

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan adalah *true experimental design post test control only* dengan pengulangan yang sesuai dengan rumus pengulangan untuk mengetahui efek ekstrak etanol daun srikaya terhadap pertumbuhan *Candida albicans*. Metode penelitian ini yaitu dengan metode dilusi agar untuk menentukan persentase efek anti mikroba ekstrak etanol daun srikaya sebagai anti fungi terhadap jamur *Candida albicans*.

4.2 Tempat Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.

4.3 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah jamur *Candida albicans* dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang. Sampel Daun Srikaya (*Annona squamosa*) didapatkan dari UPT. Materia Medika Batu. Keaslian spesies sampel daun srikaya dapat dibuktikan dengan adanya sertifikat kepastian spesies.

4.4 Pengulangan Sampel Penelitian

Jumlah pengulangan penelitian menggunakan rumus Lukito adalah sebagai berikut (Solimun, 2001 *dalam* Kumboyono, 2011):

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

$$8(n-1) \geq 16$$

$$8n - 8 \geq 16$$

$$8n \geq 24 ; n \geq 3$$

Keterangan :

p = jumlah perlakuan

n = jumlah pengulangan

Pengulangan dilakukan paling sedikit sebanyak tiga kali namun pada penelitian ini dilakukan sebanyak empat kali pengulangan untuk mendapatkan hasil yang lebih valid.

4.5 Variabel Penelitian

4.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas adalah ekstrak etanol daun srikaya yang dicampurkan ke agar dalam *plate* dengan konsentrasi 5%, 10%, 20%, dan 25% untuk penelitian pendahuluan.

4.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat adalah pertumbuhan jamur *Candida albicans* yang dilihat dari terbentuknya koloni jamur pada media agar yang telah dicampur dengan ekstrak etanol daun srikaya.

4.6 Definisi Operasional

1. Daun srikaya adalah daun srikaya (*Annona squamosa*) yang masih segar berwarna hijau dan dalam keadaan bersih, didapatkan dari UPT. Materia Medika Batu, Malang.

2. Ekstrak daun srikaya adalah hasil dari penyaringan dan rangkaian proses laboratoris terhadap daun srikaya dengan etanol 95% menggunakan metode maserasi (Pradana dkk., 2015).
3. Isolat *Candida albicans* adalah stok kultur murni Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang tidak bercampur dengan jenis mikroba atau fungi lainnya dan telah diidentifikasi di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
4. *Saboraud Dextrose Agar* (SDA) adalah media selektif untuk pertumbuhan jamur (Pradana dkk., 2015).

4.7 Alat dan Bahan

4.7.1 Penyediaan Daun Srikaya

Bahan yang digunakan adalah daun srikaya yang diperoleh dari UPT. Materia Medika Batu, Malang yang telah diidentifikasi dengan adanya sertifikat untuk membuktikan keaslian daun.

4.7.2 Alat dan Bahan Pembuatan Ekstrak Daun Srikaya

Alat yang digunakan adalah labu *Erlenmeyer*, timbangan, maserator berpengaduk elektronik, corong pemisah, grinder, alumunium foil, kertas saring Whattman, dan *rotary evaporator*. Bahan yang digunakan adalah daun srikaya dan larutan etanol 95%.

4.7.3 Alat dan Bahan untuk Kultur, Identifikasi Jamur, dan Uji Efektivitas

Alat untuk melakukan kultur, identifikasi jamur dan uji efektivitas antara lain ose lurus, ose lengkung, mikropipet, kertas penghisap, minyak emersi, *petridisc*, tabung reaksi, bunsen, korek, mikroskop, *centrifuge*, dan

inkubator. Bahan-bahan yang digunakan yaitu isolat *Candida albicans* pewarnaan gram (kristal violet, lugol, alkohol 96%, safranin), *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA), aquadest, dan hasil ekstrak daun srikaya.

4.8 Prosedur Penelitian

4.8.1 Sterilisasi Alat

Semua alat yang akan digunakan dalam penelitian sebelumnya disterilkan dalam *autoclave* dengan suhu 121°C selama 15 menit (Nurdina dkk., 2012)

4.8.2 Persiapan Bahan

1. Daun srikaya dicuci hingga bersih kemudian dikeringkan selama 10 hari pada suhu ruangan namun tidak terkena cahaya matahari langsung hingga daun mengering (Pradana dkk., 2015).
2. Isolat *Candida albicans* dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya ditanam pada media SDA steril kemudian diinkubasi pada suhu 35°C selama 24-48 jam (Hasanah, 2012).
3. Aquadest dan SDA disterilkan kemudian dimasukkan ke dalam lemari es (Hasanah, 2012).

4.8.3 Pembuatan Sediaan Ekstrak Daun Srikaya

1. Daun Srikaya yang sudah kering diblender halus. Ekstraksi dilakukan dengan cara maserasi, yaitu dengan cara daun srikaya direndam dalam etanol 95% selama 72 jam dengan mengganti pelarut setiap 24 jam (Pradana dkk., 2015).
2. Hasil ekstraksi disaring menggunakan kertas saring Whattman hingga tidak tersisa residu atau padatan (Pradana dkk., 2015).

3. Ekstrak etanol yang diperoleh diuapkan pelarutnya menggunakan *rotary evaporator* untuk mendapatkan fraksi yang kental dan kemudian difraksinasi dengan campuran diklorometana dan air (1:1). Fraksi dichlorometana difraksinasi menggunakan n-heksan dan metanol (1:1). Fraksi metanol dievaporasi dan dialiri gas N₂ untuk menghilangkan metanol agar hasil ekstraksi bebas dari bahan pelarut (Pradana dkk., 2015).

4.8.4 Identifikasi *Candida albicans*

Untuk membuktikan bahwa koloni yang tumbuh adalah *Candida albicans* maka dilakukan tes konfirmasi. Tes yang dilakukan antara lain :

1. Pewarnaan Gram

1.1 Gelas objek dibersihkan dengan kapas, kemudian dilewatkan di atas api dan dibiarkan dingin.

1.2 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.

1.3 Sediaan dikeringkan di udara, kemudian dilakukan fiksasi dengan cara melewatkan sediaan diatas api.

1.4 Sediaan pada gelas objek ditetesi dengan kristal violet selama 1 menit. Sisa kristal violet dibuang dan dibilas dengan air.

1.5 Sediaan ditetesi dengan lugol selama 1 menit. Sisa lugol dibuang dan dibilas dengan air.

1.6 Sediaan ditetesi dengan alkohol 96% selama 5-10 detik atau sampai cat warna luntur. Sisa alkohol dibuang dan dibilas dengan air.

1.7 Sediaan ditetesi safranin selama 30 detik. Sisa safranin dibuang dan dibilas dengan air.

1.8 Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap.

1.9 Sediaan dilihat dibawah mikroskop dengan lensa objektif perbesaran 1000x dengan diberi minyak emersi, perbesaran tersebut dianggap cukup untuk mengamati jamur *Candida albicans*.

1.10 Hasil positif : *Candida albicans* tercat ungu (gram positif) (Harwanti, 2012).

2. Tes Germinating Tube

2.1 Isolat jamur diambil dari perbenihan menggunakan ose yang sudah disterilisasi dengan cara pembakaran.

2.2 Dimasukkan ke dalam tabung yang berisi serum mamalia 0,5 ml.

2.3 Diinkubasi selama \pm tiga jam pada suhu 35°C.

2.4 Kultur didalam serum diambil dengan ose dan digoreskan pada *object glass* dan ditutup dengan gelas penutup.

2.5 Diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran lensa objektif 400x.

2.6 Bila (+) maka didapatkan bentukan *pseudohifa* memanjang khas *Candida albicans* (Harwanti, 2012).

4.8.5 Persiapan Suspensi Uji *Candida albicans*

1. Persiapkan jamur *Candida albicans* dari SDA yang telah di uji konfirmasi.
2. 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 $\lambda_{\text{maks}} = 520\text{ nm}$. Dari hasil yang diperoleh dibuat suspensi sel yang mengandung 10^6 CFU/mL dengan rumus $n_1 \times V_1 = n_2 \times V_2$ (Murray *et al.*, 2007).
3. Untuk mendapatkan suspensi sel yang mengandung 10^4 CFU/mL dilakukan dengan 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 hingga mencapai konsentrasi suspensi jamur yang digunakan untuk tes, yaitu 10^4 CFU/mL (Murray *et al.*, 2007).

4.8.6 Pencampuran Ekstrak Etanol Daun Srikaya dengan Emulgator

1. Lakukan pengenceran *Carboxymethyl cellulose* (CMC) dengan aquades steril dengan perbandingan aquades : CMC = 1 : 1.
2. Hasil pengenceran di-vortex hingga aquades steril dan CMC tercampur homogen.
3. Campurkan ekstrak etanol daun srikaya dengan CMC yang telah diencerkan sehingga diperoleh konsentrasi ekstrak etanol daun srikaya 100%.

4.8.7 Uji Pendahuluan Efektivitas Anti Fungi Ekstrak Daun Srikaya (*Annona squamosa*) terhadap *Candida albicans* dengan Metode Dilusi Agar

1. Disediakan 5 *plate* steril, kemudian diberi tanda besarnya konsentrasi larutan ekstrak yang dicampur ke dalam SDA, yaitu 0%; 5%; 10%; 20%; 25%.
2. Volume yang dipakai dalam setiap *plate* adalah 10 ml sehingga volume anti fungi dan agar (SDA) yang dimasukkan ke dalam *plate* yaitu:

Konsentrasi 0% = 10 ml SDA

Konsentrasi 5% = 0,5 ml ekstrak 100% + 9,5 ml SDA

Konsentrasi 10% = 1 ml ekstrak 100% + 9 ml SDA

Konsentrasi 20% = 2 ml ekstrak 100% + 8 ml SDA

Konsentrasi 25% = 2,5 ml ekstrak 100% + 7,5 ml SDA

3. Setelah dicampur antara ekstrak dan SDA, ditunggu hingga media mengeras dan dingin, kemudian diinkubasi pada suhu 35°C selama 18-24 jam.
4. Setelah 18-24 jam, masing-masing *plate* dibagi menjadi empat bagian, kemudian pada masing masing bagian ditetaskan mikroba uji 0,001 ml.
5. Semua *plate* diinkubasi selama 18-24 jam.
6. Lakukan pengamatan terhadap koloni yang tumbuh pada cawan petri SDA. Konsentrasi ekstrak pada *plate* SDA yang tidak ditemukan adanya pertumbuhan koloni disebut sebagai persentase efek anti mikroba.

4.8.8 Uji Efektivitas Anti Fungi Ekstrak Daun Srikaya (*Annona squamosa*) terhadap *Candida albicans* dengan Metode Dilusi Agar

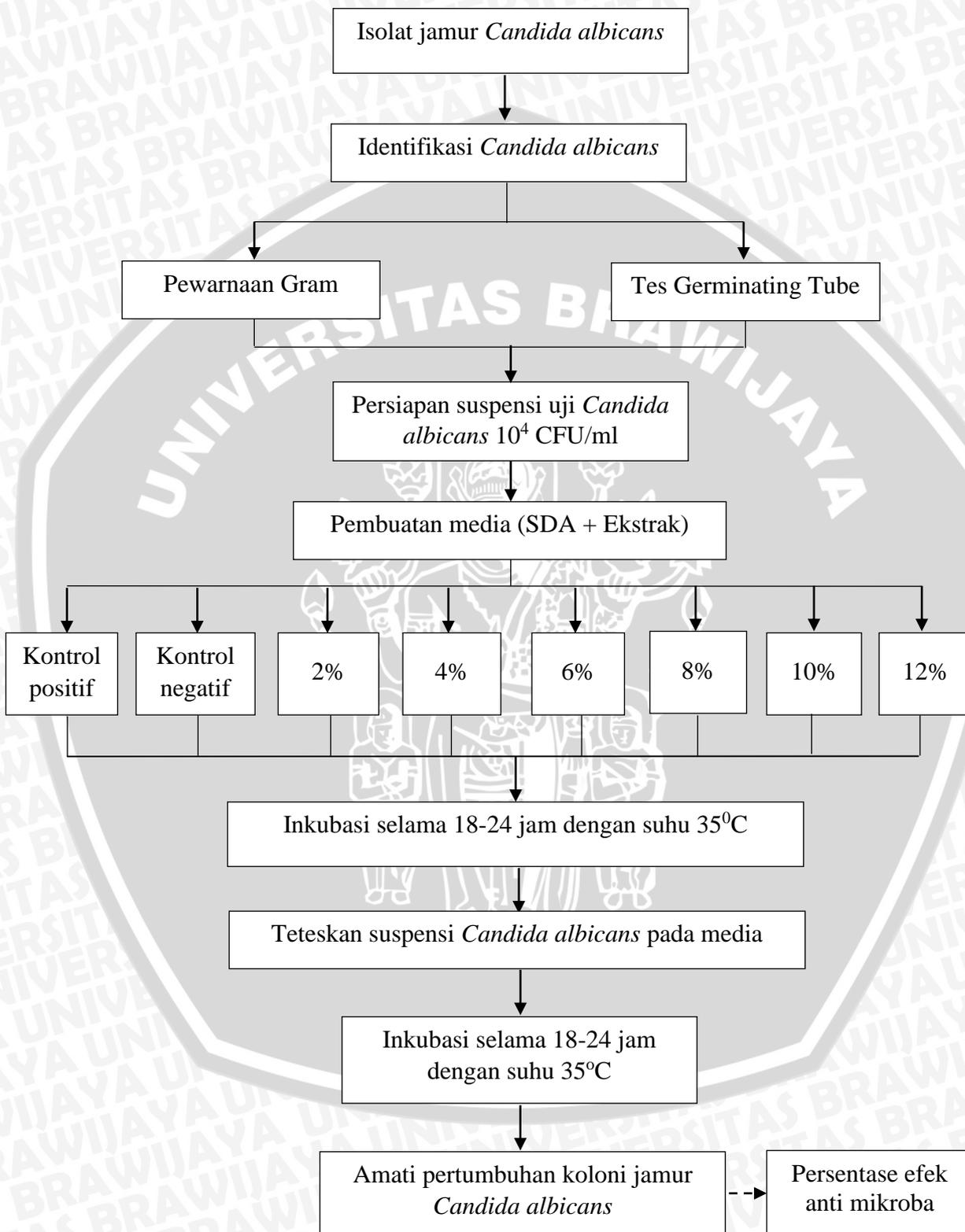
1. Disediakan 8 *plate* steril, kemudian diberi tanda besarnya konsentrasi larutan ekstrak yang dicampur ke dalam SDA, yaitu 0%; 2%; 4%; 6%; 8%; 10%; 12%.
2. Volume yang dipakai dalam setiap *plate* adalah 10 ml sehingga volume ekstrak dan agar (SDA) yang dimasukkan ke dalam *plate* yaitu:
Kontrol positif = suspensi Nystatin + SDA
Konsentrasi 0% = 10 ml SDA
Konsentrasi 2% = 0,2 ml ekstrak 100% + 9,8 ml SDA
Konsentrasi 4% = 0,4 ml ekstrak 100% + 9,6 ml SDA
Konsentrasi 6% = 0,6 ml ekstrak 100% + 9,4 ml SDA
Konsentrasi 8% = 0,8 ml ekstrak 100% + 9,2 ml SDA
Konsentrasi 10% = 1 ml ekstrak 100% + 9 ml SDA
Konsentrasi 12% = 1,2 ml ekstrak 100% + 8,2 ml SDA
3. Setelah dicampur antara ekstrak dan SDA, ditunggu hingga media mengeras dan dingin, kemudian diinkubasi pada suhu 35°C selama 18-24 jam.
4. Setelah 18-24 jam, masing-masing *plate* dibagi menjadi empat bagian, kemudian masing masing bagian ditetaskan mikroba uji 0,001 ml.
5. Semua *plate* diinkubasi selama 18-24 jam.
7. Lakukan pengamatan terhadap koloni yang tumbuh pada cawan petri SDA. Konsentrasi ekstrak pada *plate* SDA yang tidak ditemukan

adanya pertumbuhan koloni disebut sebagai persentase efek anti mikroba.

4.9 Analisis Data

Data terlebih dahulu dilakukan uji normalitas menggunakan Uji Shapiro-Wilk. Data yang akan dianalisis berupa data ordinal sehingga digunakan analisis statistika non-parametrik. Uji statistik yang digunakan adalah uji *Kruskal-Wallis*, uji Korelasi Spearman, dan uji *Mann-Whitney*. Uji statistik Non-Parametrik *Kruskal-Wallis* dengan derajat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$) digunakan untuk mengetahui adanya perbedaan pertumbuhan koloni jamur *Candida albicans* pada setiap perlakuan yang diberi berbagai variasi konsentrasi ekstrak etanol daun srikaya. Uji korelasi Spearman digunakan untuk mengetahui kekuatan hubungan antara konsentrasi ekstrak daun srikaya terhadap pertumbuhan jamur *Candida albicans*. Uji *Mann-Whitney* digunakan untuk membandingkan antara dua kelompok. Analisis data menggunakan program SPSS versi 20.

4.10 Diagram Alur Penelitian



Gambar 4.1 Diagram Alur Penelitian