

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah menggunakan metode *true experimental design* dengan *post test only control group design*. Dalam penelitian ini dilakukan uji laboratorium yang bertujuan untuk mengetahui efek antifungi dari minyak atsiri serai dapur (*Cymbopogon citratus*) terhadap pertumbuhan koloni *Candida albicans*. Adapun uji kepekaan antimikroba/antifungi yang dipakai adalah metode difusi disk/cakram.

4.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dan dilaksanakan pada bulan November 2013 sampai April 2014.

4.3 Populasi dan Sampel

Populasi dan sampel yang digunakan adalah isolat jamur *Candida albicans* yang diperoleh dari stok kultur Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Sampel penelitian diambil dengan teknik *random sampling*. Sampel penelitian ini adalah pertumbuhan jamur *Candida albicans* dari banyaknya pengulangan pada penelitian ini yang dapat ditentukan dengan rumus (Solimun, 2001):

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

Keterangan:

p = jumlah perlakuan

n = jumlah ulangan yang diperlukan

Penelitian ini menggunakan 5 konsentrasi dari minyak atsiri tanaman serai, satu kontrol positif dan satu kontrol negatif ($p = 5+2 = 7$) maka didapatkan jumlah pengulangan:

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

$$7n - 7 \geq 15$$

$$7n \geq 22$$

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

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

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah minyak atsiri tanaman serai dapur (*Cymbopogon citratus*) dengan konsentrasi 40%, 20%, 10%, 5% dan 2,5% (v/v). Konsentrasi tersebut diperoleh berdasar hasil penelitian pendahuluan. Penelitian pendahuluan diawali dengan konsentrasi 100%; 50%; 25%; 12,5%; 6,25%; 3,125% dan 0% (v/v). Setelah itu dilakukan perapatan konsentrasi berdasarkan hasil dari penelitian tersebut hingga dicapai minyak atsiri serai dengan konsentrasi 40%, 20%, 10%, 5% dan 2,5% (v/v)

4.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah pertumbuhan *Candida albicans* yaitu dengan mengukur diameter zona bening/zona hambat jamur *Candida albicans* di sekitar disk.

4.5 Definisi Operasional

4.5.1 Tanaman serai yang digunakan adalah jenis serai dapur (*Cymbogopon citratus*) yang didapat dari Balai Materia Medica, UPT Dinas Kesehatan Provinsi Jawa Timur, Kota Batu. Tanaman serai dapur yang digunakan adalah tanaman yang telah siap panen, yaitu tanaman serai dapur yang memiliki ciri fisik jumlah daun tua 6 – 8 lembar pada setiap rumpunnya. Memiliki daun berwarna hijau tua dan apabila daun diremas, maka tercium aroma wangi yang kuat (Lampiran 1).

4.5.2 Minyak atsiri serai dapur adalah minyak atsiri yang didapatkan dari serai dapur segar yang diangin-anginkan selama \pm 1 minggu, dipotong-potong dan dilakukan penyulingan dengan metode distilasi uap selama \pm 4 jam di Laboratorium Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya Malang.

4.5.3 Isolat jamur yang digunakan adalah jamur *Candida albicans* yang diperoleh dari swab tenggorokan dan merupakan stok kultur Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, secara mikroskopis terlihat dengan bentuk yang berbeda-beda yaitu *budding cell*/sel tunas, *pseudohifa*/hifa dan *germ tube*.

4.5.4 Zona hambat adalah daerah pada metode difusi disk yang ditandai dengan adanya daerah jernih di sekitar disk pada media padat *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) yang berisi jamur *Candida albicans* yang telah

diberi minyak atsiri serai dapur (*Cymbopogon citratus*) dan diukur diameternya menggunakan kaliper. Interpretasi daerah hambatan pertumbuhan jamur mengacu pada standar umum obat asal tanaman yakni diameter zona hambat di sekitar *disc* ekstrak berukuran 12-24 mm (Hermawan, 2007).

4.6 Alat dan Bahan

4.6.1 Alat

4.6.1.1 Alat untuk Pembuatan Minyak Atsiri Serai Dapur

- a. Alat distilasi (*clevenger*)
- b. Timbangan/neraca analitik
- c. Labu ukur
- d. Pemanas
- e. Ketel bahan
- f. Botol steril untuk hasil minyak

4.6.1.2 Alat untuk Identifikasi jamur *Candida albicans*

- a. *Bunsen burner*
- b. *Object glass*
- c. Mikroskop
- d. Kertas penghisap
- e. Ose

4.6.1.3 Alat untuk Tes Difusi Cakram

- a. Cawan petri steril

- b. Mikropipet
- c. *Swab applicator*
- d. Inkubator
- e. *Bunsen burner*
- f. Label
- g. Pinset
- h. Kaliper
- i. Pipet pengencer (*eppendorf*)
- j. Spektrofotometer
- k. Vortex

4.6.2 Bahan

4.6.2.1 Bahan untuk Pembuatan Minyak Atsiri Serai Dapur

- a. Serai dapur (*Cymbopogon citratus*)
- b. Aquades steril

4.6.2.2 Bahan untuk Identifikasi jamur *Candida albicans*

- a. Kapas
- b. Aquades steril
- c. Bahan pewarnaan Gram (kristal violet, lugol, alkohol 96%, safranin)
- d. Isolat jamur *Candida albicans*
- e. Serum mamalia/putih telur/ plasma 0,5 ml

4.6.2.3 Bahan untuk Tes Difusi Cakram

- a. Minyak atsiri serai dapur

- b. Isolat jamur *Candida albicans*
- c. Aquades steril
- d. SDA (*Sabouraud Dextrose Agar*)
- e. Dimetil Sulfoksida (DMSO) 1%
- f. *Nystatin* 100.000 IU/ml
- g. NaCl
- h. *Blank disc* berdiameter 6 mm

4.7 Rancangan Operasional Penelitian

4.7.1 Pembuatan Minyak Atsiri Serai Dapur (Lampiran 2)

4.7.1.1 Serai dicuci hingga bersih kemudian diangin-anginkan pada suhu ruang selama ± 7 hari (Yusdar dkk., 2013).

4.7.1.2 Serai yang telah bersih dipotong kecil-kecil (Sukanto dkk., 2011).

4.7.1.3 Potongan serai yang telah diperoleh ditimbang kemudian dimasukkan ke dalam ketel bahan/alat distilasi

4.7.1.4 Kemudian dilakukan distilasi uap selama ± 4 jam

4.7.1.5 Minyak atsiri dipisahkan dengan air menggunakan cleverger berdasarkan berat jenisnya.

4.7.1.6 Pisahkan lagi minyak dan air yang masih ada menggunakan pipet tetes dalam labu ukur sehingga didapatkan minyak atsiri serai dengan konsentrasi 100%. Pemisahan senyawa dengan distilasi bergantung pada perbedaan tekanan uap senyawa dalam campuran.

4.7.1.7 Setelah proses distilasi selesai, minyak atsiri disimpan dalam botol agar dapat digunakan (Andrianto, 2009).

4.7.2 Identifikasi *Candida albicans*

4.7.2.1 Pewarnaan Gram (Murray,1999).

- 4.7.2.1.1 Gelas objek dibersihkan dengan kapas, kemudian dilewatkan di atas api untuk menghilangkan lemak dan dibiarkan dingin.
- 4.7.2.1.2 Satu ose (1 μ l) 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.
- 4.7.2.1.3 Sediaan dikeringkan di udara, kemudian dilakukan fiksasi dengan cara melewatkan sediaan di atas api.
- 4.7.2.1.4 Sediaan pada gelas objek ditetesi dengan kristal violet selama 1 menit. Sisa kristal violet dibuang dan dibilas dengan air.
- 4.7.2.1.5 Sediaan ditetesi dengan lugol selama 1 menit. Sisa lugol dibuang dan dibilas dengan air.
- 4.7.2.1.6 Sediaan ditetesi dengan alkohol 96% selama 5-10 detik atau sampai warna cat luntur. Sisa alkohol dibuang dan dibilas dengan air.
- 4.7.2.1.7 Sediaan ditetesi safranin selama $\frac{1}{2}$ menit (30 detik). Sisa safranin dibuang dan dibilas dengan air.
- 4.7.2.1.8 Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap.
- 4.7.2.1.9 Sediaan dilihat di bawah mikroskop dengan pembesaran 1000x dengan intensitas sinar rendah.
- 4.7.2.1.10 Hasil positif: *Candida albicans* tercat ungu (Gram positif) berbentuk oval dan *budding* (Bhavan *et al.*, 2010).

4.7.2.2 Uji *Germinating Tube*

- 4.7.2.2.1 Isolat jamur diambil dari perbenihan dengan menggunakan ose yang sudah disterilisasi dengan cara pembakaran.
- 4.7.2.2.2 Dimasukkan ke dalam tabung yang berisi serum mamalia/putih telur/plasma 0,5 ml.
- 4.7.2.2.3 Diinkubasikan pada suhu 37°C selama 1,5 sampai 2 jam (Jawetz *et al.*, 2010).
- 4.7.2.2.4 Kultur di dalam serum diambil menggunakan ose dan diletakkan pada gelas objek, lalu ditutup dengan gelas penutup.
- 4.7.2.2.5 Diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 400x.
- 4.7.2.2.6 Dicari bentukan *germ tube* memanjang dari sel induk (*yeast*) khas *Candida albicans* (Kim *et al.*, 2002).

4.7.3 Pembuatan Suspensi Uji Jamur *Candida albicans*

- 4.7.3.1 Dipersiapkan jamur *Candida albicans* dari SDA yang telah diuji konfirmasi.
- 4.7.3.2 *Candida albicans* yang telah diidentifikasi dibiakkan/ditanam pada media SDA steril kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Kultur tersebut kemudian dicocokkan dengan standar 0.5 *Mc Farland* dengan cara mengambil 5 koloni ($d \geq 1$ mm) dengan ose kemudian dimasukkan ke dalam 5 ml NaCl 0,85% steril, diukur *Optical Density* (OD) atau kepadatan optisnya dengan spektrofotometer pada $\lambda_{\text{maks}} = 530$ nm, sehingga diperoleh hasil suspensi sel jamur yang mengandung $1 \times 10^6 - 5 \times 10^6$ CFU/ml (Sheehan *et al.*, 2004).

4.7.4 Uji Aktivitas Antifungi Minyak Atsiri Serai Dapur (*Cymbopogon citratus*) terhadap *Candida albicans* dengan Metode Difusi Cakram

4.7.4.1 Biakan *Candida albicans* digoreskan (*streaking*) pada media *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA)

4.7.4.2 Dilakukan penelitian pendahuluan digunakan untuk pencarian konsentrasi. Diawali dengan konsentrasi 100%; 50%; 25%; 12,5%; 6,25%; 3,125% dan 0% (v/v). Setelah itu dilakukan perapatan konsentrasi berdasarkan hasil dari penelitian tersebut hingga dicapai minyak atsiri serai dengan konsentrasi 40%, 20%, 10%, 5% dan 2,5% (v/v).

4.7.4.3 Supaya minyak atsiri yang digunakan dapat terlarut ditambahkan pensuspensi berupa *Dimethylsulfoxide* (DMSO) 1% (v/v). Untuk mencegah DMSO agar tidak memiliki efek antifungal maka konsentrasi DMSO yang digunakan harus dibawah 0,3% (Hili *et al.*,1997). Oleh karena itu dilakukan pengenceran pada DMSO 1% menggunakan aquades steril dengan perbandingan (aquades : DMSO = 9 : 1), sehingga diperoleh konsentrasi DMSO 0,1% (v/v).

4.7.4.4 Pembuatan konsentrasi minyak atsiri serai dapur dari metode pengenceran seri dengan cara mencampurkan komposisi sebagai berikut:

Kontrol Positif : 100 μ l *Nystatin* 100.000 IU/ml

Kontrol Negatif : 100 μ l DMSO 0,1% (v/v)

Konsentrasi 40% : 40 μ l minyak atsiri serai dapur + 60 μ l DMSO 0,1%

Konsentrasi 20% : 20 μ l minyak atsiri serai dapur + 80 μ l DMSO 0,1%

Konsentrasi 10% : 10 μ l minyak atsiri serai dapur + 90 μ l DMSO 0,1%

Konsentrasi 5% : 5 μ l minyak atsiri serai dapur + 95 μ l DMSO 0,1%

Konsentrasi 2,5% : 2,5 μ l minyak atsiri serai dapur + 97,5 μ l DMSO 0,1%

Masing-masing larutan lalu divortex agar homogen.

4.7.4.5 *Blank disc* direndam dalam pipet pengencer (*ependorf*) yang berisi larutan minyak atsiri serai dapur dengan konsentrasi 40%, 20%, 10%, 5%, dan 2,5% (v/v) serta pada kontrol negatif (DMSO 0,1% (v/v)) dan pada kontrol positif (*Nystatin* 100.000 IU/ml) selama 10 menit atau sampai menjadi jenuh.

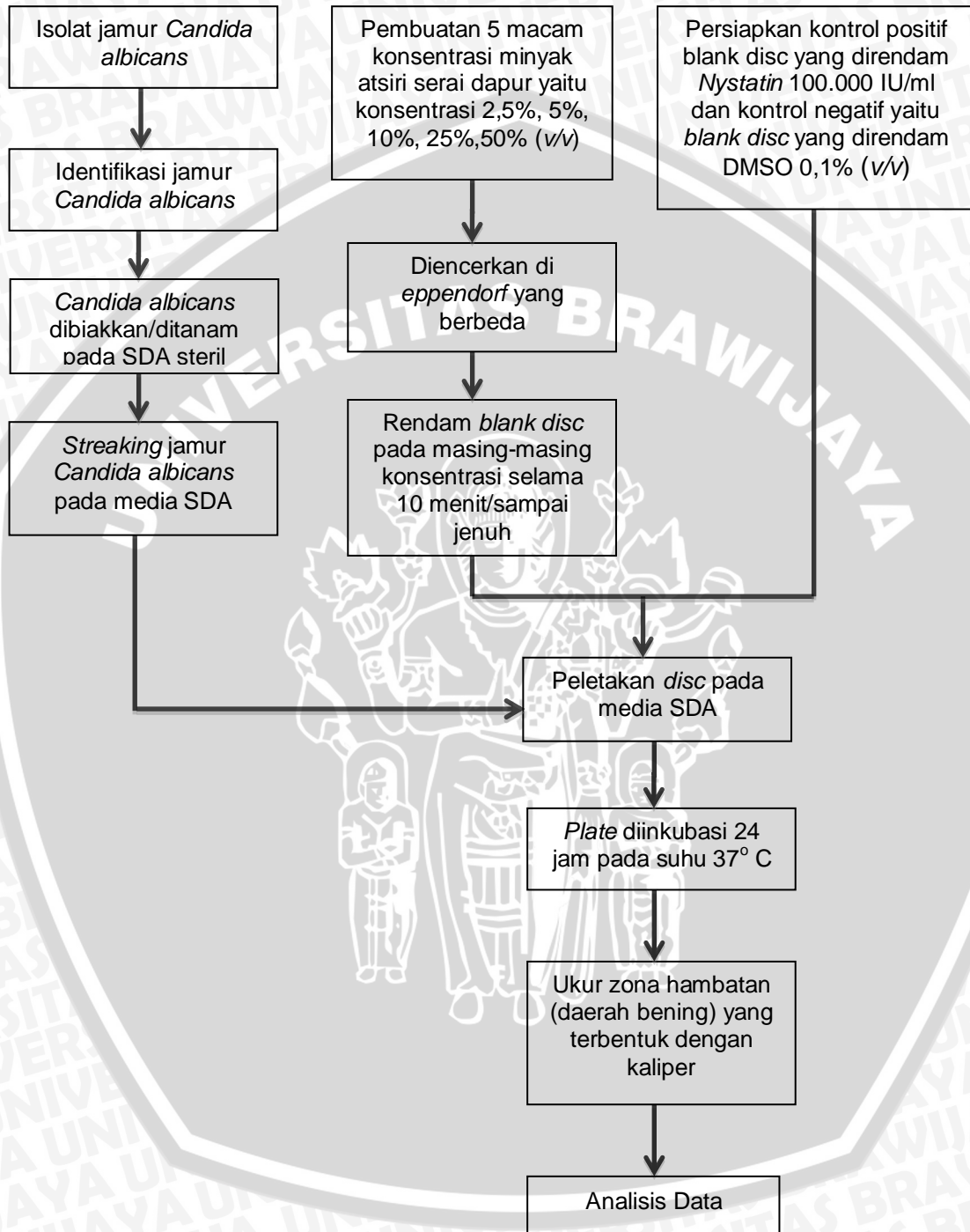
4.7.4.6 Letakkan *blank disc* tiap konsentrasi, *blank disc* (DMSO 0,1% (v/v)) sebagai kontrol negatif dan *antifungal disc* (*Nystatin* 100.000 IU/ml) sebagai kontrol positif pada media *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) dengan jarak tertentu.

4.7.4.7 Masukkan media *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) tersebut ke dalam inkubator selama 24 jam pada suhu 37°C.

4.7.4.8 Setelah diinkubasi, akan nampak area di sekitar disk yang jernih/ tanpa koloni jamur, yang disebut zona hambat.

4.7.4.9 Ukur diameter zona hambat dengan menggunakan kaliper. Pengukuran tersebut dilakukan dari batas jernih terakhir yang berdekatan dengan koloni di sebelah kiri hingga batas jernih terakhir yang berdekatan dengan koloni di sebelah kanan yang diukur pada jarak daerah jernih terpanjang. Besarnya diameter zona hambat yang timbul menunjukkan daya antifungi ekstrak. Interpretasi daerah hambatan pertumbuhan jamur mengacu pada standar umum obat asal tanaman yakni diameter zona hambat di sekitar *disc* ekstrak berukuran 12-24 mm (Hermawan, 2007).

4.8 Alur Penelitian



Gambar 4.1 Alur Penelitian

Keterangan :

Alur penelitian ini menunjukkan tahap-tahap yang dikerjakan dalam penelitian dengan metode difusi cakram

4.9 Analisis Data

Setelah diperoleh hasil dari 4 kali pengulangan percobaan data-data diameter zona hambat jamur dianalisis dengan menggunakan uji statistik. Data terlebih dahulu dilakukan uji distribusi dan homogenitas varian menggunakan *Kolmogorov-Smirnov*. Distribusi data normal jika nilai signifikansi $> 0,05$ (Dahlan, 2008). Apabila data terdistribusi normal, analisis data yang digunakan adalah uji statistik *One Way ANOVA* dan uji statistik korelasi-regresi.

Analisis data menggunakan uji statistik *One Way ANOVA*, dengan taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$) digunakan untuk mengetahui adanya pengaruh pemberian berbagai macam konsentrasi minyak atsiri serai dapur (*Cymbopogon citratus*) terhadap zona hambat pertumbuhan jamur *Candida albicans*, apabila $< 0,05$ hipotesis diterima dan apabila $> 0,05$ hipotesis ditolak. Untuk mengetahui apakah terdapat hubungan antara konsentrasi minyak atsiri serai dapur (*Cymbopogon citratus*) terhadap zona hambat pertumbuhan jamur *Candida albicans* dan mengetahui seberapa besar hubungan tersebut, apakah peningkatan berbagai konsentrasi minyak atsiri akan mengakibatkan peningkatan zona hambat pertumbuhan jamur dan sebaliknya atau tidak berhubungan digunakan uji korelasi-regresi dengan taraf kepercayaan 95%.