

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah *true experimental post control design only*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak metanol daun Srikaya (*Annona squamosa*) terhadap koloni jamur *Candida albicans*. Metode yang digunakan adalah metode dilusi agar untuk membuktikan kemampuan antijamur ekstrak metanol daun Srikaya (*Annona squamosa*) dalam menghambat pertumbuhan jamur *Candida albicans*.

4.2 Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmako dan Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya pada bulan Agustus – Oktober 2016.

4.3 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah jamur *Candida albicans* dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.

4.3.1 Pengulangan Sampel

Sampel penelitian akan dilakukan pengulangan bagi tiap kelompok untuk mencegah terjadinya bias pada hasil penelitian. Banyaknya pengulangan yang diperlukan dalam penelitian ini dapat dihitung dengan menggunakan rumus Federer (1977):

Keterangan:

p = jumlah perlakuan

n = jumlah ulangan yang diperlukan

$p(n-1)$	≥ 15
$6(n-1)$	≥ 15
$6n-6$	≥ 15
$6n$	≥ 21
n	$\geq 3,5$

Setelah dilakukan perhitungan, maka pengulangan yang dilakukan untuk mendapatkan jumlah sampel yang dapat dipercaya adalah sebanyak tiga koma lima sehingga dibulatkan menjadi empat kali pengulangan (Setiawan, 2010).

4.3.2 Variabel Penelitian

4.3.2.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak metanol daun Srikaya (*Annona squamosa*) dengan konsentrasi 0%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%.

4.3.2.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah pertumbuhan jamur *Candida albicans*.

4.4 Alat dan Bahan

4.4.1 Persiapan Sediaan Daun Srikaya

Bahan yang digunakan adalah daun Srikaya (*Annona squamosa*) yang diperoleh dari perkebunan Srikaya yang berlokasi di Kecamatan Rembang, Kabupaten Pasuruan, Provinsi Jawa timur.

4.4.2 Alat dan Bahan Pembuatan Ekstrak Metanol Daun Srikaya (*Annona squamosa*)

Alat yang digunakan untuk proses ekstraksi daun Srikaya (*Annona squamosa*) antara lain:

1. Blender
2. *Beaker glass*
3. Ayakan
4. Toples kaca
5. Kertas saring
6. *Rotary evaporator*
7. *Waterbath*
8. Timbangan elektrik

Bahan yang digunakan untuk pembuatan ekstrak metanol daun Srikaya (*Annona squamosa*) antara lain:

1. Daun Srikaya (*Annona squamosa*)
2. Metanol 70%

4.4.3 Alat dan Bahan Identifikasi Jamur

4.4.3.1 Alat dan Bahan untuk Identifikasi Jamur dengan Pewarnaan Gram

1. Isolat jamur *Candida albicans*
2. *Anaerobic jar*
3. Bahan pewarnaan Gram (kristal, violet, lugol, alkohol 96%, safranin)
4. *Nutrient Broth*
5. Ose
6. Kertas penghisap
7. Kapas

8. Minyak emersi
9. Mikroskop
10. Gelas objek
11. Tabung reaksi
12. Lampu spiritus

4.4.3.2 Alat dan Bahan untuk Identifikasi Jamur dengan Uji *Germ Tube*

1. *Cover glass*
2. Obyek gelas
3. Tabung reaksi
4. Pipet Pasteur
5. Mikroskop
6. Reagen serum *Bovine*

4.4.3.3 Alat dan Bahan untuk Uji Daya Antijamur Ekstrak Daun Srikaya (*Annona squamosa*) Melalui Metode Dilusi Agar

Alat dan bahan yang digunakan untuk uji daya antijamur ekstrak daun Srikaya (*Annona squamosa*) terhadap jamur *Candida albicans* pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Ekstrak metanol daun Srikaya (*Annona squamosa*) dalam beberapa konsentrasi berbeda
2. Ose
3. Mikropipet
4. *Plate* steril
5. Inkubator
6. Pembakar spiritus
7. Timbangan

8. BHI Agar
9. BHI Broth
10. Isolat *Candida albicans*
11. Aquades

4.5 Definisi Operasional

1. Daun Srikaya (*Annona squamosa*) adalah daun dari tanaman Srikaya (*Annona squamosa*) yang diperoleh dari perkebunan Srikaya yang berlokasi di Kecamatan Rembang, Kabupaten Pasuruan, Provinsi Jawa timur. Untuk memastikan bahwa daun tersebut merupakan benar daun Srikaya (*Annona squamosa*) maka dilakukan uji determinasi daun di Balai Materia Medika (BMM) Batu.
2. Ekstrak metanol daun Srikaya (*Annona squamosa*) adalah ekstrak yang diperoleh dari daun Srikaya (*Annona squamosa*) yang telah dikeringkan, kemudian dihaluskan, direndam dengan metanol 70%, diaduk, didiamkan (metode maserasi), dan diambil filtratnya dengan penyaringan yang kemudian dipekatkan dengan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 40°C. Pembuatan ekstrak metanol daun Srikaya (*Annona squamosa*) dilakukan di Laboratorium Farmako Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
3. Konsentrasi ekstrak daun Srikaya (*Annona squamosa*) adalah ekstrak daun Srikaya (*Annona squamosa*) yang diencerkan menjadi berbagai konsentrasi, yaitu 5 %, 10%, 15%, 20%, 25%.
4. Jamur *Candida albicans* adalah jamur *Candida albicans* yang diperoleh dari isolat murni di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Standar kepadatan jamur yang digunakan dalam

penelitian ini adalah 1×10^6 CFU/ml. CFU/ml merupakan singkatan dari *Colony Forming Unit/mililiter*.

5. Uji kepekaan antijamur metode dilusi agar (*agar dilution test*) adalah uji kepekaan yang dilakukan secara *in vitro* dengan mencampur bahan antijamur yang diuji dengan konsentrasi berbeda ke dalam media agar, yang kemudian ditambahkan dengan perbenihan cair yang telah mengandung jamur *Candida albicans* dengan jumlah yang telah distandardisasi (1×10^6 CFU/ml).
6. Kontrol jamur adalah plate agar yang hanya berisi agar dengan tetesan jamur *Candida albicans*.
7. Kontrol bahan adalah plate yang hanya berisi ekstrak daun Srikaya (*Annona squamosa*) dengan konsentrasi 100%.

4.6 Prosedur Penelitian

4.6.1 Pembuatan Ekstrak Metanol Daun Srikaya (*Annona squamosa*)

Dalam pembuatan ekstrak metanol daun Srikaya (*Annona squamosa*) diperlukan 850 gram daun Srikaya (*Annona squamosa*), kemudian dikeringkan dengan cara diangin-anginkan ditempat teduh selama kurang lebih 7 hari. Daun yang telah kering kemudian dihaluskan dengan blender sampai menjadi serbuk simplisia seberat 310 gram. Serbuk simplisia tersebut diayak hingga didapatkan 300 gram serbuk halus. Serbuk halus dimasukkan dalam toples kaca dan dicampur dengan 900 gram pelarut metanol 96%, aduk terus menerus agar pelarut masuk kedalam serbuk, langkah selanjutnya adalah biarkan pada suhu ruang selama 3x24 jam agar proses maserasi berjalan. Hasil filtrat kemudian disaring dengan menggunakan kertas saring.

Selanjutnya ekstrak cair diuapkan dengan alat *rotary evaporator* pada suhu 50° C, tujuannya adalah untuk menghilangkan zat pelarut sehingga diperoleh ekstrak daun Srikaya (*Annona squamosa*) kental dengan konsentrasi 100% sebanyak 36 ml (Adkhi, 2007).

4.6.2 Uji Identifikasi Jamur

4.6.2.1 Uji Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram dapat dilakukan dengan cara :

1. Satu ose akuades steril diteteskan pada gelas objek, lalu diambil sedikit jamur untuk disuspensi dengan aquades yang telah diletakkan di atas gelas objek, lalu dibiarkan kering di udara.
2. Suspensi jamur yang sudah kering difiksasi dengan cara melewatkan beberapa kali di atas api. Sediaan siap untuk diwarnai.
3. Kristal violet diteteskan pada sediaan dan ditunggu selama satu menit. Sisa kristal violet dibuang dan dibilas dengan air.
4. Lugol diteteskan pada sediaan dan ditunggu selama satu menit. Sisa lugol dibuang dan dibilas dengan air.
5. Alkohol 96% diteteskan pada sediaan dan ditunggu selama 30 detik. Sisa alkohol dibuang dan dibilas dengan air.
6. Safranin diteteskan pada sediaan dan ditunggu selama 30 detik. Sisa safranin dibuang dan dibilas dengan air.
7. Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap.
8. Sediaan dilihat di bawah mikroskop dengan perbesaran total 1000x.

4.6.2.2 Uji Germ Tube

Uji *Germ tube* dapat dilakukan dengan cara :

1. Diambil 3 tetes serum *Bovine* ke dalam tabung reaksi.
2. Diambil koloni jamur *Candida albicans* menggunakan pipet *Pasteur*, kemudian masukkan ke dalam tabung reaksi
3. Diinkubasi pada suhu 37° selama 2-4 jam.
4. Setelah diinkubasi koloni jamur *Candida albicans* yang telah tercampur dengan serum *Bovine* ditetaskan pada gelas obyek dan ditutup dengan *cover glass*
5. Amati dibawah mikroskop dengan perbesaran 40x.

4.6.3 Pembuatan Suspensi Jamur Uji

Ambil koloni jamur dengan ose kemudian dimasukkan ke dalam 5 ml NaCl 0,85% steril. Kemudian ukur *Optical Density* (OD) atau kepadatan optisnya dengan spektrofotometer pada $\lambda = 625$ nm. Dari hasil yang diperoleh, dibuat suspensi jamur yang mengandung 1×10^6 CFU/ml dengan rumus $n_1 \times v_1 = n_2 \times v_2$.

4.6.4 Uji Pengaruh Ekstrak Metanol Daun Srikaya Sebagai Antijamur *Candida albicans* Dengan Metode Dilusi Agar

- Metode Dilusi Agar

Prosedur yang dilakukan dalam metode dilusi agar antara lain:

1. Disediakan 5 plate steril, kemudian diberi tanda besarnya konsentrasi larutan ekstrak daun Srikaya (*Annona squamosa*) yang dicampur dalam BHIA, yaitu 0%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%.

2. Volume yang dipakai dalam setiap plate adalah 15 ml, jadi volume ekstrak dan agar (BHIA) yang dimasukkan ke dalam plate:

Konsentrasi 0% = 0 ml ekstrak 100% + 15 ml BHIA

Konsentrasi 5% = 0,75 ml ekstrak 100% + 14,25 ml BHIA

Konsentrasi 10% = 1,5 ml ekstrak 100% + 13,5 ml BHIA

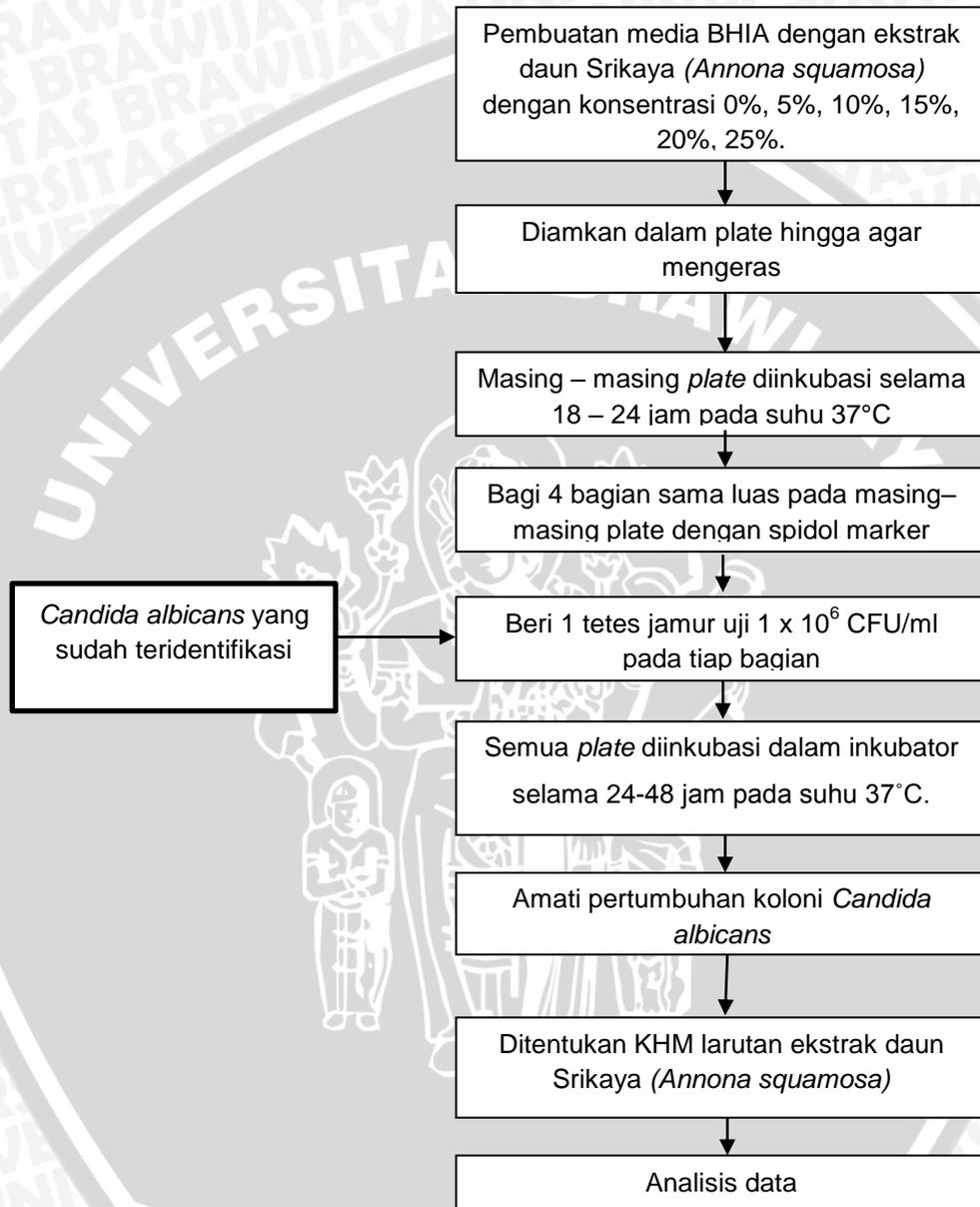
Konsentrasi 15% = 2,25 ml ekstrak 100% + 12,75 ml BHIA

Konsentrasi 20% = 3 ml ekstrak 100% + 12 ml BHIA

Konsentrasi 25% = 3,75 ml ekstrak 100% + 11,25 ml BHIA

3. Setelah dicampur lalu ditunggu hingga agarnya dingin dan mengeras, kemudian diinkubasi pada suhu 37° C selama 18-24 jam.
4. Plate tersebut ditandai menjadi 4 bagian pada setiap bagian ditetesi dengan jamur uji.
5. Semua plate diinkubasikan pada suhu 37°C selama 18-24 jam.
6. Dilakukan pengamatan terhadap koloni jamur *Candida albicans* yang tumbuh pada plate BHIA. Konsentrasi ekstrak pada plate BHIA yang tidak ditemukan adanya pertumbuhan koloni disebut sebagai KHM.

4.7 Skema Alur Penelitian



4.8 Analisa Data

Data terlebih dahulu dilakukan uji normalitas dan homogenitas varian menggunakan uji *Shapiro-Wilk*. Apabila data tidak terdistribusi normal atau tidak homogen atau data berupa data ordinal, analisis data yang digunakan adalah uji statistik *Kruskal-Wallis*, uji *Post-Hoc Mann-Whitney*, uji statistik korelasi *Spearman* dengan derajat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$). Dengan uji *Kruskal-Wallis* akan diketahui perbedaan pengaruh berbagai konsentrasi ekstrak metanol daun Srikaya (*Annona squamosa*) terhadap *Candida albicans* sehingga dapat diketahui apakah ekstrak metanol daun Srikaya (*Annona squamosa*) mempunyai pengaruh antijamur terhadap *Candida albicans* secara *in vitro*. Uji korelasi *Spearman* untuk mengetahui besarnya keeratan hubungan pemberian perlakuan terutama yang disebabkan oleh pemberian ekstrak metanol daun Srikaya (*Annona squamosa*) dengan pertumbuhan koloni jamur *Candida albicans*.

Sedangkan bila data terdistribusi normal dan homogen, maka analisis data yang digunakan adalah uji statistik *one way ANOVA* dan uji statistik korelasi *Pearson* dan uji regresi. Analisis data menggunakan program SPSS (*Statistical Product of Service Solution*) versi 17.0 untuk Windows.