

BAB IV

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 daun beluntas (*Pluchea indica*) terhadap jamur *Candida albicans* dengan menggunakan metode *tube dilution test* yang dilanjutkan dengan penggoresan pada media *Saboaroud Dextrose Agar*.

4.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium Mikrobiologi Fakultas kedokteran Universitas Brawijaya Malang dari bulan September sampai Oktober 2014.

4.3 Sampel Penelitian

Sampel pada penelitian ini adalah jumlah koloni jamur *Candida albicans* yang berasal dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dengan kepadatan 10^3 CFU/ml per *tube*. Jumlah pengulangan penelitian menggunakan rumus Lukito sebagai berikut :

$$p(n-1) \geq 16 \text{ (Lukito, 1998).}$$

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

$$6n-6 \geq 16$$

$$6n \geq 22 \rightarrow n \geq 3,667 \approx 4$$

Keterangan:

p = jumlah perlakuan (6 konsentrasi ekstrak daun beluntas)

n = jumlah pengulangan (4 kali pengulangan).

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah pertumbuhan jumlah koloni jamur *Candida albicans*.

4.4.2 Variabel Bebas

Variabel bebas adalah ekstrak daun beluntas (*Pluchea indica*) dengan konsentrasi 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, dan 3,125%. Konsentrasi tersebut ditentukan sebagai konsentrasi pada penelitian pendahuluan. Pada konsentrasi 12,5% didapatkan tabung mulai jernih dan pada konsentrasi 25% sudah tidak ditemukan pertumbuhan dari *Candida albicans*. Sehingga dilakukan penelitian definitif dengan menggunakan konsentrasi 10%, 12%, 14%, 16%, 18%, dan 20%.

4.5 Definisi Operasional

- Daun beluntas yang dipakai untuk penelitian ini adalah daun beluntas yang diperoleh dari Fakultas Biologi Universitas Brawijaya.
- Ekstrak daun beluntas (*Pluchea indica*) adalah kadar atau konsentrasi daun beluntas (*Pluchea indica*) yang telah dikeringkan setelah itu dilakukan dengan cara ekstraksi maserasi dan evaporasi (pemisahan zat-zat aktif dengan pelarutnya) menggunakan etanol 96%.
- Isolat jamur *Candida albicans* adalah isolat yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
- Standar kepadatan jamur yang digunakan dalam penelitian ini sebesar 10^3 CFU/ml (Murray *et al.*, 1999).
- KHM (Kadar Hambat Minimum) yaitu diamati hambatan pertumbuhan mikroba dengan membandingkan kekeruhan atau pertumbuhannya dengan kontrol yang mengandung media. KHM didapatkan pada tabung

yang jernih pada pengenceran tertinggi. Penentuan KHM dilakukan dengan metode pengenceran (*dilution method*).

- KBM (Kadar Bunuh Minimum) adalah kadar atau konsentrasi minimal ekstrak daun beluntas (*Pluchea indica*) yang mampu membunuh kuman uji (*Candida albicans*), ditandai dengan tidak terdapatnya pertumbuhan koloni kuman pada media *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) yang telah dilakukan *streaking* dengan satu ose larutan ekstrak daun beluntas (*Pluchea indica*) yang tidak menunjukkan kekeruhan.

4.6 Instrumen Penelitian

4.6.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah : gelas objek, ose, bunsen burner, tabung reaksi kosong steril, korek api, vortex, incubator, plate kosong steril, mikroskop, pisau, nampan, timbangan, ekstraktor soxhlet, *waterbath*, *rotatory evaporator*, cawan petri, mikropipet 1 ml, *colony counter*, dan spektrofotometer.

4.6.2 Bahan

Bahan untuk identifikasi jamur *Candida albicans* adalah *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA), *Sabouraud Dextrose Broth*, kristal violet, lugol, alkohol 96%, safranin, aquadest, minyak imersi, kertas penghisap, dan kapas. Bahan untuk pembuatan ekstrak etanol daun beluntas (*Pluchea indica*) adalah daun beluntas, 450 ml etanol, dan air pendingin. Bahan untuk uji kepekaan ekstrak etanol daun beluntas (*Pluchea indica*) adalah isolat *Candida albicans*, ekstrak etanol daun beluntas, SDA, NaCl, dan aquadest steril.

4.7 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian terdiri dari prosedur penelitian pendahuluan dan prosedur penelitian sesungguhnya, yang berupa prosedur proses pembuatan ekstrak etanol daun beluntas (*Pluchea indica*), pemeriksaan mikroskopik Gram, tes *germinating tube*, persiapan suspensi uji *Candida albicans*, dan uji aktivitas antifungal ekstrak daun beluntas (*Pluchea indica*) terhadap *Candida albicans*.

4.7.1 Proses Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Beluntas (*Pluchea indica*)

4.7.1.1 Proses Pengeringan

- Daun beluntas dibersihkan dengan cara dibasuh dengan air mengalir.
- Proses selanjutnya adalah memotong atau mengiris kecil-kecil daun beluntas untuk mempercepat proses pengeringan.
- Daun beluntas di keringkan dengan cara diangin-anginkan selama lebih kurang 2 hari hingga benar-benar kering (Rendra, 2011).

4.7.1.2 Proses Ekstraksi

- Setelah mengalami proses pengeringan, daun beluntas tadi kemudian dihaluskan dengan menggunakan blender bumbu hingga berbentuk bubuk.
- Timbang sebanyak 100 gram (sampel kering).
- Masukkan 100 gram sampel kering ke dalam gelas Erlenmeyer ukuran 1 liter.
- Kemudian rendam dengan etanol 96% hingga volume 900 ml.
- Kocok sampai benar-benar tercampur (\pm 30 menit).
- Didiamkan satu malam sampai mengendap.
- Setelah itu maka daun beluntas kemudian diuapkan secara bertahap di dalam evaporator; hasil akhir dari proses evaporasi ini adalah

terbentuknya daun beluntas yang siap dipergunakan dalam penelitian ini (Rendra, 2011).

4.7.1.3 Proses Evaporasi

- Ambil lapisan atas campuran etanol 96% dengan zat aktif daun beluntas yang sudah terambil.
- Masukkan dalam labu evaporasi 1 liter.
- Pasang labu evaporasi pada evaporator.
- Isi *waterbath* 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 96% memisah dengan zat aktif yang sudah ada dalam labu.
- Tunggu sampai aliran etanol 96% berhenti menetes pada labu penampung (\pm 1,5 sampai 2 jam untuk 1 labu).
- Hasil yang diperoleh kira-kira $\frac{1}{2}$ dari daun beluntas kering.
- Apabila tidak sedang digunakan dalam jangka waktu yang cukup lama maka ekstrak daun beluntas dapat disimpan di dalam suatu botol plastik tertutup dan kemudian di diamkan atau di simpan dalam freezer (Rendra, 2011).

4.7.2 Pemeriksaan Mikroskopis Gram

- Gelas objek dibersihkan dengan kapas, kemudian dilewatkan di atas api untuk menghilangkan lemak dan dibiarkan dingin.
- Satu ose aquades steril ditetaskan 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 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 ½ menit. Sisa safranin dibuang dan dibilas dengan air.
- Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap.
- Sediaan dilihat di bawah mikroskop dengan lensa objektif perbesaran 1000x.
- Hasil positif : *Candida albicans* tercat ungu (Gram positif) dan terdapat gambaran *budding cell* (Rendra, 2011).

4.7.3 Tes Germinating Tube

- Isolat jamur diambil dari perbenihan dengan menggunakan ose yang sudah disterilisasi dengan cara pembakaran.
- Dimasukkan tabung yang berisi serum mamalia 0,5 ml.
- Diinkubasikan pada 35°C selama \pm 4 jam.
- Kultur di dalam serum diambil menggunakan ose dan diletakkan pada gelas objek, lalu ditutup dengan gelas penutup.
- Diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran lensa objektif 40x.
- Dicari bentukan *pseudohifa* memanjang khas *Candida albicans*. (Rendra, 2011)

4.7.4 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).

4.7.5 Uji Aktivitas Antifungi Ekstrak Daun Beluntas (*Pluchea indica*) Terhadap *Candida albicans*

Rangkaian uji aktivitas antifungi ekstrak daun beluntas (*Pluchea indica*) adalah sebagai berikut:

- a. Disediakan 8 tabung steril, 6 tabung sebagai uji antifungi, 1 tabung sebagai kontrol jamur (positif), dan 1 kontrol bahan (negatif).
- b. Ekstrak daun beluntas (dalam bentuk cairan) dimasukkan pada tabung reaksi steril masing-masing yaitu dengan konsentrasi

Tabung 1 : 0 μl

Tabung 5 : 160 μl

Tabung 2 : 1000 μl

Tabung 6 : 140 μl

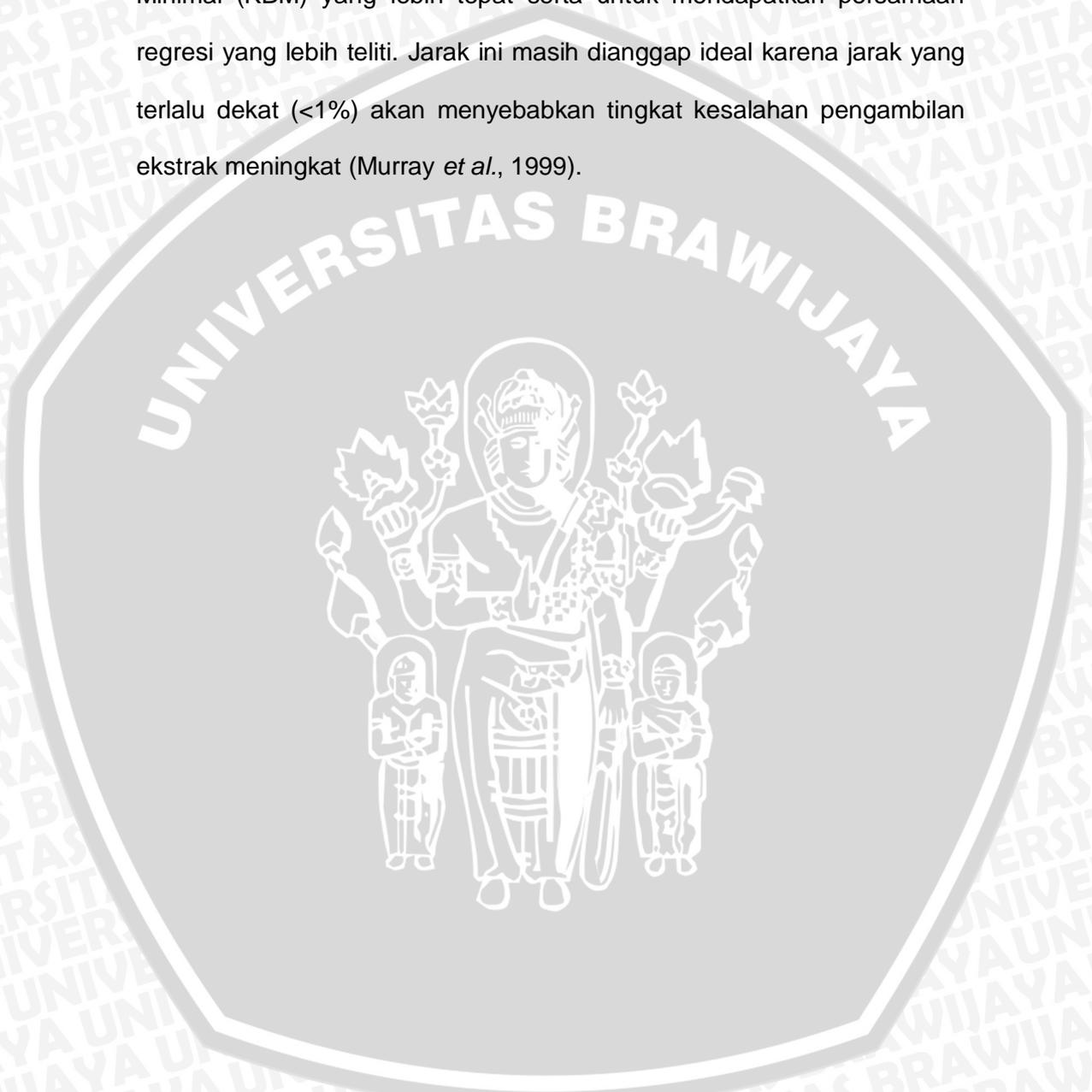
Tabung 3 : 200 μl

Tabung 7 : 120 μl

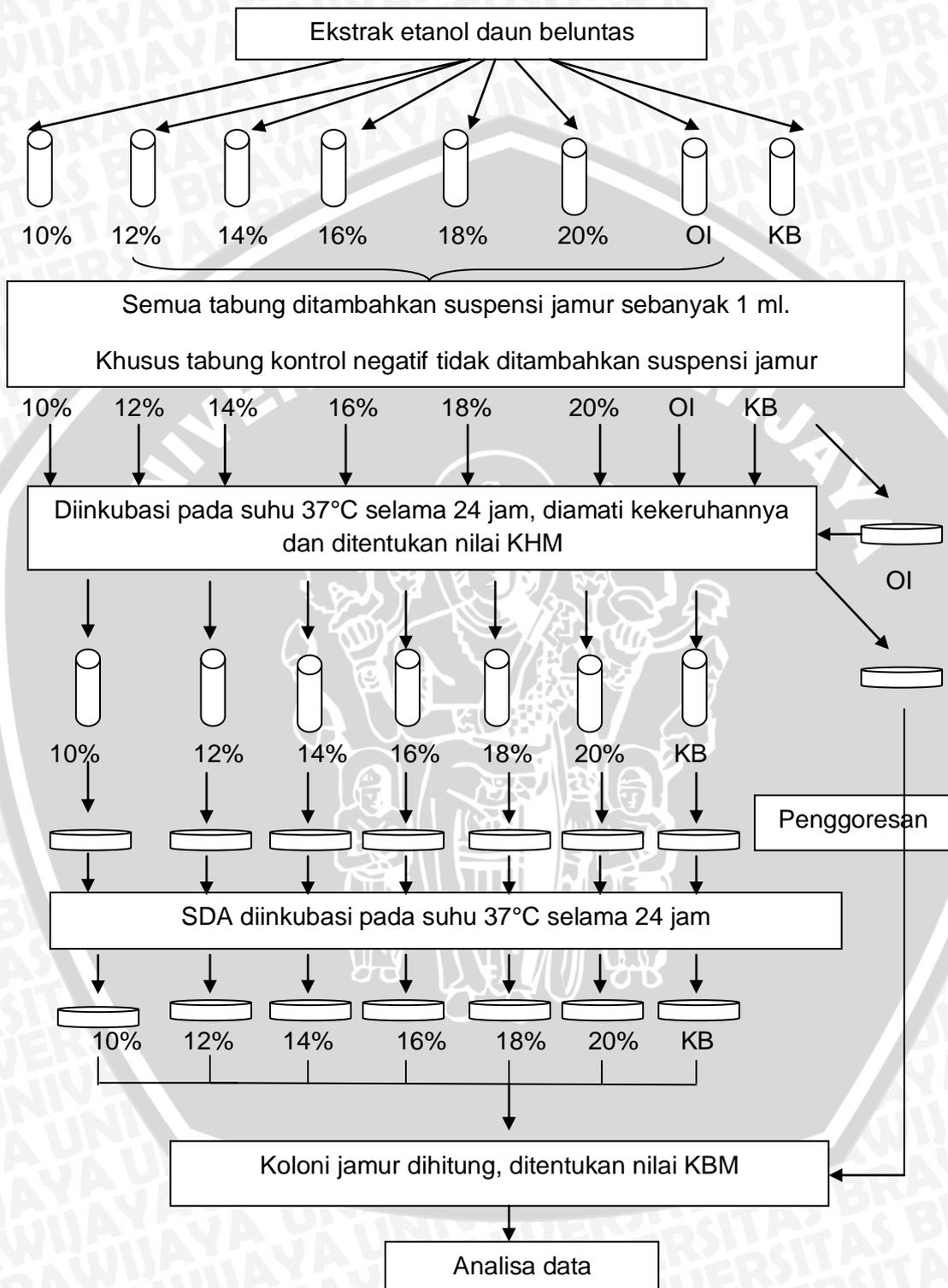
- Tabung 4 : 180 μ l Tabung 8 : 100 μ l
- c. Aquades steril dimasukkan pada masing-masing tabung, yaitu:
- Tabung 1 : 1000 μ l Tabung 4 : 840 μ l
Tabung 2 : 0 μ l Tabung 5 : 860 μ l
Tabung 3 : 800 μ l Tabung 6 : 880 μ l
Tabung 4 : 820 μ l Tabung 8 : 900 μ l
- d. Menyiapkan perbenihan cair perbenihan jamur dengan konsentrasi jamur $0,5 \times 10^3$ hingga $2,5 \times 10^3$ CFU/ml
- e. Perbenihan cair jamur dimasukkan pada semua tabung konsentrasi di atas, masing-masing sebanyak 1 ml sehingga konsentrasi akhir ekstrak daun beluntas (*Pluchea indica*) adalah :
- Tabung 1 : 0% (kontrol jamur) Tabung 5 : 16%
Tabung 2 : 100% Tabung 6 : 14%
Tabung 3 : 20% Tabung 7 : 12%
Tabung 4 : 18 % Tabung 8 : 10%
- f. Kontrol jamur (0%) digoreskan pada SDA sebagai *original inoculum* kemudian diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu 35°C.
- g. Masing-masing tabung di-vortex dan diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu 35°C.
- h. Pada hari kedua, semua tabung dikeluarkan dari inkubator. KHM didapatkan dengan cara melihat kejernihan tabung.
- i. Kemudian dari masing-masing tabung dilusi diambil satu ose kemudian diinokulasikan pada SDA. Kemudian diinkubasi 24-48 jam pada suhu 35°C.
- j. 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.

- Rentang konsentrasi 2% digunakan untuk menentukan Kadar Bunuh Minimal (KBM) yang lebih tepat serta untuk mendapatkan persamaan regresi yang lebih teliti. Jarak ini masih dianggap ideal karena jarak yang terlalu dekat (<1%) akan menyebabkan tingkat kesalahan pengambilan ekstrak meningkat (Murray *et al.*, 1999).



4.7.6 Kerangka operasional penelitian



Gambar 4.1 Kerangka Operasional Penelitian

Keterangan skema :

A: Aquadest steril

KB : Kontrol Bahan

CFU: *Colony Forming Unit*

KJ: Kontrol Jamur

OI : *Original Inoculum*

KBM : Kadar Bunuh Minimal

SDA : *Saboaroud Dextrose Agar*

KHM : Kadar Hambat Minimal

4.8 Analisis Data

Data terlebih dahulu dilakukan uji distribusi dan homogenitas varian menggunakan kolmogorov smirnov. Apabila data terdistribusi normal, analisis data yang digunakan adalah uji statistik *one way ANOVA* dan uji statistik korelasi-regresi. Uji statistik *one way ANOVA* dengan derajat kepercayaan 95 % ($\alpha = 0,05$) digunakan untuk mengetahui adanya pengaruh pemberian berbagai konsentrasi ekstrak daun beluntas (*Pluchea indica*) terhadap jumlah koloni jamur *Candida albicans*. Uji korelasi-regresi digunakan untuk mengetahui kekuatan hubungan antara konsentrasi ekstrak daun beluntas (*Pluchea indica*) terhadap pertumbuhan jamur *Candida albicans*. Analisis data menggunakan program SPSS (*Statistical Product of Service Solution*) for Windows versi 17.0 (Maulidi, 2011).

