

## **BAB 4**

### **METODE PENELITIAN**

#### **4.1 Rancangan Bagun Penelitian**

Penelitian ini adalah penelitian *true experimental* memakai *post-test only control group design*. Yang digunakan dalam metode penelitian ini adalah metode dilusi guna menilai KHM (Kadar Hambat Minimum) dan KBM (Kadar Bunuh Minimum) dari efektivitas ekstraksi kulit buah mangga terhadap jamur *M. furfur*.

#### **4.2 Lokasi dan Waktu Penelitian**

Dilaksanakannya penelitian ini di laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Malang selama 30 hari.

#### **4.3 Populasi dan Sampel**

##### **4.3.1 Populasi**

Populasi dalam penelitian ini ialah biakan murni jamur *M.furfur* didapatkan dari Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Malang.

##### **4.3.2 Sampel**

Pada penelitian ini menggunakan sampel jamur *M. furfur* ditentukan dengan metode *simple random sampling* dimana pengambilan sampel memberikan kesempatan yang sama kepada semua populasi untuk dijadikan sampel.

### 4.3.3 Jumlah Replikasi

Terdapat 10 kelompok, yang terdiri dari 8 kelompok perlakuan ekstrak kulit mangga dan 2 kelompok kontrol ditotalkan menjadi 10. Dengan rumus Federer ditentukan jumlah pengulangan ini (Faisal, 2021):

$$(k-1)(r-1) \geq 15$$

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

$$9r-9 \geq 15$$

$$9r \geq 24$$

$$r \geq 2,66 \text{ (dibulatkan menjadi 3)}$$

**keterangan:**

k : Jumlah perlakuan

r : Jumlah pengulangan yang dilakukan

Dari hasil perhitungan yang menggunakan rumus tersebut diperoleh  $r \geq 3$ , oleh karena itu diperlukan sekiranya 3 kali pengulangan dimana masing – masing pengulangan dibutuhkan sekitar 8 kelompok perlakuan dan 2 kelompok kontrol. Maka dari itu penelitian yang akan dilakukan ini membutuhkan sekitar 30 kelompok perlakuan.

### 4.3.4 Teknik Pengambilan Sampel

*Simple random sampling* merupakan metode penelitian yang digunakan dalam penelitian ini.

### 4.3.5 Karakteristik Sampel Penelitian

#### 4.3.5.1 Kriteria Inklusi

Biakan jamur dari *M. Furfur* yang diinkubasi selama 24 jam mengikuti dengan standar *McFarland 1*.

#### 4.3.5.2 Kriteria Eksklusi

Biakan dari jamur *M. Furfur* yang terkontaminan.

### 4.4 Variabel Penelitian

#### 4.4.1 Variabel Bebas

Yang digunakan pada kajian ini adalah ekstraksi dari kulit buah mangga dalam berbagai konsentrasi yaitu 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,56%, 0,78%, 0,39%, 0%.

#### 4.4.2 Variabel Terikat

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

### 4.5 Definisi Operasional

TABEL 4.1 Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi Operasional	Cara Pengukuran	Indikator Penilaian	Skala
<b>Variabel Bebas</b>					
1.	Ekstrak kulit buah mangga	Ekstrak kulit buah mangga adalah kulit buah mangga yang didapatkan dari PT Rajasa Arumanis	Ekstrak kulit buah mangga diukur dengan mikro pipet sesuai konsentrasi.	Konsentrasi: 1. 100% 2. 50% 3. 25% 4. 12,5% 5. 6,25% 6. 3,125% 7. 1,56% 8. 0,78%	Kategorik (Ordinal)

Situbondo yang diambil bagian kulitnya saja lalu dikeringkan kemudian dihaluskan dan dimaserasi di dalam larutan etanol 70% kemudian diambil filtratnya menggunakan filter lalu diuapkan dalam rotary evaporator hingga menghasilkan ekstrak dari kulit buah mangga. Ekstrak kulit buah mangga dibuat di Laboratorium Biomed Fakultas Kedokteran UMM.

### Variabel Terikat

1.	Kadar Hambat Minimum (KHM)	Kadar terkecil dari ekstrak kulit buah mangga yang dapat menghambat pertumbuhan jamur <i>M. furfur</i> . Yang nilai pada hari empat penelitian.	Dinilai menggunakan cara pengamatan kualitatif (pengamatan menggunakan indra dengan cara melihat garis hitam pada kontrol kuman) yaitu	Tingkat kekeruhan dan kejernihan berdasarkan pembandingan yaitu Kontrol negatif. -Sangat Keruh (Garis hitam tidak dapat terlihat sama sekali): ++	Kategorik (Ordinal)

			dengan presentase 100%, 50%, 25%, 12,5% + 6,25%, 3,125%, 1,56%, 0,78% 0,39% dan 0% atau kuantitatif dengan menghitung rata-rata koloni jamur <10% dari kontrol negatif pada media SDA .	-Keruh (Garis hitam terlihat namun samar): + -Jernih (Garis Hitam dapat terlihat dengan jelas): -	
2.	Kadar Bunuh Minimum (KBM)	Kadar terkecil dari ekstrak kulit buah mangga yang mampu membunuh jamur <i>M. furfur</i> . Yang diukur pada hari ke tujuh penelitian.	Penghitungan dengan metode Colony Counter	Tidak ditemukan pertumbuhan jamur <i>furfur</i> maksimal 0,1% dari bahan yang dihitung menggunakan Colony Counter	Rasio <i>M.</i> atau yang

#### 4.6 Alat, Bahan, dan Prosedur Penelitian

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

**TABEL 4.2** Alat dan bahan pembuatan ekstrak kulit buah mangga

ALAT	BAHAN
Neraca analitik	Kulit mangga kering
Blender	Etanol 70%
Kertas saring	Aquades
Tabung ekstraktor	
Labu destilasi	

---

Pendingin spiral  
 Water pump  
 Evaporator  
 Vakum pump  
 Corong gelas  
 Porselin  
 Beaker glass

---

#### 4.6.2 Alat dan bahan uji efektivitas kepekaan ekstrak kulit buah mangga

**TABEL 4.3 Alat dan bahan Uji Efektivitas Kepekaan Ekstrak Kulit buah mangga (*Mangifera indica. L*)**

<b>ALAT</b>	<b>BAHAN</b>
Cawan Petri	Ekstrak Kulit buah mangga
Erlenmeyer	( <i>Mangifera indica. L</i> )
Neraca	Sabouraud Dextrose Broth
Autoklaf	(SDB)
Autoklaf	Saboraud Dextrose Agar
Mikroplate	(SDA)
	Minyak zaitun
	Aquades
	Tween

#### 4.6.3 Alat dan bahan identifikasi jamur *M.furfur*

**TABEL 4.4 Alat dan bahan identifikasi jamur *M. Furfur***

<b>ALAT</b>	<b>BAHAN</b>
<i>Object glass</i>	Pewarna LPCB
Mikroskop	Minyak imersi
<i>Cover glass</i>	<i>Aquades</i>
Ose	Isolat jamur <i>M. furfur</i>
Vortex	NaCl

### 4.7 Prosedur Penelitian

#### 4.7.1 Sterilisasi Alat

- Dilakukan Sterilisasi alat dengan mencuci semua peralatan yang akan digunakan menggunakan sabun, kemudian dibiarkan hingga kering.

- Adapun peralatan dari kaca disterilkan menggunakan autoklaf menggunakan suhu 121°C dengan tekanan 15 atm kurang lebih 15 menit, sebelum alat disterilkan, alat terlebih dahulu dibungkus menggunakan kertas lalu dimasukkan kedalam mesin autoklaf.
- Peralatan lainnya disterilkan menggunakan alkohol.

#### 4.7.2 Pembuatan Medium *Sabouraud Dextrose* (SDA)

- Pembuatan sediaan menggunakan aquades 600 ml dan ditambahkan bubuk *Sabouraud Dextrose agar* sebanyak 40gram.
- Kemudian *Tween* dilarutkan dengan minyak zaitun yang dicampurkan dengan larutan *Sabouraud Dextrose agar* dan disterilkan menggunakan autoklaf.
- Dimasukkan ke dalam cawan petri yang telah dibersihkan tadi kurang lebih 20 ml.

#### 4.7.3 Pembuatan Medium *Sabouraud Dextrose Broth* (SDB)

- Siapkan bahan *Sabouraud Dextrose Broth* kurang lebih 2 gram, dan ditambahkan dengan aquades 30 ml dicampurkan hingga merata.
- Kemudian campuran bahan aquades dan bubuk *Sabouraud Dextrose Broth* ditambahkan dengan sediaan *tween* yang sudah ditimbang sebanyak 0,03 ml dan Minyak zaitun dengan takaran yang sama yaitu 0,03 ml dicampurkan hingga merata.
- Selanjutnya direbus dan sterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dalam waktu kurang lebih 15 menit

- Dituang dalam tabung reaksi dan ditunggu hingga dingin.

#### 4.7.4 Pembuatan perbenihan cair

Mengambil satu ujung ose steril dari biakan jamur *M. furfu* lalu dilakukan peremajaan dari biakan jamur *M. furfur* dan diletakkan didalam tabung reaksi yang sudah diisi dengan NaCl, kemudian dilakukan pengocokan menggunakan vortex yang menghasilkan kekeruhan sesuai ketentuan dari *McFarland I* : 10<sup>8</sup> CFU/ml. Lalu diencerkan kurang lebih 10 kali hingga mendapatkan konsentrasi yang mendekati. Selanjutnya diencerkan lagi sebanyak 10 kali menggunakan SDB yang telah dibuat hingga memperoleh hasil akhir konsentrasi kurang lebih 10<sup>6</sup> CFU/ml.

#### 4.7.5 Pembuatan Ekstrak Kulit Buah Mangga

- Kulit buah mangga kurang lebih 500 gram dicuci hingga bersih dan dikeringkan tanpa menggunakan sinar matahari.
- Kemudian setelah kering, kulit buah mangga diblender hingga berupa serbuk.
- Ekstraksi Kemudian dilakukan dengan cara maserasi dengan etanol 70%. Serbuk buah mangga 500 gram diekstrakkan menggunakan 1500 ml etanol 70%, dan ekstrak yang sudah dibuat kemudian ditutup dan disimpan diruangan yang tidak terkena cahaya.
- Selanjutnya dikocok dengan shaker selama 24 jam dengan kecepatan 190-220 rpm.
- Residu dimaserasi kembali dengan 1500 ml etanol 70%
- Dilakukan pengambilan filtrate setiap hari selama kurang lebih 3 hari.

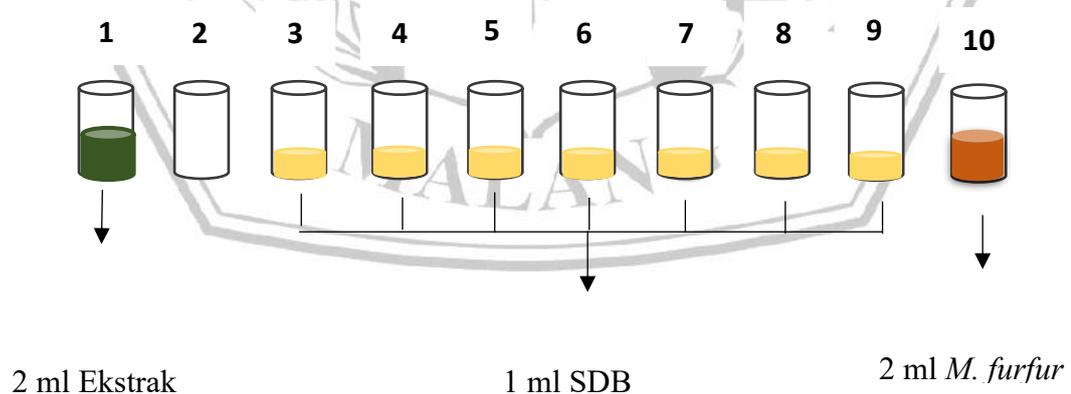
- Kemudian penguapan dilakukan dengan rotary evaporator dalam suhu kurang lebih 60°C hingga semuanya menguap dan tersisa hanya ekstrak yang kental dari kulit buah mangga.

#### 4.7.6 Uji efektivitas kepekaan antimikroba menggunakan metode dilusi

Metode untuk menguji efektivitas kepekaan antimikroba adalah metode dilusi tabung. Menggunakan 10 macam konsentrasi, ekstrak kulit buah mangga (*Mangifera indica L.*) diinokulasi menggunakan perbenihan cair jamur *M. furfur* dan diinkubasi dalam suhu 37°C dalam waktu kurang lebih 3 x 24 jam yaitu:

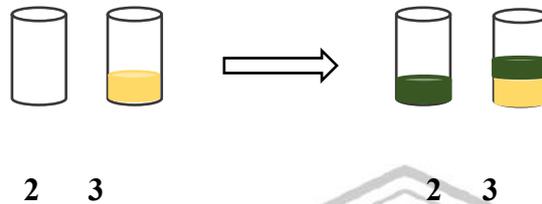
##### Hari ke 1 - 2

- Menyiapkan 10 mikroplate yang diberi nama sesuai dengan urutan. Pada mikroplate no 3 hingga 9 dimasukkan 1 ml *Sabouraud Dextrose Broth*. Kemudian pada mikroplate no 1 dimasukkan ekstrak kulit buah mangga dan jamur *M. furfur* pada mikroplate no 10 sebanyak 2 ml.



**Gambar 4. 1** Uji Efektivitas 10 mikroplate Hari 1 sampai 2

- b. Masukkan 1 ml ekstrak kulit dari buah mangga kedalam mikroplate 2 dan 3.

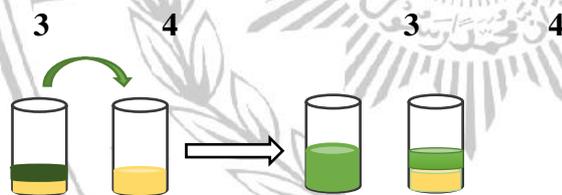


**Gambar 4. 10** Uji Efektivitas 1 ml Ekstrak Kulit Buah Mangga

Konsentrasi Ekstrak kulit buah mangga :

- Mikroplate 2 → 1 ml (100%)
- Mikroplate 3 → 2 ml (50%)

- c. Campurkan larutan SDB dengan ekstrak kulit buah mangga hingga merata dalam mikroplate 3, lalu dipindahkan 1 ml dari dalam mikroplate 3 ke mikroplate 4.



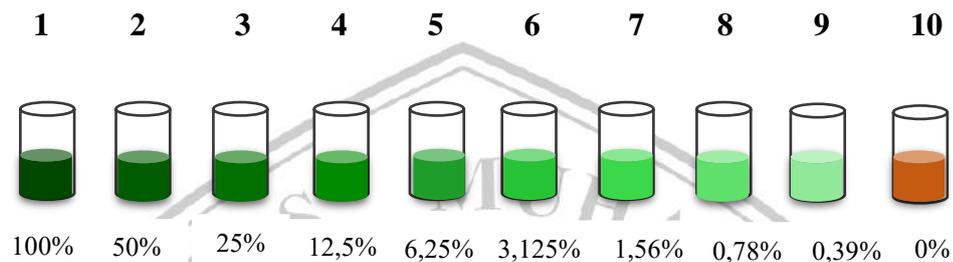
**Gambar 4. 18** Pencampuran Larutan SDB

Konsentrasi dari ekstrak kulit buah mangga :

- Mikroplate 3 → 1 ml (50%)
- Mikroplate 4 → 2 ml (25%)

- d. Lakukanlah hal serupa terhadap mikroplate nomor 4,5,6,7,8, dan mikroplate

- e. Setelah mikroplate nomor 9 tercampur rata buang larutan dalam mikroplate 9 sebanyak 1 ml.
- f. Kemudian isi mikroplate 2 hingga mikroplate 9 dengan persamaan 1 ml suspensi cair dari jamur *M. furfur* yaitu dengan presentase 0%.



**Gambar 4. 25** Pengenceran Larutan

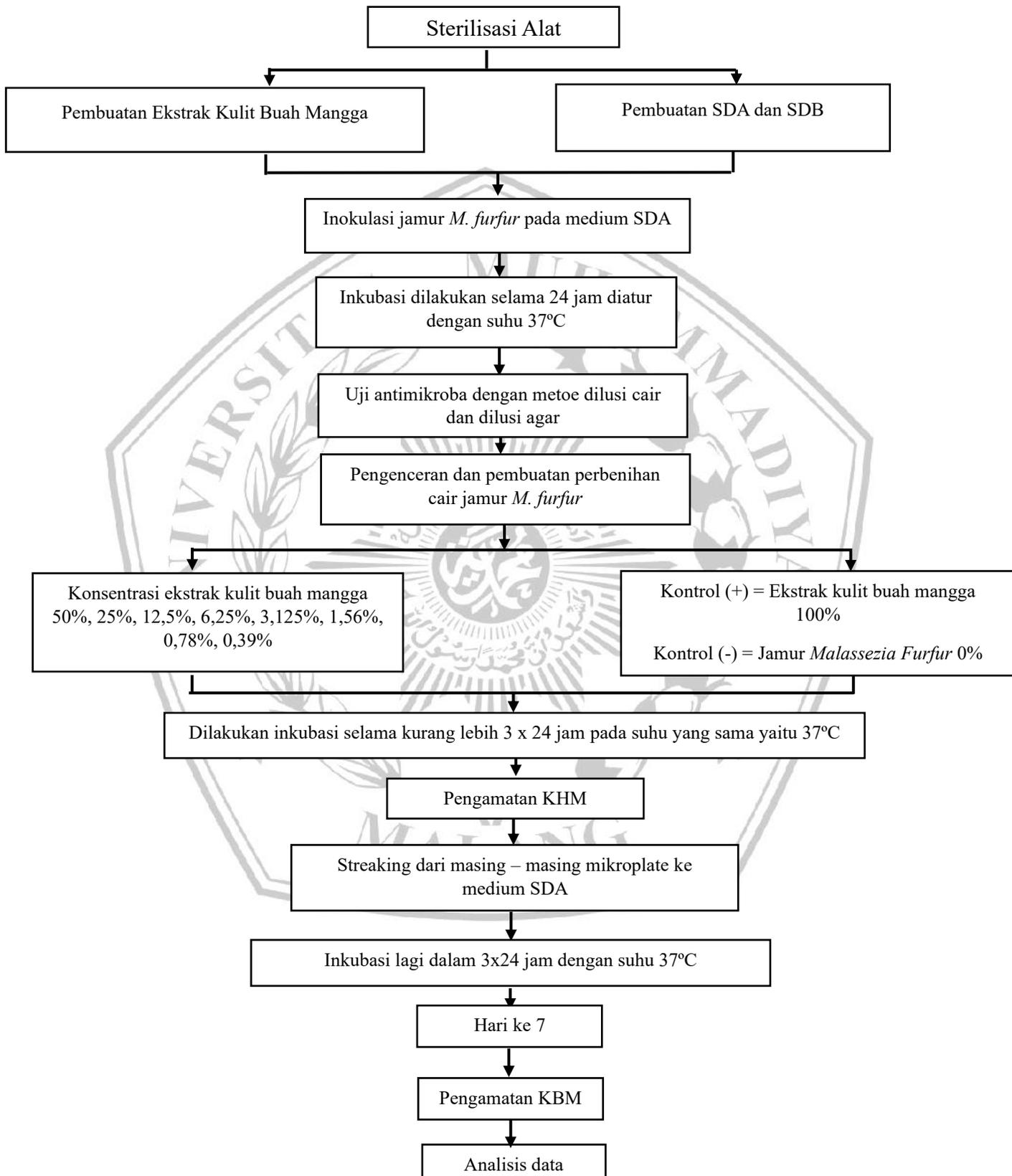
#### **Hari ke 4**

Mikroplate - mikroplate yang telah diinkubasi di dalam inkubator dikeluarkan, kemudian dinilai KHM dengan melihat atau mengamati kejernihan dari mikroplate tersebut berdasarkan perbandingan control dengan keterangan (++) sangat keruh, (+) keruh, (-) jernih. Kemudian untuk menilai KBM menggunakan metode pengambilan ose steril sebanyak 1 kali. Dan diinokulasikan kedalam medium SDA. Setelah itu mikroplate kembali diinkubasi dengan suhu yang sama yaitu 37°C dalam waktu yang sama pula yakni 3x24 jam.

#### **Hari ke 7**

Seluruh medium SDA dikeluarkan dan lalukanlah pengamatan kuantitatif menggunakan colony counter diseluruh konsentrasi untuk menghitung jumlah nilai KBM koloni jamur *M. furfur*. Setidaknya dilakukan sebanyak 3 kali pengamatan.

#### 4.8 Alur Penelitian



#### 4.9 Analisis Data

Analisis data diatas menggunakan uji *One Way Anova* untuk mengelola data perlakuan ekstrak kulit buah mangga terhadap jamur *M. furfur* dengan dilakukan pengujian uji normalitas dan uji homogenitas terlebih dahulu.

Uji normalitas dilakukan untuk menguji kelompok data penelitian apakah ter-distribusi normal atau tidak. Dinyatakan normal jika hasil  $p > 0,05$  dan tidak normal jika hasil  $p < 0,05$ . Data yang tidak normal sebelumnya ditransformasikan, bila data yang ditansformasikan tetap tidak normal maka pengolahan datanya akan dilakukan dengan uji *Kruskal-Wallis* serta *Post Hoc Mann Whitney*.

Data dikatakan homogen bila didapatkan nilai  $p > 0,05$  dan ragamnya dinyatakan tidak homogen bila didapatkan nilai  $p < 0,05$ . Pengujian *One Way ANOVA* dan *post hoc Bonferroni* dilakukan setelah data dinyatakan homogen. Apabila hasil data dan ragam didapatkan tidak homogen, dilaksanakan *One Way ANOVA* dan *post hoc Games Howell* hingga data dinyatakan homogen.