

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Desain penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah *true experimental design post test control only* dengan pengulangan yang sesuai dengan rumus pengulangan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak daun belimbing wuluh terhadap pertumbuhan *Candida albicans*. Metode penelitian ini yaitu metode dilusi agar.

4.2 Sampel

Sampel pada penelitian ini adalah sampel *Candida albicans* yang dibiakkan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang. Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa blimbi* L) didapatkan dari UPT Materia Medika Batu. Keaslian spesies sampel daun belimbing wuluh dapat dibuktikan dengan adanya sertifikat kepastian spesies yang dapat dilihat pada lampiran 1.

4.2.1 Jumlah sampel

Jumlah pengulangan penelitian menggunakan rumus Federer sebagai berikut:

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

$$(10-1)(n-1) \geq 15$$

$$9n-8 \geq 15$$

$$9n \geq 23$$

$$n \geq 2,56 ; n \geq 3$$

(Supranto, 2000)

Keterangan :

t = jumlah kelompok perlakuan

n = jumlah pengulangan untuk setiap kelompok perlakuan dan n harus bilangan bulat

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

4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Tempat Penelitian : Laboratorium Mikrobiologi Fakultas
Kedokteran Universitas Brawijaya

Waktu Penelitian : Waktu penelitian Juli – September 2017

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel bebas : ekstrak daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L) yang dicampurkan ke agar dalam *plate* dengan konsentrasi 0%, 2%, 4%, 6%, 8%, 10%, 12%, 15% dan 17,5%.

4.4.2 Variabel terikat : pertumbuhan koloni jamur *Candida albicans* yang dilihat pada media agar yang telah dicampur dengan ekstrak daun belimbing wuluh.

4.5 Definisi Operasional

- a. Daun blimbing wuluh adalah daun belimbing wuluh yang masih segar dan hijau dan dalam keadaan bersih, didapatkan dari UPT Materia Medika Batu, Malang.
- b. Koloni jamur *Candida albicans* adalah koloni bulat dan cembung, bertekstur halus dan licin menyerupai koloni bakteri di atas media SDA. Membentuk koloni basah dan berwarna putih. Dari pewarnaan Gram akan berbentuk oval, bersifat Gram positif, beberapa bisa membentuk anakan (*budding*).
- c. Ekstrak daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi L*) adalah hasil dari penyaringan dan rangkaian proses laboratoris terhadap daun belimbing wuluh. Hasil ekstrak daun belimbing wuluh yang didapatkan berwarna hijau gelap berupa liquid.
- d. *Saboraud Dextrose Agar* (SDA) adalah media selektif untuk pertumbuhan jamur
- e. Dilusi agar adalah metode pengujian aktivitas daya hambat suatu zat yang diduga antimikroba dengan mencampurkan antimikroba ke dalam cawan petri yang berisi media agar dan dibiarkan mengeras, setelah itu inokulum mikroba diteteskan pada agar menggunakan pipet dan diinkubasi 18-24 jam. Selanjutnya dilihat apakah ada hambatan

pertumbuhan mikroba. Dalam hal ini adalah pertumbuhan koloni jamur *Candida albicans*.

- f. Kontrol positif adalah kelompok perlakuan pada penelitian yang diberikan obat antijamur nistatin.
- g. Kontrol negatif adalah kelompok tanpa perlakuan, disini berupa media agar SDA yang tidak di campur dengan ekstrak daun belimbing wuluh.

4.6 Alat dan Bahan Penelitian

4.6.1 Penyediaan Daun Belimbing Wuluh

Bahan yang digunakan adalah daun belimbing wuluh yang diperoleh dari UPT Materi Medika Batu, Malang yang telah diidentifikasi dengan adanya sertifikat untuk membuktikan keaslian daun sebagaimana terlampir pada lampiran 1.

4.6.2 Alat dan Bahan untuk pembuatan ekstrak daun belimbing wuluh

- Toples tertutup
- Corong gelas
- Timbangan analitik
- Gelas ukur
- Botol
- Waterbath
- Erlenmeyer
- Rotary evaporator
- Beaker glass
- Shaker digital
- Bahan yang digunakan adalah daun belimbing wuluh pelarut etanol 96%

4.6.3 Alat dan Bahan untuk Kultur, Identifikasi Jamur, dan Uji Efektivitas Antijamur

- Ose lurus
- Ose lengkung
- Mikropipet
- Kertas penghisap
- Minyak emersi
- *Petridisc*
- Tabung reaksi
- Bunsen
- Korek
- Mikroskop
- Centrifuge
- Inkubator

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Pembuatan Sediaan Ekstrak Daun Belimbing Wuluh

- 1) Daun belimbing wuluh dihaluskan menggunakan blender, setelah halus, ditimbang
lalu dibasahi dengan etanol 96%
- 2) Kemudian dipindahkan ke dalam toples, diratakan dan ditambahkan pelarut etanol 96% sampai terendam.
- 3) Toples ditutup dan didiamkan 24 jam kemudian dishaker menggunakan shaker digital
- 4) Ekstrak cair saring dengan penyaring kain dan hasilnya ditampung dalam Erlenmeyer

- 5) Proses terjadinya sirkulasi kontinyu pelarut etanol diamati hingga semua ekstraksi
dianggap telah terekstraksi
- 6) Hasil ekstraksi lalu dievaporasi. Dari proses tersebut didapatkan ekstrak daun belimbing wuluh

4.7.2 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) Gelas objek dibersihkan dengan kapas, kemudian dilewatkan di atas api dan dibiakan dingin
- 2) Satu ose aquades steril diteteskan pada gelas objek ditambah sedikit biakan jamur yang diambil menggunakan ose, selanjutnya disuspensikan dengan aquades pada gelas objek dan diratakan. Sedangkan sediaan cair tidak perlu disuspensikan dengan aquades
- 3) Sediaan dikeringkan di udara, lalu difiksasi dengan melewati sediaan di atas api
- 4) Sediaan pada gelas objek ditetesi dengan kristal violet selama 1 menit. Sisa kristal violet dibuang dan dibilas dengan air
- 5) Sediaan ditetesi dengan lugol selama 1 menit. Sisa lugol dibuang dan dibilas dengan air
- 6) Sediaan ditetesi dengan alkohol 96% selama 5-10 detik. Sisa alkohol dibuang dan

dibilas dengan air

- 7) Sediaan ditetesi safranin selama 30 detik, sisa safranin dibuang dan dibilas dengan air
- 8) Sediaan pada *object glass* dikeringkan dengan kertas penghisap
- 9) Sediaan dilihat di bawah mikroskop dengan lensa objektif perbesaran 400x, perbesaran tersebut dianggap cukup untuk mengamati jamur *Candida albicans*.
- 10) Dikatakan positif jika *Candida albicans* tercat warna ungu (Gram positif), berbentuk oval (Harmawati, 2012)

2. Uji Vitek II

1. Persiapan Alat

- Hidupkan sistem *Vitex 2 compact*. Tekan tombol ON pada conditioner, UPS, instrumen *Vitex 2 compact*, dan komputer
- Masukkan *username* dan *password*
- Selama beberapa menit awal instrumen dinyalakan akan berada pada status

Warming. Tunggu instrumen hingga menunjukkan status OK

2. Persiapan Sampel

- 1) Gunakan isolat bakteri/*yeast* yang muda dan koloni murni
- 2) Siapkan masing-masing 2 tabung untuk setiap isolate
- 3) Setiap tabung diisi dengan 3 ml larutan NaCl 0,45 % pH 5,0
- 4) Ambil koloni jamur, buat suspensi larutan NaCl dan lakukan homogenisasi

5) Untuk kekeruhan inokulum dengan menggunakan alat Densicheck dengan cara:

- Tabung inokulum yang akan diukur dibersihkan terlebih dahulu pada bagian luarnya dengan *tissue*.
- Masukkan tabung ke lubang pengukuran pada Densicheck, putar 360° selama 2 detik
- Angka hasil pengukuran akan muncul dalam satuan *McFarland*. Bakteri Gram negatif dan positif = 0,5 – 0,63 *McFarland*. Yeast = 1,8 – 2,2 *McFarland*
- Jika kekeruhan kurang maka tambahkan koloni bakteri/yeast
- Jika kekeruhan berlebih, maka ambil sejumlah volume inokulum dan encerkan dengan menambahkan larutan NaCl

3. Pemasukan ke ruang pengisian

- Masukkan *cassette* ke ruang pengisian
- Tekan “*START FILL*”
- Pengisian akan memerlukan waktu beberapa menit
- Jika selesai, maka alarm berbunyi, tanda incubator akan berkedip-kedip dan *cassette* segera dipindahkan ke inkubator

4. Pemasukan ke inkubator

- Masukkan segera *cassette* ke ruang inkubator
- Proses yang akan dilalui antara lain:

- Jika selesai, maka alarm berbunyi, tanda inkubator akan berkedip-kedip dan *cassette* harus segera dikeluarkan
- Proses inkubator akan berlangsung beberapa jam dan hasil akan tercetak secara otomatis

4.7.3 Persiapan Suspensi Uji *Candida albicans*

1. Persiapkan jamur *Candida albicans* dari SDA yang telah di uji konfirmasi.
2. Ambil 2 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 jamur yang digunakan untuk tes, yaitu 10^4 CFU/mL (Murray *et al.*, 2007).

4.7.4 Pencampuran Ekstrak Daun Belimbing Wuluh 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 daun belimbing wuluh dengan CMC yang telah diencerkan sehingga diperoleh konsentrasi ekstrak daun belimbing wuluh 100%.

4.7.5 Uji Pendahuluan Efektivitas Antijamur Ekstrak Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa blimbi L*) terhadap *Candida albicans* dengan Metode Dilusi Agar

1. Disediakan 9 *plate* steril, kemudian diberi tanda besarnya konsentrasi larutan ekstrak yang dicampur ke dalam SDA, yaitu 0%, 2%, 4%, 6%, 8%, 10%, 12%, 15%, 17,5 %.
2. Volume yang dipakai dalam setiap *plate* adalah 10 ml sehingga volume antifungi dan agar (SDA) yang dimasukkan ke dalam *plate* yaitu:

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% + 8,8 ml SDA

Konsentrasi 15% = 1,5 ml ekstrak 100% + 8,5 ml SDA

Konsentrasi 17,5% = 1,75 ml ekstrak 100% + 8,25 ml SDA

3. Setelah dicampur antara ekstrak dan SDA, ditunggu hingga media mengeras dan dingin
4. Kemudian masing-masing plate dibagi menjadi empat bagian, dan pada masing- masing plate ditetaskan suspensi *C. albicans* 0,001 ml.
5. Semua plate diinkubasi 18-24 jam pada suhu 37°C.

6. Lakukan pengamatan terhadap koloni yang tumbuh pada cawan petri SDA. Konsentrasi ekstrak pada plate SDA yang tidak ditemukan adanya pertumbuhan koloni disebut sebagai KHM..

4.7.6 Uji Efektivitas Antijamur Ekstrak Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa blimbi L*) terhadap *Candida albicans* dengan Metode Dilusi Agar

1. Disediakan 9 *plate* steril, kemudian diberi tanda besarnya konsentrasi larutan ekstrak yang dicampur ke dalam SDA, yaitu 0%, 2%, 4%, 6%, 8%, 10%, 12%, 15% ,17,5
2. Volume yang dipakai dalam setiap *plate* adalah 10 ml sehingga volume antifungi dan agar (SDA) yang dimasukkan ke dalam plate yaitu:

Kontrol Positif	= 0,5 ml suspensi nystatin + 0,5 ml 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% + 8,8 ml SDA
Konsentrasi 15%	= 1,5 ml ekstrak 100% + 8,5 ml SDA
Konsentrasi 17,5%	= 1,75 ml ekstrak 100% + 8,25 ml SDA

3. Setelah dicampur merata antara ekstrak dan SDA, ditunggu hingga media mengeras dan dingin.
4. Kemudian masing-masing plate dibagi menjadi empat bagian, dan pada masing- masing plate di teteskan suspensi *C. albicans* 0,001 ml.

5. Semua plate diinkubasi 18-24 jam pada suhu 37°C.
6. Lakukan pengamatan terhadap koloni yang tumbuh pada cawan petri SDA. Konsentrasi ekstrak pada plate SDA yang tidak ditemukan adanya pertumbuhan koloni disebut sebagai KHM.

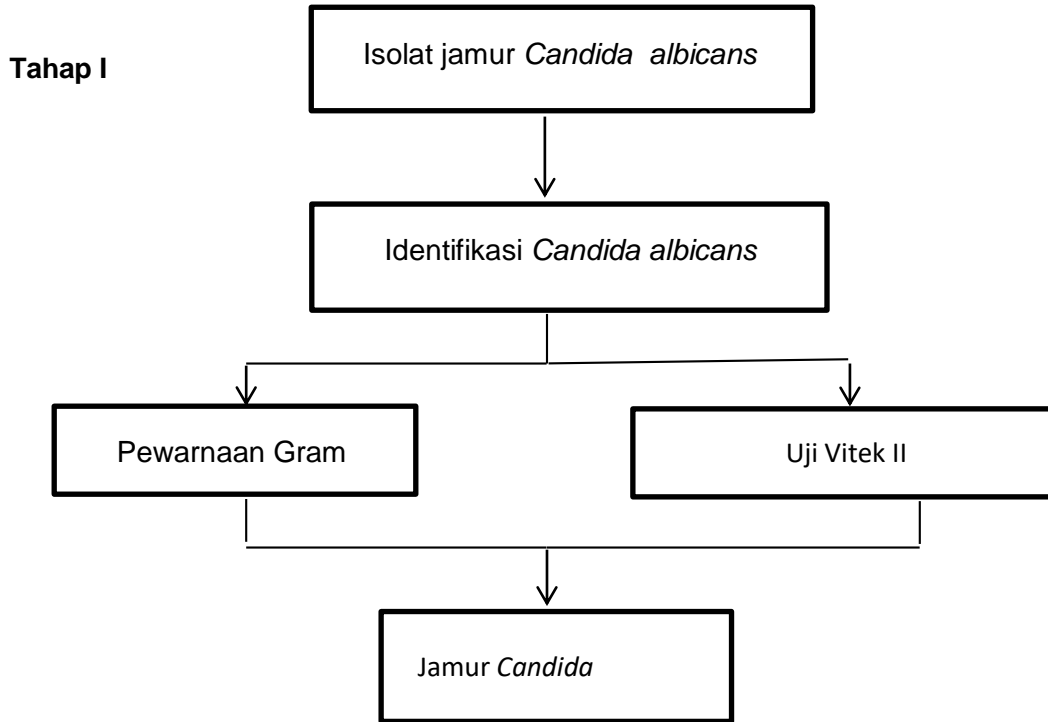
4.8 Pengolahan Data

Analisa Data

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

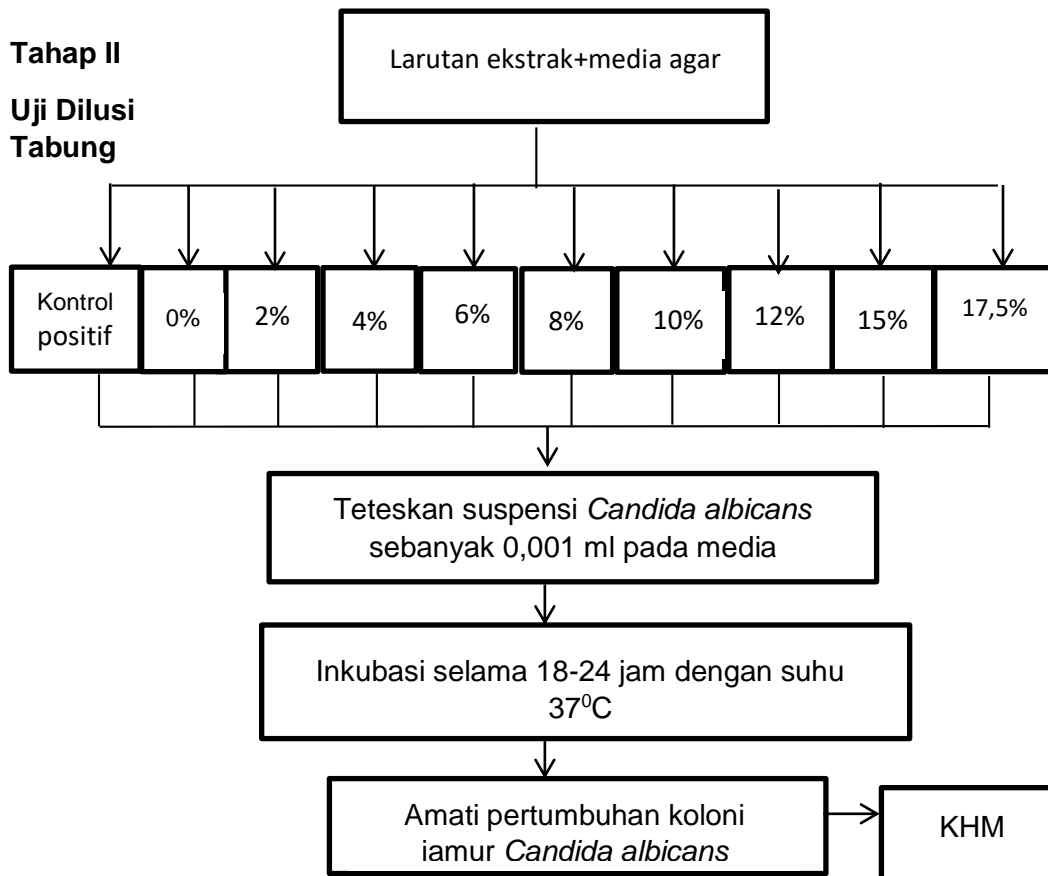
4.9 Diagram Alur Penelitian

Tahap I



Tahap II

Uji Dilusi Tabung



4.1 Diagram Alur Penelitian