BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian

Metode penelitian yang dapat digunakan untuk penelitian ini adalah *True Experiment Design* dengan rancangan *post-test only control group design*. Penelitian ini menggunakan metode uji dilusi agar dan uji dilusi.

4.2 Lokasi Dan Waktu Penelitian

Pelaksanaan penelitian ini bertempat di Laboratorium Biomedik FK UMM pada bulan November 2023.

4.3 Populasi Dan Sampel Penelitian

4.3.1 Populasi

Dalam penelitian ini yang akan menjadi populasi penelitian adalah jamur *Malassezia furfur* yang didapatkan dari Laboratorium Biomedik FK UMM.

4.3.2 Sampel

4.3.2.1 Besar Sampel

Pada penelitian ini terdapat 10 kelompok, yang dimana terdiri dari 8 kelompok perlakuan ekstrak daging buah mangga dan 2 kelompok control. Penentuan jumlah pengulangan menggunakan rumus Federer, yaitu (Faisal, 2021):

(n-1) (t-1) ≥ 15

(10-1) (t-1) ≥ 15

9t-9 ≥ 15

9t ≥ 24

t $\geq 2,66$ (dibulatkan menjadi 3)

keterangan:

n : Jumlah perlakuan

t : Jumlah pengulangan yang dilakukan

Berdasarkan hasil perhitungan menggunakan rumus Federer diperoleh $t \geq 3$, sehingga diperlukan 3 kali pengulangan. Dimana pada setiap 1 pengulangan terdapat 10 kelompok dengan perlakuan yang berbeda tiap kelompoknya.

4.3.2.2 Teknik Pengambilan Sampel

Metode Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah *simple random sampling*

4.3.2.3 Karakteristik sampel penelitian

4.3.2.3.1 Kriteria inklusi

Biakan jamur *Malassezia furfur* yang telah diinkubasi selama 24 jam sesuai dengan standar *McFarland 1*.

4.3.2.3.2 Kriteria eksklusi

Biakan jamur *Malassezia furfur* yang terkontaminan.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstraksi daging buah mangga dalam berbagai konsentrasi yang telah ditentukan.

4.4.2 Variabel Kontrol

Variabel kontrol yang digunakan pada penelitian ini adalah jamur *Malassezia furfur* dan Medium biakan dengan suhu inkubasi 37ºC dan waktu inkubasi 18- 24 jam.

4.4.3 Variabel Tergantung

Pada penelitian ini variable tergantungnya adalah kadar hambat minimum (KHM) dan kadar bunuh minimum (KBM) yang terbentuk dari *Malassezia furfur.*

4.5 Definisi Operasional

Tabel 4. 1 Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi perasional	Cara Pengukuran	Indikator Penilaian	Skala
Variabel Bebas					
1.	Ekstrak daging buah mangga (*Mangifera indica. L*)	Ekstrak daging buah mangga adalah daging buah mangga yang didapatkan dari PT Rajasa Situbondo yang diambil bagian dagingnya saja lalu dikeringkan kemudian dihaluskan dan	Ekstrak daging buah mangga diukur dengan mikro pipet sesuai konsentrasi pada tiap-tiap tabung.	Konsentrasi: 1. 100% 2. 50% 3. 25% 4. 12,5% 5. 6,25% 6. 3,125% 7. 1,56% 8. 0,78% 9. 0,39% 10. 0%	Kategorik (Ordinal)

		dimaserasi di dalam larutan etanol 70% kemudian diambil filtratnya menggunakan filter lalu diuapkan dalam rotary evaporator hingga menghasilkan ekstrak dari daging buah mangga.			
Variabel Terikat					
1.	*Malassezia furfur*	*Malassezia furfur* didapatkan dari Indilab kota Samarinda. *Malassezia furfur* adalah jamur sapofit. Pertumbuhan jamur *Malassezia furfur* dapat dilihat dengan menghitung koloni *Malassezia furfur.*	Dihitung dengan *Colony Counter*	Jumlah koloni jamur *Malassezia furfur* pada setiap media agar.	Numerik (Rasio)
2.	Kadar Hambat Minimum (KHM)	Kadar terkecil dari ekstrak daging buah mangga *(Mangifera indica L.)* yang dapat menghambat pertumbuhan jamur	Dinilai menggunakan cara pengamatan kualitatif (pengamatan menggunakan indra dengan cara melihat garis hitam pada kontrol	Tingkat kekeruhan dan kejernihan berdasarkan pembanding yaitu Kontrol negatif. -Sangat Keruh (Garis hitam tidak dapat terlihat sama	Kategorik (Ordinal)

		Malassezia furfur.	kuman) atau kuantitatif dengan menghitung rata-rata koloni jamur <10% dari kontrol negatif pada media SDA .	sekali): ++ -Keruh (Garis hitam terlihat namun samar): + -Jernih (Garis Hitam dapat terlihat dengan jelas): -	
3.	Kadar Bunuh Minimum (KBM)	Kadar terkecil dari ekstrak daging buah mangga *(Mangifera indica L.)* yang mampu membunuh jamur *Malassezia furfur.*	Perhitungan dengan metode Colony Counter	Tidak ditemukan pertumbuhan jamur *Malassezia furfur* atau maksimal 0,1% dari kontrol bahan yang dihitung dengan Colony Counter	Rasio

4.6 Instrumen Penelitian

4.6.1 Alat dan bahan yang akan digunakan untuk membuat ekstrak daging buah mangga

Tabel 4. 2 Alat dan bahan pembuatan ekstrak daging mangga

ALAT	BAHAN
Neraca analitik	Daging buah mangga kering
Blender	Etanol 70%
Kertas saring	Aquades
Tabung ekstraktor	
Labu destilasi	
Pendingin spiral	
Water pump	
Evaporator	
Vakum pump	
Corong gelas	
Cawan porselin	
Beaker glass	

4.6.2 Alat dan bahan uji efektifitas kepekaan ekstrak daging buah mangga (*Mangifera indica L.)*

Tabel 4. 3 Alat dan bahan uji efektifitas kepekaan ekstrak daging buah mangga

ALAT	BAHAN
Cawan Petri Erlenmeyer Neraca Autoklaf Tabung Reaksi	Ekstrak daging buah mangga *(Mangifera indica. L)* ***Sabouraud Dextrose Broth (SDB)*** *Saboraud Dextrose Agar (SDA)* Minyak zaitun Aquades Tween

4.6.3 Alat dan bahan identifikasi jamur *Malassezia furfur*

Tabel 4. 4 Alat dan bahan identifikasi jamur *Malassezia furfur*

ALAT	BAHAN
Object glass Mikroskop *Cover glass* Ose Vortex	Pewarna LPCB Minyak imersi *Aquades* Isolat jamur *Malassezia furfur* NaCl

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Sterilisasi alat

Cara melakukan sterilisasi alat:

1. Cuci seluruh peralatan menggunakan sabun, kemudian keringkan seluruh peralatan dengan tisu.
2. Semua peralatan yang bisa disterilkan dengan autoklaf harus dibungkus dengan kertas selanjutnya dimasukan kedalam mesin autoklaf dengan tekanan 15 atm pada suhu 121°C dalam waktu

kurang lebih sekitar 15 menit. Semua peralatan yang tidak bisa disterilisasi menggunakan autoklaf, disterilisasi menggunakan alkohol 96%.

3. Peralatan lainnya disterilkan menggunakan alkohol.

4.7.2 Pembuatan medium SDA

1. Masukkan aquades sebanyak 600 ml ke dalam bubuk *Sabouraud Dextrose* Agar sebanyak 40 gr.
2. *Tween* dilarutkan menggunakan minyak zaitun. Minyak zaitun dicampurkan dengan larutan *Sabouraud Dextrose* Agar kemudian disterilisasi.
3. *Sabouraud Dextrose* Agar yang sudah disterilisasi dituangkan ke cawan petri sekitar 20 ml.

4.7.3 Pembuatan media SDB

1. Bahan SDB yang telah disiapkan ditimbang sekitar 2 gram, kemudian ditambahkan dengan aquades sekitar 30 ml lalu aduk hingga merata.
2. Minyak zaitun dengan takaran 0,03 ml dicampurkan dengan *tween* sebanyak 0,03 ml kemudian campur hingga rata, kemudian tambahkan campuran bahan *Sabouraud Dextrose Broth* dengan aquades.
3. Bahan-bahan yang sudah bercampur rata direbus, selanjutnya dilakukan sterilisasi menggunakan autoklaf pada 121°C dalam waktu sekitar 15 menit.

4. *Sabouraud Dextrose Broth* yang telah melalui proses sterilisasi dituang pada tabung reaksi dan ditunggu hingga dingin.

4.7.4 Pembuatan perbenihan cair

Perbenihan cair dibuat dari hasil peremajaan biakan jamur *Malassezia furfur* dimana caranya adalah dengan mengambil satu ujung ose steril. Ujung ose steril yang sudah diambil dimasukkan pada tabung reaksi yang sudah diisi oleh NaCl fisiologis, kemudian dilakukan pengocokan dalam vortex sehingga menghasilkan kekeruhan dengan ketentuan dari *McFarland* I: 108 CFU/ml. Suspensi yang telah terbentuk kemudian diencerkan sebanyak 10 kali dengan NaCl fisiologis dengan begitu konsentrasi yang didapatkan sebesar 107 CFU/ml. Suspensi selanjutnya diencerkan kembali sebanyak 10 kali pada larutan *Sabouraud Dextrose Broth* yang telah dibuat sebelumnya dan hasil akhirnya akan diperoleh konsentrasi *Malassezia furfur* sekitar 106 CFU/ml.

4.7.5 Pembuatan ekstrak daging buah mangga *(Mangifera indica L.)*

1. Daging buah mangga *(Mangifera indica L.)* dengan berat 500 g dicuci hingga bersih, kemudian dilakukan tahap pengeringan sampai benar-benar kering tanpa terkena sinar matahari.
2. Sampel daging buah mangga *(Mangifera indica L.)* yang telah dikeringkan, diblender agar menjadi bentukan serbuk.
3. Ekstraksi kemudian dilakukan menggunakan cara maserasi dengan pelarut berupa etanol 70%. Serbuk daging mangga *(Mangifera indica L.)* 500 gram diekstrak dengan menggunakan 1500 ml etanol 70%,

ekstrak yang telah di buat ditutup lalu disimpan didalam ruang yang gelap dan dikocok dengan shaker selama 24 jam dengan kecepatan 190-220 rpm.

4. Filtrat yang terbentuk kemudian diambil dan residu dimaserasi kembali dengan 1500 ml etanol 70%.
5. Filtrat dilakukan pengambilan setiap hari selama 3 hari.
6. Filtrat yang telah diambil dimasukkan menjadi satu wadah lalu dilakukan proses pemekatan dan dilakukan penguapan supaya pelarutnya dapat terpisah dengan alat yang disebut rotary evaporator dengan suhu 60°C sampai seluruh pelarut yang digunkana menguap dan diperoleh ekstrak kental dari daging mangga *(Mangifera indica L.)*

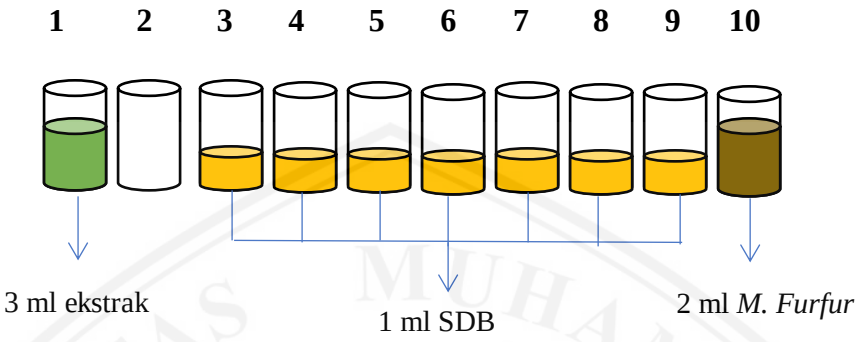
4.7.6 Uji efektifitas kepekaan antimikroba menggunakan metode dilusi

Metode yang digunakan untuk menguji efektivitas kepekaan antimikroba adalah metode dilusi tabung. Dalam pengujian ini, ekstrak daging buah mangga *(Mangifera indica L.)* diinokulasi menggunakan perbenihan cair jamur *Malassezia furfur* dan diinkubasi dalam suhu 37°C selama kurang lebih 3 x 24 jam dengan menggunakan 10 macam konsentrasi.

Hari ke 1 - 2

1. Untuk persiapan, 10 tabung diberi nama sesuai dengan urutan. Tabung nomor 3 hingga 9 diisi dengan 1 ml Sabouraud Dextrose Broth. Kemudian pada tabung nomor 1 dimasukkan ekstrak daging buah

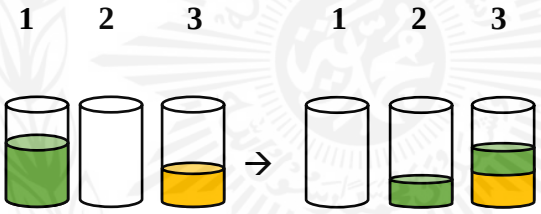
mangga dan pada tabung nomor 10 dimasukkan jamur *Malassezia furfur* sebanyak 2 ml.



Gambar 4. 1

Uji Pengaruh 10 tabung Hari 1 sampai 2

2. 1 ml ekstrak daging buah mangga *(Mangifera indica L.)* dimasukkan kedalam tabung 2 dan 3.



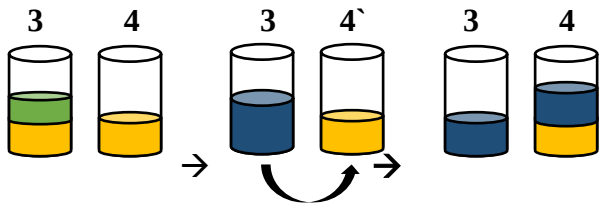
Gambar 4. 2

Uji Pengaruh 1 ml Ekstrak Daging Buah Mangga *(Mangifera indica L.)*

Konsentrasi ekstrak daging buah mangga *(Mangifera indica L.):*

1) Tabung 2 → 1 ml sebesar 100%
2) Tabung 3 → 2 ml sebesar 50%

3. Larutan SDB dicampurkan hingga rata dengan ekstrak daging buah mangga *(Mangifera indica L.)* pada tabung 3, selanjutnya dilakukan pemindahan sebanyak 1 ml ke dalam tabung 4.



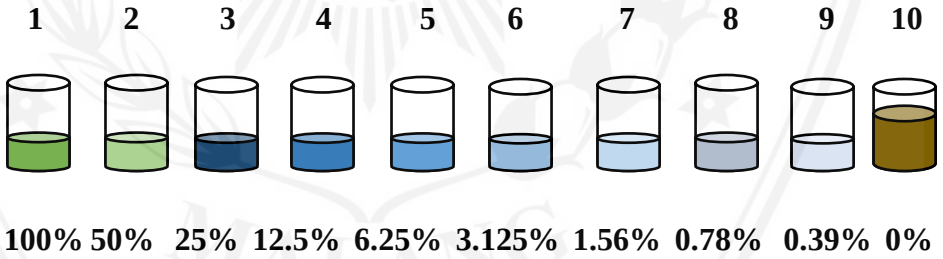
Gambar 4. 3

Pencampuran Larutan SDB

Konsentrasi ekstrak daging buah mangga *(Mangifera indica L.):*

1) Tabung 3 → 1 ml sebesar 50%
2) Tabung 4 → 2 ml sebesar 25%

4. Hal yang sama dilakukan seperti Langkah-langkah diatas terhadap tabung 4 hingga tabung 9.
5. Larutan pada tabung 9 dibuang sebanyak 1 ml setelah tercampur rata
6. Kemudian isi tabung 2 hingga tabung 9 dengan masing – masing 1 ml suspensi cair jamur *Malassezia furfur.*



Gambar 4.4
Hasil tabung 2 hingga 9 yang tercampur aquades

Hari ke 4

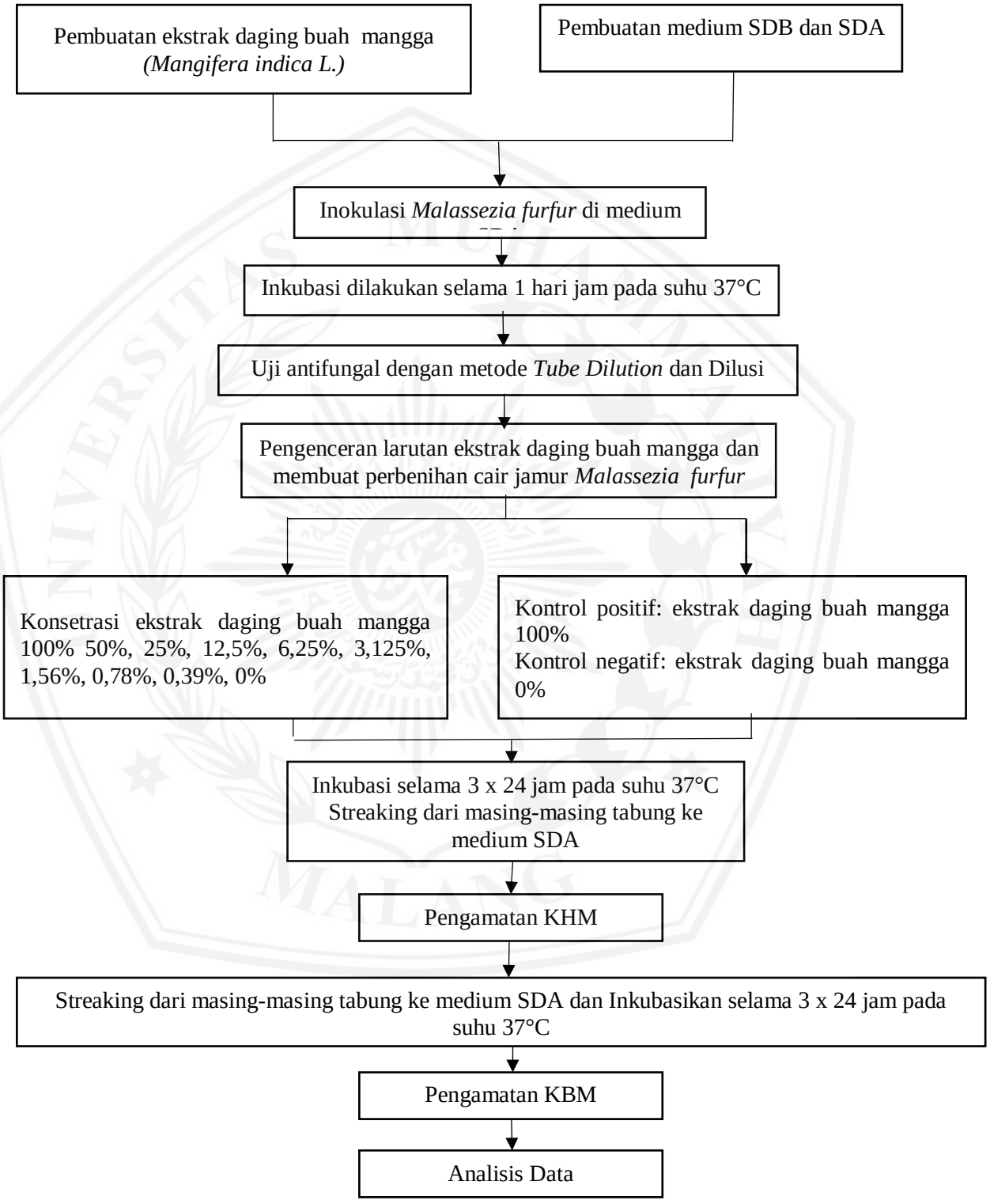
Setelah diinkubasi dalam inkubator, tabung-tabung tersebut diambil dan KHM-nya dinilai dengan melihat kejernihan tabung tersebut. Hasilnya dibandingkan dengan kontrol dengan keterangan (++), sangat keruh; (+),

keruh; dan (-), jernih. Selanjutnya, untuk menilai KBM, digunakan metode pengambilan ose steril sebanyak 1 kali dan diinokulasikan ke dalam medium SDA. Setelah itu, tabung kembali diinkubasi dengan suhu yang sama yaitu 37°C dalam waktu yang sama pula yakni 3x24 jam.

Hari ke 7

Semua medium SDA diambil dan dilakukan pengamatan kuantitatif dengan menggunakan colony counter pada seluruh konsentrasi. Hal ini berfungsi untuk menghitung jumlah dari nilai KBM koloni jamur *Malassezia furfur*. Pengamatan dilakukan setidaknya sebanyak 3 kali.

4.8 Alur Penelitian



4.9 Analisis Data

Data-data dalam penelitian ini dianalisis dengan uji normalitas dan homogenitas terlebih dahulu. Kemudian, jika distribusi data normal dan homogen, data dianalisis menggunakan uji *One Way Anova*.

a. Uji Normalitas

Uji normalitas bertujuan untuk mengetahui sebaran data normal atau tidak dengan menggunakan uji *Shapiro-Wilk*. Sebaran data dikatakan normal apabila sig > 0,05. Apabila sebaran data tidak normal, maka dilakukan transformasi data terlebih dahulu. Apabila hasil transformasi data normal, dilanjutkan dengan uji *One Way Anova* dan uji *Post-Hoc Bonferroni*. Apabila sebaran data tetap tidak normal, maka menggunakan uji *Kruskal-Wallis* dan uji *Post-Hoc Mann-Whitney*.

b. Uji Homogenitas

Uji homogenitas bertujuan untuk mengetahui varian atau kehomogenan data yang diperoleh dengan menggunakan uji *Levene Test*. Data dikatakan homogen apabila sig > 0,05.

c. Uji *One Way Anova*

Apabila sebaran data normal dan data homogen, maka dilanjutkan dengan uji *One Way Anova* untuk membuktikan adanya perbedaan bermakna antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Apabila diperoleh sebaran data tidak normal dan data tidak homogen, maka dilanjutkan dengan uji non parametrik yaitu uji *Kruskal-Wallis*.