

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratoris murni secara *in vitro*.

B. Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilakukan dengan mengisolasi biakan *Candida albicans* di laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Pembuatan ekstrak kapulaga dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Universitas Gajah Mada, Yogyakarta. Pengujian pengaruh ekstrak kapulaga terhadap *Candida albicans* dilakukan di laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

Penelitian ini dilakukan pada bulan Juni 2011.

C. Identifikasi Variabel Penelitian

1. Variabel pengaruh : Ekstrak kapulaga (*Amomum compactum*) dengan konsentrasi 100%; 50%; 25%; 12,5%; 6,25%; 3,125%; 1,5625%; 0,78125%; 0,390625% yang diperoleh dengan metode pengenceran berseri (dilusi)
2. Variabel terpengaruh : Pertumbuhan *Candida albicans*
3. Variabel terkendali :

- a. Ekstrak kapulaga (*Amomum compactum*)
- b. Biakan *Candida albicans*
- c. Suhu pembiakan *Candida albicans* 37⁰C
- d. Lama pembiakan *Candida albicans* selama 24 jam
- e. Larutan kuman yang digunakan adalah larutan standar dengan konsentrasi 10⁶ CFU/ml. CFU adalah *Coloni Forming Unit*. CFU/ml adalah satuan yang digunakan untuk menunjukkan konsentrasi atau kekeruhan suatu larutan.
- f. Jenis media kultur *Candida albicans* adalah *Sabouroud Dextrose Agar* (SDA).
- g. Suhu inkubasi metode dilusi 37⁰C
- h. Sterilisasi alat

D. Definisi Operasional

1. *Candida albicans* adalah jamur dimorfik, merupakan ragi lonjong, bertunas, gram-positif, berukuran 2-3 x 4-6 μm hingga 2-5,5 x 5-28 μm , membentuk sel-sel bertunas yang memanjang menyerupai hifa (pseudohifa).
2. Kapulaga merupakan buah berbentuk kapsul bulat, berdiameter 1-1,5 cm, bergaris-garis rapat, memiliki banyak biji, kecil-kecil, dan terlindung dalam salut biji (*arillus*) berwarna keputihan

3. Metode maserasi adalah metode pembuatan ekstrak dengan perendaman simplisia dalam larutan etanol dalam 3 hingga 5 hari yang kemudian akan dievaporasi dan diambil ekstraknya.
4. Metode dilusi adalah metode pengukuran anti mikroba dengan cara pengenceran berseri (cair) dan metode dilusi padat
5. Kadah Hambat Minimal (KHM) ditentukan dengan melihat kejernihan dari rangkaian seri pengenceran dan dan Kadar Bunuh Minimal (KBM) ditentukan dengan melihat ada tidaknya pertumbuhan jamur pada media SDA setelah diberi anti jamur yang diuji.
6. Kontrol positif berupa tabung reaksi yang berisi biakan *Candida albicans* tanpa diberi ekstrak kapulaga dan kontrol negatif berupa tabung reaksi yang berisi larutan ekstrak kapulaga dari tabung reaksi sebelumnya tanpa diberi akuades maupun *Candida albicans*. Kontrol digunakan sebagai acuan pembanding kejernihan dan tingkat pertumbuhan *Candida albicans*.

E. Alat dan Bahan Penelitian

1. Alat Penelitian
 - a. Tabung reaksi dan rak tabung reaksi
 - b. Pipet 10 ml dan mikropipet 1 ml
 - c. Ose steril
 - d. Kapas lidi steril
 - e. Autoklaf

- f. Inkubator
- g. Neraca timbangan
- h. Masker
- i. Sarung tangan
- j. Cawan petri

2. Bahan Penelitian

- a. Kapulaga (*Amomum compactum*)
- b. Biakan *Candida albicans*
- c. Larutan etanol
- d. Aquades steril
- e. Media *Sabouroud Dextrose Agar* (SDA)
- f. Larutan *Casein Yeast Glucose* (CYG)

F. Cara Kerja Penelitian

1. Persiapan Penelitian

a. Cara Pembuatan Ekstrak Kapulaga

Pembuatan ekstrak kapulaga dengan metode maserasi. Kapulaga yang telah kering dipotong-potong dengan derajat kehalusan 8/24. Kapulaga direndam di dalam larutan etanol, dengan perbandingan 1000 gram kapulaga dengan 100 ml etanol, dalam wadah yang tertutup rapat dan terhindar dari sinar matahari selama 5 hari. Hasil proses maserasi ini akan menghasilkan

ekstrak dalam bentuk cair yang masih tercampur dengan etanol. Untuk menghilangkan etanol, hasil maserasi tersebut dievaporasi dengan titik didih diatas titik didih etanol, sehingga etanol dapat menguap dan menyisakan ekstrak kapulaga murni.

b. Pembiakan *Candida albicans*

- 1) Subjek penelitian merupakan hasil biakan *Candida albicans* yang diambil dari rongga mulut.
- 2) *Candida albicans* diambil dari rongga mulut dengan menggunakan ose steril dan ditanam pada media *Sabouroud Dextrose Agar*
- 3) Media *Sabouroud Dextrose Agar* kemudian diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 24 jam.
- 4) Setelah biakan jamur pada media *Sabouroud Dextrose Agar* tumbuh, biakan tersebut diambil dengan ose steril dan dimasukkan ke dalam larutan *Casein Yeast Glucose (CYG)* sebanyak 2 ml.
- 5) Larutan *Casein Yeast Glucose* yang sudah dimasukkan jamur biakan diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 4 jam.
- 6) Setelah itu diambil sebanyak 0,1 ml biakan jamur pada larutan *Casein Yeast Glucose* dimasukkan kedalam larutan aquades steril sebanyak 9.9 ml. Pengenceran ini dilakukan

agar mendapat konsentrasi 10^6 CFU/ml sesuai dengan standar Brown III.

c. Metode Dilusi Cair

- 1) Tabung reaksi disiapkan sebanyak 11 tabung yang diberi nomor 1-11
- 2) Aquades sebanyak 1 ml pada dimasukkan tabung nomor 2-9 dan tabung nomor 11
- 3) Tabung 1 diisi larutan ekstrak pada konsentrasi awal sebanyak 1 ml yang merupakan konsentrasi 100 %
- 4) Tabung 2 diisi larutan ekstrak pada konsentrasi awal sebanyak 1 ml kemudian dicampur hingga larutan homogen, sehingga konsentrasi larutan menjadi 50 %
- 5) Tabung 3 diisi larutan sebanyak 1 ml yang diambil dari tabung 2, sehingga konsentrasi larutan menjadi 25 %
- 6) Tabung 4 diisi larutan sebanyak 1 ml yang diambil dari tabung 3, sehingga konsentrasi larutan menjadi 12,5 %
- 7) Tabung 5 diisi larutan sebanyak 1 ml yang diambil dari tabung 4, sehingga konsentrasi larutan menjadi 6,25 %
- 8) Tabung 6 diisi larutan sebanyak 1 ml yang diambil dari tabung 5, sehingga konsentrasi larutan menjadi 3,125 %
- 9) Tabung 7 diisi larutan sebanyak 1 ml yang diambil dari tabung 6, sehingga konsentrasi larutan menjadi 1,5625 %

- 10) Tabung 8 diisi larutan sebanyak 1 ml yang diambil dari tabung 7, sehingga konsentrasi larutan menjadi 0,78125 %
- 11) Tabung 9 diisi larutan sebanyak 1 ml yang diambil dari tabung 8, sehingga konsentrasi larutan menjadi 0,390625 %
- 12) Tabung 10 diisi larutan sebanyak 1 ml yang diambil dari tabung 9, digunakan sebagai kontrol negatif yang terdiri dari larutan ekstrak kapulaga dengan konsentrasi 0,390625 % sebanyak 1 ml.

2. Jalan Penelitian

- a. Pada tabung nomor 1-9 dan 11 yang telah berisi ekstrak kapulaga sesuai konsentrasinya kemudian diisi larutan biakan *Candida albicans* dengan konsentrasi 10^6 CFU/ml sebanyak 1 ml untuk tiap tabung.
- b. Tabung 11 terdiri dari larutan aquades 1 ml dan larutan biakan *Candida albicans* yang digunakan sebagai kontrol positif
- c. Tabung no 10 terdiri dari 1 ml larutan ekstrak kapulaga berkonsentrasi 0,390625 % digunakan sebagai kontrol negatif.
- d. Kemudian tabung nomor 1-11 diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah 24 jam, diamati tingkat kejernihan larutan pada setiap tabung
- e. Larutan pada tabung 1-9 yang telah diinkubasi selama 24 jam diambil dengan menggunakan ose steril dan ditanam pada media

Sabouroud Dextrose Agar.

- f. Media tersebut diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 24 jam.
- g. Setelah 24 jam, pertumbuhan *Candida albicans* diamati pada media SDA.
- h. Percobaan dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali.

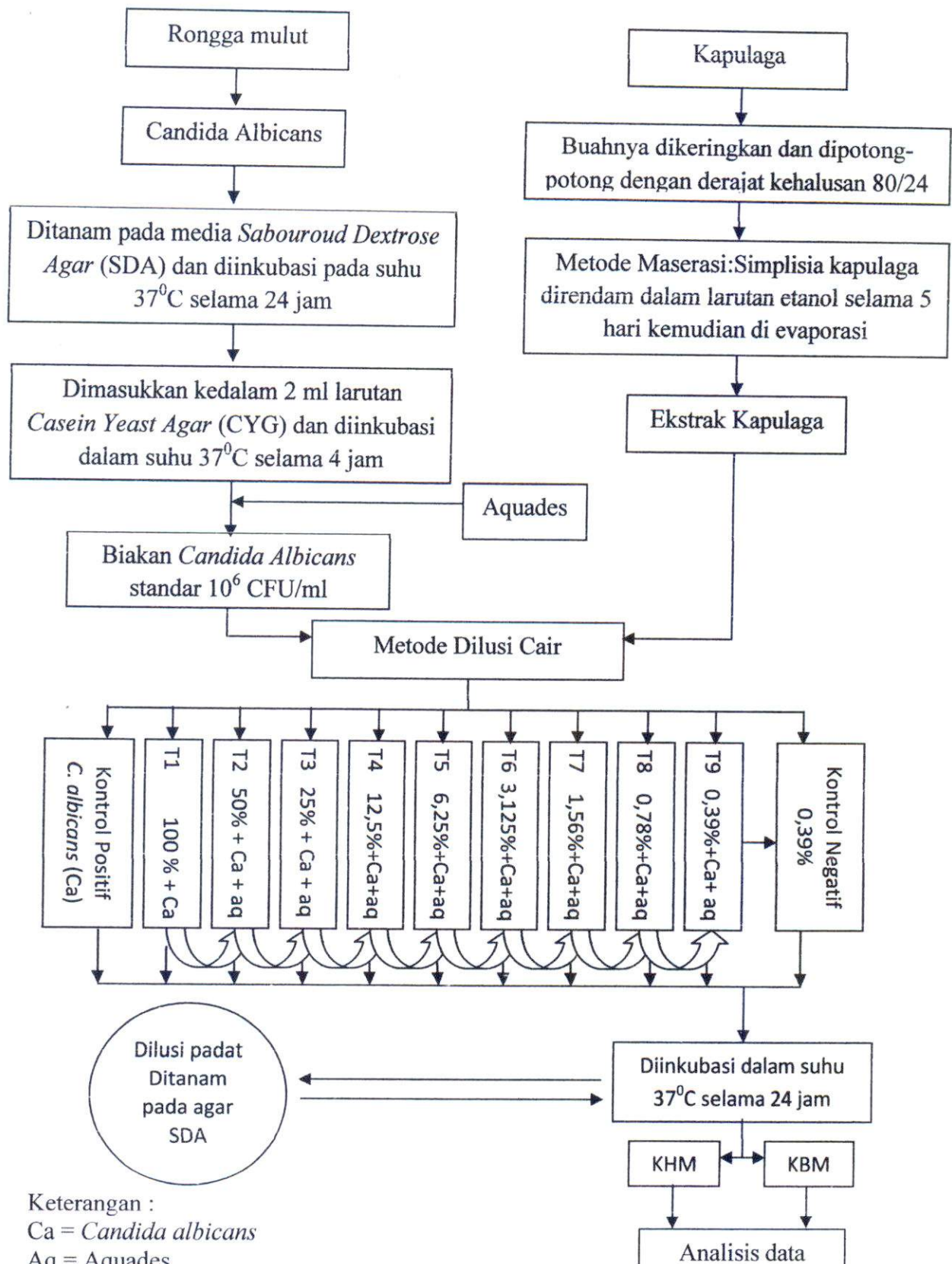
3. Cara Pengukuran Hasil Penelitian

Pengaruh ekstrak kapulaga terhadap pertumbuhan *Candida albicans* ditentukan dengan mengamati daya hambat minimal dan daya bunuh minimal.

Daya hambat minimal ditentukan dengan melihat adanya kekeruhan larutan pada tabung reaksi yang dibandingkan dengan larutan pada tabung kontrol positif dan kontrol negatif.

Daya bunuh minimal ekstrak kapulaga terhadap pertumbuhan *Candida albicans* ditentukan dengan melihat ada atau tidaknya pertumbuhan koloni *Candida albicans* pada media *Sabouroud*

G. Alur Penelitian



H. Analisis Data

Data hasil penelitian tentang pengaruh ekstrak kapulaga (*Amomum compactum*) terhadap pertumbuhan *Candida albicans* dianalisis menggu-