

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental laboratorik. Uji antifungal secara *in vitro* menggunakan metode difusi agar untuk mengetahui aktivitas dari ekstrak minyak atsiri daun kemangi (*Ocimum basilicum* L.) dibandingkan dengan ketokonazol 2% sebagai agen antifungal terhadap *Candida albicans*.

4.2 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan di dalam penelitian ini adalah fungi *Candida albicans* yang diambil dari *stock culture* milik oleh Laboratorium Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Sampel diperoleh dari pasien yang mengalami penyakit kandidiasis di Rumah Sakit Saiful Anwar.

4.3 Pengulangan

Jumlah pengulangan yang harus dilakukan terhadap masing-masing ekstrak minyak atsiri daun kemangi dan ketokonazol 2% dapat diketahui dengan rumus berikut:



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

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

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4 \text{ (Solimun, 2001)}$$

Keterangan :

n : jumlah pengulangan yang diperlukan

p : jumlah perlakuan (dosis)

Berdasarkan perhitungan di atas, maka banyaknya pengulangan jumlah dari sampel fungi *Candida albicans* yang diperlukan dalam penelitian ini paling sedikit adalah 4.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini diameter zona hambatan koloni fungi *Candida albicans* pada medium *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA).

4.4.2 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak minyak atsiri *Ocimum basilicum* L. dengan konsentrasi 45%,50%,55%,60%,65%.

4.5 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya pada bulan Oktober-November 2016.

4.6 Instrumen penelitian

Alat yang digunakan antara lain : erlenmeyer, gelas ukur, gelas kimia, tabung reaksi, rak tabung reaksi, pipet tetes, penangas air, blender, ayakan mesh 65, kaca arloji, timbangan analitik, labu ekstraksi, batang pengaduk, stirer, cawan petri, rotary evaporator, jarum ose, pinset, inkubator, *laminar air flow*, termometer, pencadangan, autoklaf, mikropipet, mistar berskala, *freeze dryer* dan alat fotografi.

Bahan yang digunakan antara lain : isolat fungi, ekstrak minyak atsiri daun kemangi (*Ocimum basilicum* L.), ketokonazol 200mg, cairan DMSO 1%, *Sabouraud Dextrose Agar (SDA)*, aquades, etanol dan perbenihan cair fungi.

4.7 Definisi Operasional

Di dalam penelitian ini ada beberapa hal yang perlu diketahui yaitu :

1. Isolat fungi *Candida albicans* yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. *Candida albicans* berasal dari hasil kerokan di kulit atau mulut pasien yang mengalami penyakit kandidiasis di Rumah Sakit Saiful Anwar.
2. daun kemangi (*Ocimum basilicum* L.) yang digunakan dalam penelitian ini dibeli dari perkebunan di Batu sebanyak 130 gr serbuk daun kemangi dengan pelarut Hexana 1 L. hasil ekstrak daun kemangi (*Ocimum basilicum* L.) sebanyak 3 ml dan Konsentrasi hasil ekstrak daun kemangi (*Ocimum basilicum* L.) adalah 100%.
3. Kontrol positif/kontrol fungi adalah konsentrasi 0 % yang dapat digunakan untuk mengetahui apakah fungi yang digunakan terkontaminasi dengan mikroorganisme lain. Kontrol positif berasal dari larutan fungi uji yang telah distandardisasi dengan standar Mc Farland 0,5 sebanyak 2 ml.
4. Kontrol negatif/bahan digunakan untuk mengetahui ada tidaknya pertumbuhan fungi karena bahan yang digunakan harus steril. Kontrol negatif dibuat dengan cara mencampurkan antara ekstrak minyak atsiri daun kemangi (*Ocimum basilicum* L.) sebanyak 1 ml dengan DMSO 0,1% sebanyak 10 ml.

5. *Original inoculum* adalah inokulum fungi dengan konsentrasi 10^4 CFU/ml yang diinokulasikan pada media SDA sebelum diinkubasi.

4.8 Prosedur Penelitian

4.8.1 Identifikasi *Candida albicans*

4.8.1.1 Pewarnaan Gram

Prosedur pengecatan Gram :

1. Bersihkan gelas obyek dengan kapas dan lewatkan diatas api untuk menghilangkan lemak. Kemudian biarkan dingin
2. Buat sediaan fungi diatas gelas obyek dengan ketebalan yang cukup (tidak terlalu tebal dan tidak terlalu tipis) dan dibiarkan kering diudara. Kemudian difiksasi diatas lampu bunsen.
3. Sediaan dituangi dengan Kristal Violet. Setelah 1 menit, sediaan dibilas dengan air.
4. Kemudian sediaan dituangi dengan Lugol. Setelah 1 menit, sediaan dibilas dengan air.
5. Sediaan dituangi dengan alcohol 96%. Setelah 5-10 detik, sediaan dibilas dengan air.
6. Sediaan dituangi dengan Safranin. Setelah setengah menit, sediaan dibilas dengan air.
7. Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap
8. Selanjutnya dilihat dibawah mikroskop dengan obyektif perbesaran 100x.

9. Hasil positif didapat jika *Candida albicans* tercat ungu (Gram positif), bentuk budding (Rachma, 2012).

4.8.1.2 Uji *Germinating Tube*

1. Isolat fungi diambil dari perbenihan dengan menggunakan ose yang sudah disterilisasi dengan cara pembakaran.
2. Masukkan tabung yang berisi serum mamalia 0,5 ml.
3. Inkubasi \pm 4 jam pada suhu 37°C.
4. Kultur yang berada di dalam serum diambil menggunakan ose dan diletakkan pada objek gelas, setelah itu ditutup dengan gelas penutup.
5. Hasil lalu diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran lensa objektif 40x.
6. Bentukan yang dicari adalah *pseudohifa* memanjang khas *Candida albicans*. (Rachma, 2012).

4.8.2 Pemiakan *Candida albicans*

Untuk media pembenihan *Candida albicans*, untuk penelitian ini akan menggunakan *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA). Kandungan SDA terdiri dari 40 gr dekstrosa, 15 gr agar, 5 gr enzimatik kasein, serta 5 gr enzimatik jaringan hewan. SDA memiliki pH $5,6 \pm$,2 pada suhu 25°C.

Penanaman jamur pada *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) yang merupakan media selektif terhadap pertumbuhan *Candida albicans*, prosedurnya yaitu :

1. Menyiapkan medium SDA sehari sebelum digunakan dan menyimpannya di tempat yang gelap pada suhu ruangan.
2. Mengambil jamur dari perbenihan cair sebanyak 1 ose.
3. Menggoreskan jamur tersebut pada medium SDA.
4. Menginkubasikan biakan jamur dalam medium SDA tersebut selama 2-7 hari dengan suhu 25-30°C dan amati hasilnya.
5. Menentukan hasil positif yaitu apabila ditemukan morfologi koloni fungi *Candida albicans* menghasilkan koloni halus berwarna krem yang mempunyai bau seperti ragi.

4.8.3 Persiapan Suspensi Uji *Candida albicans*

1. Menyiapkan fungi *Candida albicans* dari SDA yang telah diuji konfirmasi.
2. Ambil 5 koloni ($d \geq 1\text{mm}$) dengan ose lalu masukkan ke dalam 5 ml NaCl 0,85% steril. Kemudian diukur Optical Density (OD) dengan spektrofotometer pada $\lambda = 530\text{ nm}$. 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).
3. 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. Dari sana akan didapat suspensi sel dengan konsentrasi 10^5 CFU/ml. Proses dilanjutkan dua kali hingga mencapai konsentrasi suspensi fungi digunakan untuk tes, yaitu $0,5 \times 10^3$ hingga $2,5 \times 10^3$ CFU/ml (Murray *et al.*, 1999)

4.8.4 Pembuatan Bahan Uji

4.8.4.1 Minyak Atsiri Daun Kemangi

Daun Kemangi sebelum dimasukkan ke dalam tabung ekstraksi terlebih dahulu dilakukan pengeringan dan diproses menjadi bubuk. Untuk mengambil minyak dari daun kemangi. Daun kemangi yang dibutuhkan lebih kurang sebanyak 1000 gram dipotong kecil lalu dijemur di bawah sinar matahari selama 6-7 hari hingga kadar air turun sampai 16%, atau berat bahan susut sampai 50%. Selama penjemuran bahan harus sering dibolak-balik. Ini bertujuan sehingga didapatkan konsentrasi ekstrak maksimum, sedangkan zat aktif yang terkandung dalam daun akan menguap pada suhu lebih tinggi, sehingga diperkirakan tidak ikut menguap bersama pengeringan tersebut. Daun yang telah kering kemudian dihaluskan menggunakan blender. Setelah halus, ditimbang lalu dibungkus menggunakan kertas saring.

Sebanyak 130 gr serbuk daun kemangi yang telah dibungkus dengan kertas saring dan dimasukkan kedalam tabung ekstraksi, kedalam labu alas bulat dimasukkan pelarut hexana 1 liter. Alat Soxhlet dirangkai dan diaktifkan. Penyaringan dilakukan sampai cairan penyaring jernih. Kemudian ekstrak yang

diperoleh dipekatkan dengan bantuan alat *rotary evaporator* pada temperatur tidak lebih dari 40°C sampai diperoleh ekstrak kental, kemudian dikeringkan dengan *freeze dryer*. Proses ini dilakukan sebanyak empat kali.

4.8.4.2 Ketokonazol 2%

Untuk membuat larutan ketokonazol 2%, gunakan tablet ketokonazol 200 mg. 1 tablet ketokonazol lalu dihaluskan lalu dilarutkan dalam 10 ml pelarut DMSO 0,1%.

4.8.5 Pembuatan Media Pengujian

Lapisan dasar dibuat dengan menuangkan masing-masing 10 ml SDA dari media dasar ke dalam 4 cawan petri, lalu dibiarkan sampai memadat. Setelah memadat, pada permukaan lapisan dasar diletakkan 7 pencadang baja yang diatur sedemikian rupa jaraknya agar daerah pengamatan tidak saling bertumpuk. Kemudian, suspensi jamur dicampurkan ke dalam media pembenihan SDA. Setelah itu, dituangkan 25 ml campuran suspensi dan media pembenihan tersebut ke dalam tiap cawan petri yang diletakkan pencadang sebagai lapisan kedua. Selanjutnya, pencadang diangkat secara aseptik dari cawan petri, sehingga akhirnya terbentuklah sumur-sumur yang akan digunakan dalam uji antifungi.

4.8.6 Uji Antifungal Minyak Atsiri Daun Kemangi dan Ketokonazol 2%

Rangkaian uji aktifitas antifungi minyak atsiri daun kemangi dan ketokonazol 2% adalah sebagai berikut:

A. Sediakan 4 cawan petri SDA yang telah dicampurkan dengan suspensi jamur yang telah disiapkan dengan sumurannya. Tiap cawan petri mempunyai 7 lubang sumuran.

B. Pembuatan konsentrasi ekstrak minyak atsiri daun kemangi :

45% = 0,45 ml ekstrak minyak atsiri daun kemangi ditambah 0,55 ml DMSO 0,1%.

50% = 0,5 ml ekstrak minyak atsiri daun kemangi ditambah 0,5 ml DMSO 0,1%.

55% = 0,55 ml ekstrak minyak atsiri daun kemangi ditambah 0,45 ml DMSO 0,1%.

60% = 0,6 ml ekstrak minyak atsiri daun kemangi ditambah 0,4 ml DMSO 0,1%.

65% = 0,65 ml ekstrak minyak atsiri daun kemangi ditambah 0,35 ml DMSO 0,1%.

C. Injeksikan semua konsentrasi ekstrak minyak atsiri daun kemangi dan ketokonazol 2% pada masing-masing lubang sumuran hingga permukaan.

D. Inkubasi tiap cawan petri selama 24 jam dalam suhu 37°C.

E. Setelah 24 jam, amati dan ukur diameter zona hambatan dari masing-masing sumuran.

4.9 Analisis Data

Analisis data yang digunakan adalah uji *non parametric*, dengan besar kepercayaan 0,95 untuk tingkat signifikansi (α) = 0,05. Analisis yang digunakan adalah uji statistic *Kruskall Wallis* untuk mengetahui perbedaan pengaruh dari berbagai perlakuan yang diberikan terhadap *Candida albicans* sehingga dapat disimpulkan apakah perlakuan yang diberikan , minyak atsiri daun kemangi dan ketokonazol 2% mempunyai pengaruh antifungal yang signifikan terhadap *Candida albicans*. Uji *Mann Whitney* yang digunakan berguna untuk mengetahui perbedaan pengaruh pemberian minyak atsiri daun kemangi dan ketokonazol 2% sebagai antifungal terhadap jamur *Candida albicans* pada setiap perlakuan yang diberikan. Untuk uji korelasi Spearman, ini digunakan untuk mengetahui besarnya keeratan hubungan pemberian perlakuan dengan pembentukan zona hambatan pada koloni jamur *Candida albicans* di media SDA.

4.10 Diagram Alur Penelitian

Ekstrak minyak atsiri daun kemangi dengan konsentrasi 65%, 60%, 55% 50%, 45%, 0% dan ketokonazol 2%.

Suspensi jamur *Candida albicans* dicampurkan dengan Sabaouraud Dextrose Agar pada cawan petri, tiap cawan petri dibuatkan masing-masing 7 lubang sumuran.

Injeksikan tiap-tiap konsentrasi minyak atsiri daun kemangi dan ketokonazol 2% pada tiap lubang sumuran.

Inkubasi cawan petri selama 24 jam pada suhu 37°C.

Pada hari kedua, ukur diameter masing-masing zona hambatan dari tiap sumuran.

Analisis Data

Gambar 4.1 Diagram Alur Penelitian