap jumlah koloni jamur *Candida albicans* dan untuk mengetahui apakah ada perbedaan antar kelompok dan *Post-Hoc Test (Bonferroni)* untuk mengetahui antara kelompok mana yang berbeda bermakna. Analisis data menggunakan program SPSS untuk windows versi 17.0.



4.10 Alur Prosedur Percobaan



Gambar 4.1 Skema Prosedur Penelitian

