

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian *true experimental-post test only control group design*. Untuk mengetahui efek berbagai konsentrasi ekstrak daun ketepeng cina (*Cassia alata*) sebagai antifungal terhadap pertumbuhan *Candida albicans* dengan menggunakan metode *agar dilution test*.

Dilusi Agar (*Agar Dilution Test*) merupakan tahap pengujian dengan cara pengenceran larutan antifungal secara seri pada medium agar yang masih cair, kemudian dibiarkan memadat dan di inokulasi dengan *Candida albicans* yang ditujukan untuk mengetahui Kadar Hambat Minimal (KHM).

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang pada bulan Agustus - November tahun 2014.

4.3 Sampel dan Estimasi Jumlah Pengulangan

Sampel pada penelitian ini adalah jumlah koloni jamur *Candida albicans* yang berasal dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dengan kepadatan 10^4 CFU/ml. Jumlah pengulangan penelitian menggunakan rumus untuk menghitung jumlah pengulangan p ($n-1 \geq 15$) (Solimun, 2001).

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

$$7(n-1) \geq 15$$

$$7n-7 \geq 15$$

$$7n \geq 22$$

$$n \geq 3,14$$

$$n \approx 4$$

Keterangan :

n = jumlah pengulangan (4 kali pengulangan)

p = jumlah kelompok perlakuan (konsentrasi ekstrak daun ketepeng cina)

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas adalah ekstrak etanol daun ketepeng cina (*Cassia alata*) dengan konsentrasi ekstrak 0%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, Konsentrasi tersebut ditentukan sebagai konsentrasi pada penelitian pendahuluan. Pada konsentrasi 20% jamur masih tumbuh sangat tebal dan tidak dapat dihitung dan pada konsentrasi 25% tidak didapatkan pertumbuhan jamur. Sehingga dilakukan penelitian definitif dengan menggunakan konsentrasi 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%.

4.4.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah tingkat pertumbuhan koloni *Candida albicans* pada *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) untuk menentukan KHM.

4.5 Definisi Operasional

1. Daun ketepeng cina adalah tanaman yang didapatkan di hutan Kalimantan Tengah. Dipilih daun yang segar, muda, berwarna hijau, dan berasal dari satu pohon. Kemudian diproses menjadi bubuk kering untuk di ekstrak.
2. Ekstrak daun ketepeng cina merupakan hasil ekstraksi cair daun ketepeng cina dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%.
3. Isolat *Candida albicans* adalah isolat yang berasal dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.

Dengan standar suspensi *Candida albicans* yang digunakan adalah 10^4 CFU/ml (Murray *et al.*, 1999).

4. Kadar Hambat Minimum (KHM) dapat ditentukan yaitu pada konsentrasi terendah dari antimikroba yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri dengan metode dilusi agar yang ditandai dengan tidak didapatkan pertumbuhan koloni pada medium agar (NCCLS, 2003).
5. Hasil penelitian dinyatakan dalam bentuk *scoring*, yaitu +4, +3, +2, +1, 0, yang berarti :
 - +4 : koloni tumbuh sangat tebal dan tidak terhitung
 - +3 : koloni tumbuh tebal dan tidak terhitung
 - +2 : koloni tumbuh tipis dan tidak terhitung
 - +1 : koloni tumbuh sangat tipis dan tidak terhitung
 - 0 : tidak ada pertumbuhan koloni

(Saheli *et al.*, 2012)

4.6 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian meliputi pembuatan ekstrak etanol daun ketepeng cina, identifikasi jamur uji (*Candida albicans*), persiapan suspensi jamur, dan uji efek antijamur ekstrak daun ketepeng cina.

4.6.1 Prosedur Pembuatan Ekstrak Daun Ketepeng Cina

4.6.1.1 Alat dan Bahan Pembuatan Ekstrak Daun Ketepeng Cina

Alat yang digunakan dalam pembuatan ekstrak daun ketepeng cina antara lain: blender, timbangan analitik, serbuk daun ketepeng cina, aquades, baker glass, kertas saring whatman no.40 untuk penyaringan daun ketepeng cina yang direndam dengan etanol 96%, gelas erlenmeyer, dan vacuum oven.

4.6.1.2 Ekstraksi dan Evaporasi

Proses ekstraksi daun ketepeng cina dilakukan dengan metode Maserasi dengan pelarut etanol 96% sesuai dengan prosedur standar Laboratorium Teknik Kimia Polinema Malang.

1. Daun ketepeng cina yang sudah halus ditimbang dengan menggunakan timbangan analitik sebanyak 500 gram. Sampel halus sebanyak 500 gram kemudian direndam dengan pelarut etanol 96% dalam wadah beker glass dengan perbandingan 1 : 3 (1 kg bahan → 3 liter pelarut etanol 96%).
2. Merendam bahan dan mendiamkan pada suhu kamar selama minimal 2x24 jam dengan sesekali diaduk. Setelah 2x24 jam, rendaman dalam beker glass tersebut disaring.
3. Menyaring bahan rendaman dengan menggunakan kertas saring whatman no.40, hasil penyaringannya diwadahi dengan erlenmeyer glass.
4. Pelarut yang diperoleh (yang mengandung bahan aktif) di evaporasi untuk menghilangkan sisa pelarut etanol 96% dengan menggunakan vacuum oven.
5. Mengoven kembali sisa pelarut yang tersisa dengan vacuum oven dengan suhu 40-50°C sehingga benar-benar tidak mengandung pelarut etanol.

(Handa, 2005)

4.6.2 Identifikasi Jamur *Candida albicans*

4.6.2.1 Pewarnaan Gram

A. Alat dan Bahan Pewarnaan Gram Jamur

Alat kultur *Candida albicans* yaitu : pembakar spirtus, korek api, ose, inkubator, lemari pendingin. Bahan kultur yaitu: biakkan *Candida albicans* pada agar miring *Sabouraud Dextrose Agar* Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

B. Prosedur Pewarnaan Gram Jamur

1. Gelas objek disterilkan dengan kapas beralkohol 96%, kemudian dilewatkan di atas api dan dibiarkan dingin.
2. Satu ose (1µl) 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.
3. Sediaan dikeringkan di udara, kemudian dilakukan fiksasi dengan cara melewati sediaan di atas api.
4. Sediaan pada gelas objek ditetesi dengan kristal violet selama 1 menit dan dibilas dengan air.
5. Sediaan ditetesi dengan lugol selama 1 menit dan dibilas dengan air.
6. Sediaan ditetesi dengan alkohol 96% selama 5 detik dan dibilas dengan air.
7. Sediaan ditetesi safranin selama ½ menit dan dibilas dengan air.
8. Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap

9. Sediaan dilihat dibawah mikroskop dengan lensa objektif perbesaran 100x dengan minyak imersi.
10. Hasil positif : *Candida albicans* tercat ungu (Gram positif), bentuk budding.
(Jawetz, 1996)

4.6.2.2 Uji Germinating Tube

A. Alat dan Bahan Uji *Germinating Tube*

Alat germinating tube yaitu, gelas obyek, gelas penutup, pembakar spiritus, korek api, ose, tabung reaksi, mikroskop, inkubator. Bahan *germinating tube* yaitu, isolat jamur *Candida albicans*, serum.

B. Uji Germinating Tube

1. Serum 0,5ml dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Brawijaya Malang disediakan dalam tabung.
2. Koloni terpisah *Candida albicans* pada *Sabouroud Dextrose Agar* diambil dengan menggunakan ose yang sudah steril kemudian dimasukkan ke dalam tabung yang berisi serum.
3. Diinkubasikan pada suhu 37°C selama 2 jam.
4. Kultur di dalam serum diambil menggunakan ose dan diletakkan pada gelas objek, lalu ditutup dengan kaca penutup.
5. Diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran lensa objektif 40x. Dicari bentukan *pseudohifa* memanjang khas *Candida albicans*.

(Egan, 1996)

4.6.3 Pembuatan Suspensi Jamur Uji

1. Dipersiapkan jamur *Candida albicans* dari SDA yang telah diuji 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 $\lambda_{\text{maks}} = 530 \text{ nm}$. 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 $0,5 \times 10^4$ hingga $2,5 \times 10^4$ 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 $0,5 \times 10^4$ hingga $2,5 \times 10^4$ CFU/ml (Murray *et al.*, 1999).

4.6.4 Uji Dilusi Agar

1. Disediakan 7 plate berdiameter 9 cm yang sebelumnya telah di sterilisasi dengan menggunakan otoklaf (suhu 121°C selama 15 menit), kemudian didinginkan hingga suhunya mencapai $45-50^\circ\text{C}$.
2. Masing-masing plate diisi dengan larutan ekstrak etanol daun ketepeng cina (*Cassia alata*) dengan konsentrasi 0%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24% dan dicampur dengan SDA. Volume yang

dipakai dalam setiap plate adalah 10 ml. Dengan perhitungannya sebagai berikut :

- Konsentrasi 0% : tanpa ekstrak + 10 ml SDA
- Konsentrasi 19% : 1,9 ml ekstrak + 8,1 ml SDA
- Konsentrasi 20% : 2 ml ekstrak + 8 ml SDA
- Konsentrasi 21% : 2,1 ml ekstrak + 7,9 ml SDA
- Konsentrasi 22% : 2,2 ml ekstrak + 7,8 ml SDA
- Konsentrasi 23% : 2,3 ml ekstrak + 7,7 ml SDA
- Konsentrasi 24% : 2,4 ml ekstrak + 7,6 ml SDA

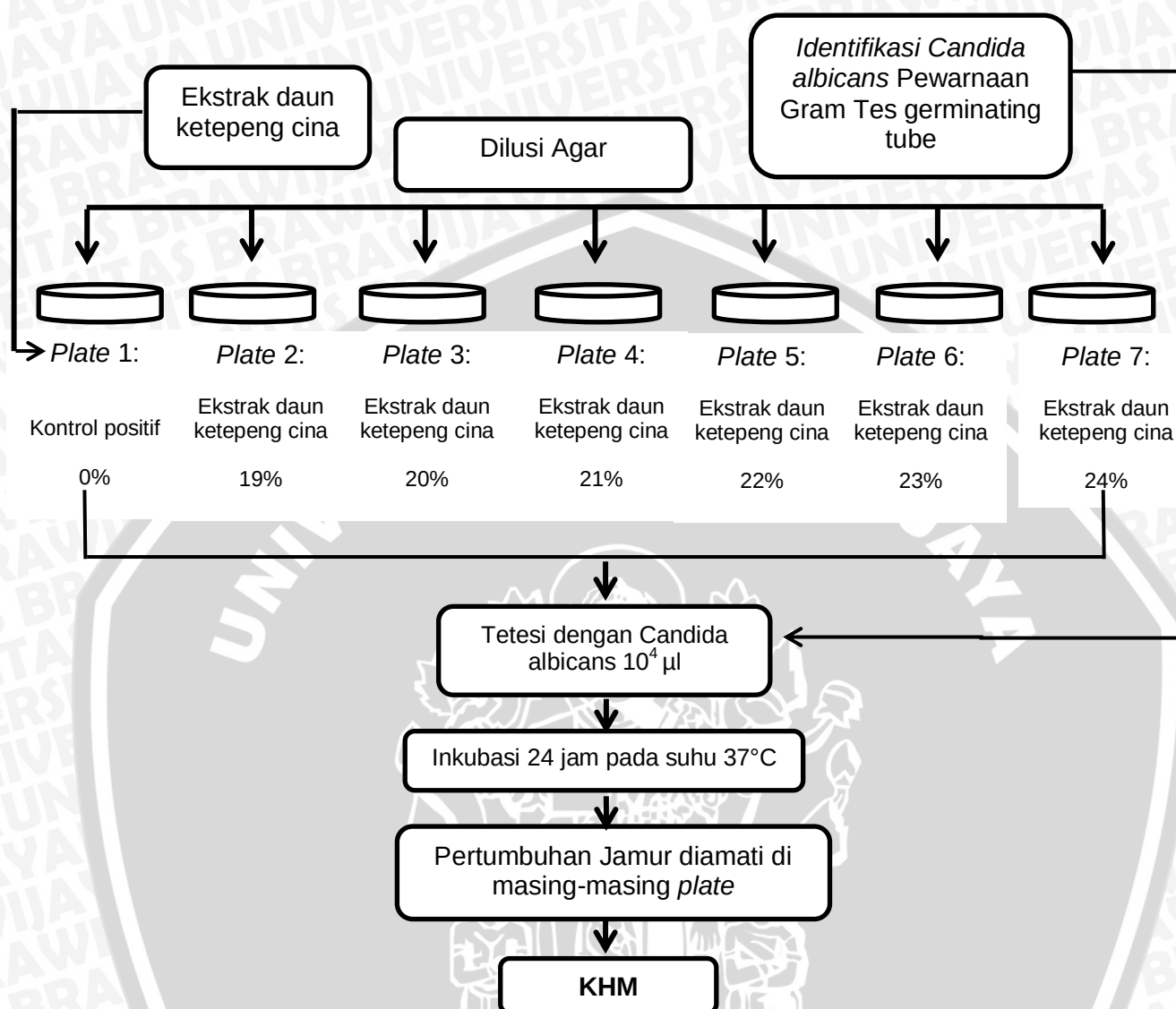
3. Keesokan harinya, setiap *plate* tersebut digaris menjadi 4 bagian untuk masing-masing perlakuan karena dalam penelitian ini menggunakan 4 pengulangan yang masing-masing akan ditetesi jamur uji sebanyak 1 tetes mikro pipet yang setara dengan 10 μ l mengandung 10⁴CFU/ml.

4. Kemudian semua plate diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

5. Koloni yang tumbuh pada agar plate diamati. KHM ditentukan pada plate dengan konsentrasi terendah yang tidak ditemukan adanya pertumbuhan koloni jamur.

(Forbes, 2007).

4.7 Alur Kerja Penelitian



Gambar 4.1 Alur Kerja Penelitian Ekstrak Etanol Daun Ketepeng Cina terhadap *Candida albicans*.

4.8 Analisis Data

Data yang diperoleh dalam penelitian ini adalah data kualitatif dari hasil pertumbuhan koloni *Candida albicans* pada agar plate yang diinkubasikan pada suhu 37°C selama 18-24 jam berupa data konsentrasi ekstrak daun ketepeng cina dan pertumbuhan koloni jamur. Analisis yang digunakan adalah uji statistik Kruskal Wallis untuk mengetahui perbedaan pengaruh dari berbagai konsentrasi

ekstrak daun ketepeng cina terhadap *Candida albicans* sehingga jika ekstrak daun ketepeng cina memiliki pengaruh yang signifikan terhadap *Candida albicans*, uji Mann Whitney yang digunakan untuk mengetahui perbedaan pengaruh pemberian ekstrak daun ketepeng cina sebagai antifungal terhadap jamur *Candida albicans* pada setiap konsentrasi, dan uji korelasi Spearman untuk mengetahui besarnya keeratan hubungan pemberian perlakuan terutama yang disebabkan oleh pemberian ekstrak daun ketepeng cina dengan pertumbuhan koloni jamur *Candida albicans*. Hasil penelitian ini dianalisis menggunakan program analisis statistic, *IBM SPSS (Statistical Products and Service Solutions) Statistics, version 22.0 for windows*. Dalam perhitungan hasil penelitian ini digunakan taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$).

