

BAB 4

Metode Penelitian

4.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan sebuah studi eksperimental yang mengadopsi pendekatan *posttest only control group design*, di mana pengamatan atau pengukuran dilakukan setelah perlakuan diberikan dan metode yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah uji dilusi agar, yang melibatkan pengenceran bertahap zat yang akan diuji ke dalam agar sebagai media pertumbuhan mikroorganismenya.

4.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

Berlangsung selama periode 30 hari yang akan dilaksanakan pada Laboratorium Biomedik di Fakultas Kedokteran di Universitas Muhammadiyah Malang.

4.3 Populasi dan Sampel Penelitian

4.3.1 Populasi

Populasi yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah Jamur *Malassezia Furfur*

4.3.2 Sampel

Jumlah sampel yang diperlukan dihitung menggunakan rumus Federer (1999), yang dinyatakan sebagai $(n-1)(t-1) > 15$. Di mana t merupakan jumlah

pengulangan dan n merupakan jumlah variabel perlakuan. Berdasarkan rumus tersebut, jumlah sampel yang dibutuhkan dapat dihitung.:

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

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

$$9t-9 \geq 15$$

$$t \geq \frac{15+9}{9}$$

$$t \geq \frac{24}{9}$$

$$t \geq 2,67$$

$$t \geq 3$$

Setelah dimasukkan rumus Federer didapat sebanyak 3 kali pengulangan eksperimen. Dimana setiap 1 pengulangan akan terdapat 10 kelompok *Malassezia Furfur* dengan perlakuan yang berbeda setiap kelompoknya.

4.3.3 Teknik pengambilan sampel

Metode pengambilan sampel menggunakan metode *Simple Random Sampling*.

4.3.4 Karakteristik sampel penelitian

4.3.4.1 Kriteria inklusi

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

4.3.4.2 Kriteria eksklusi

Biakan jamur *Malassezia Furfur* yang mengandung kontaminan.

4.4 Jenis Variabel

4.4.1 Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah dosis ekstrak biji mangga yang memiliki variasi konsentrasi seperti 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,56%, 0,78%, 0,39%, dan 0%.

4.4.2 Variabel kontrol

Variabel kontrol yang digunakan dalam penelitian ini adalah jamur *Malassezia furfur* serta medium biakan dengan suhu inkubasi 37°C dan waktu inkubasi selama 18-24 jam..

4.4.3 Variabel tergantung

Dalam penelitian ini, variabel tergantungnya adalah kadar hambat minimum (KHM) dan kadar bunuh minimum (KBM) yang diukur dari pertumbuhan *Malassezia furfur*.

4.5 Definisi Operasional

Tabel 4. 1 Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi Operasional	Cara Pengukuran	Indikator Penilaian	Skala
Variable Bebas					
1.	Ekstrak Biji mangga (<i>Mangifera indica. L</i>)	"Ekstrak Biji Mangga" dapat dihasilkan dengan mengeringkan biji mangga, menghaluskannya, dan merendamnya dalam larutan etanol 70%. Kemudian, filtratnya diambil menggunakan	Biji dapat 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)

penyaring dan diuapkan dalam rotary evaporator. Proses ini dilakukan di Laboratorium Materia Medica Batu.

Variable Terikat

1.	Kadar Hambat Minimum (KHM)	Konsentrasi terendah dari ekstrak mangga (<i>Mangifera indica L.</i>) yang memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan jamur <i>M. furfur</i> .	Digunakan metode pengamatan kualitatif dengan melihat garis hitam pada kontrol kuman atau metode pengamatan kuantitatif dengan menghitung rata-rata koloni jamur yang kurang dari 10% dari kontrol negatif pada media SDA.	Tingkat kekeruhan dan kejernihan berdasarkan pembanding yaitu Kontrol negatif. -Sangat Keruh (Garis hitam tidak dapat terlihat sama sekali): ++ -Keruh (Garis hitam terlihat namun samar): + -Jernih (Garis Hitam dapat terlihat dengan jelas): -	Kategorik (Ordinal)
2.	Kadar Bunuh Minimum (KBM)	Kadar terkecil dari ekstrak mangga (<i>Mangifera indica L.</i>) yang mampu membunuh jamur <i>M. furfur</i> .	Penghitungan dengan metode Colony Counter	Tidak terdeteksi pertumbuhan jamur <i>M. furfur</i> atau jumlahnya maksimal 0,1% dari kontrol, yang dihitung menggunakan alat <i>Colony Counter</i> .	Rasio

4.6 Instrumen dan Bahan Penelitian

Tabel 4.2 Alat dan Bahan Yang Akan Digunakan Untuk Membuat Ekstrak Biji Buah Mangga

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

Tabel 4.3 Alat dan Bahan Uji Efektifitas Kepekaan Ekstrak Biji buah mangga (*Mangifera indica. L*)

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

Tabel 4.4 Alat Dan Bahan Identifikasi Jamur *M. Furfur*

ALAT	BAHAN
<i>Objectglass</i>	Pewarna LPCB
Mikroskop	Minyak imersi
<i>Coverglass</i>	<i>Aquades</i>
Ose	Isolat jamur <i>M. furfur</i>
Vortex	NaCl

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Sterilisasi alat

1. Alat akan disterilisasi dengan mencuci menggunakan sabun kemudian akan di keringkan total.
2. Autoklaf akan dinyalakan untuk sterilisasi alat dengan settingan suhu 121°C dengan tekanan 15 atm selama 15 menit dimana peralatan kaca dibungkus oleh kertas terlebih dahulu.
3. Peralatan lainnya disterilkan menggunakan alkohol.

4.7.2 Pembuatan *medium sabouraud dextrose* (SDA)

1. Untuk membuat sediaan, tambahkan 40 gram bubuk Sabouraud Dextrose ke dalam 600 ml aquades
2. Setelah itu, campurkan Tween dengan minyak zaitun dan larutan Sabouraud Dextrose agar, kemudian sterilkan menggunakan autoklaf.
3. Sebanyak 20mL akan ditungkan ke dalam cawan petri yang telah disterilisasi.

4.7.3 Pembuatan medium *sabouraud dextrose broth* (SDB)

1. Siapkan 2 gram Sabouraud Dextrose Broth dan campurkan dengan 30 ml aquades hingga merata.
2. 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
3. Autoklaf dengan suhu 121°C akan digunakan setelah bahan tercampur merata untuk disterilisasi selama 15 menit.
4. Dituang dalam tabung reaksi dan ditunggu hingga dingin.

4.7.4 Pembuatan perbenihan cair

Untuk memperbarui jamur *M. furfur*, ambil satu ujung steril dari kultur jamur tersebut dan letakkan ke dalam tabung reaksi yang berisi larutan NaCl. Kemudian, gunakan alat pengocok (vortex) untuk mengaduk hingga campuran menjadi keruh, dengan tujuan mencapai kekeruhan yang setara dengan *McFarland I*: 108 CFU/ml. Selanjutnya, larutkan campuran sekitar 10 kali lipat untuk mendapatkan konsentrasi yang mendekati target, dan lanjutkan dengan melarutkannya kembali 10 kali lipat menggunakan larutan SDB yang telah disiapkan, hingga mencapai konsentrasi akhir sekitar 106 CFU/ml. Setelah itu, sterilisasi dilakukan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama sekitar 15 menit..

4.7.5 Pembuatan ekstak biji mangga (*Mangifera Indica L.*)

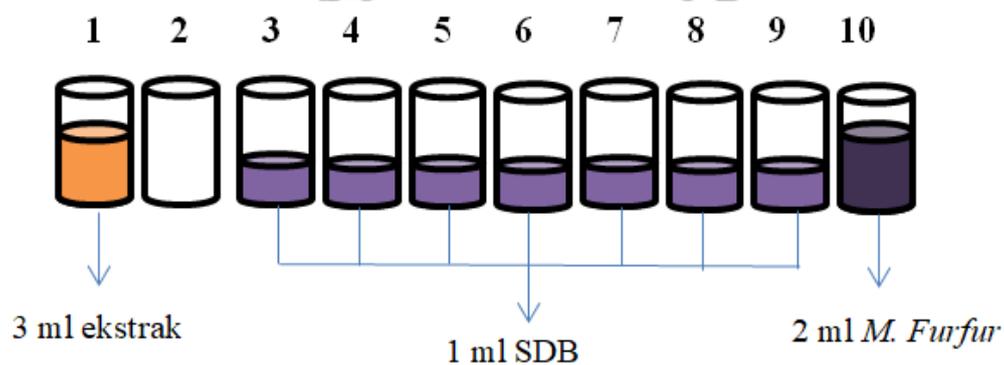
1. 500 gram biji buah mangga dicuci hingga bersih dan dikeringkan tanpa menggunakan sinar matahari.
2. Setelah benar-benar kering, biji buah mangga di-blender hingga menjadi serbuk.
3. Untuk ekstraksi serbuk buah mangga, digunakan cara maserasi dengan etanol 70%. Sebanyak 500 gram serbuk buah mangga diekstrakkan dengan 1500 ml etanol 70%, dan ekstrak yang sudah dibuat kemudian ditutup dan disimpan di ruangan yang tidak terkena cahaya.
4. Selanjutnya dikocok dengan shaker selama 24 jam dengan kecepatan 190-220 rpm.
5. Residu dimaserasi kembali dengan 1500 ml etanol 70%
6. Dilakukan pengambilan filtrate setiap hari selama kurang lebih 3 hari.
7. Setelah diekstrak, ekstrak kental dari biji buah mangga (*Mangifera Indica L.*) diuapkan menggunakan rotary evaporator dengan suhu sekitar 60°C sampai semuanya menguap dan tersisa hanya ekstrak yang kental.

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 biji buah mangga (*Mangifera indica L.*) diinokulasi menggunakan perbenihan cair jamur *M. furfur* dan diinkubasi dalam suhu 37°C selama kurang lebih 3 x 24 jam dengan menggunakan 10 macam konsentrasi.

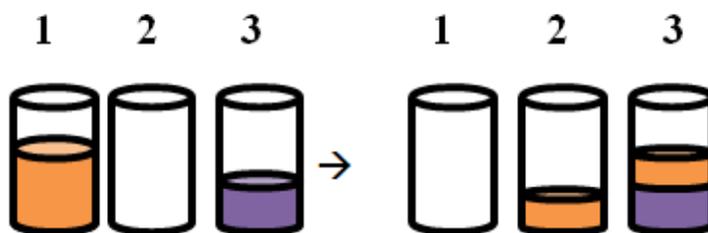
Hari ke 1 - 2

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 biji buah mangga dan pada tabung nomor 10 dimasukkan jamur *M. furfur* sebanyak 2 ml.



Gambar 4.1 Uji Efektivitas 10 tabung Hari 1 sampai 2

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

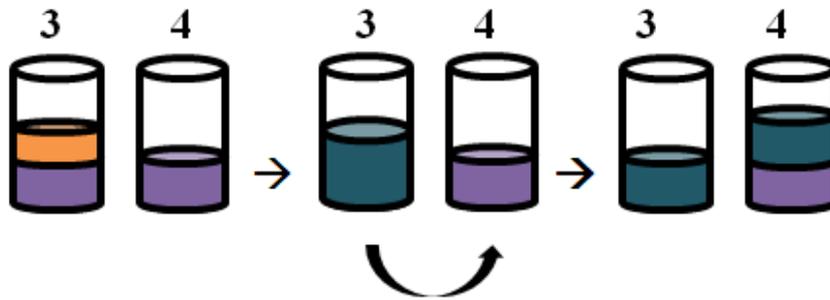


Gambar 4.2 Uji Efektivitas 1 ml Ekstrak Biji Mangga (*Mangifera indica L.*)

Konsentrasi ekstrak biji mangga (*Mangifera indica L.*):

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

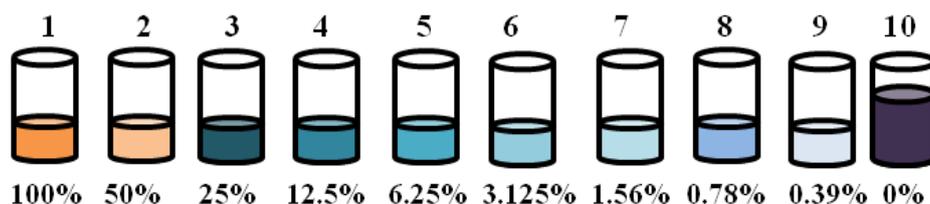
3. Larutan SDB dicampurkan hingga rata dengan ekstrak biji mangga (*Mangifera indica L.*) pada tabung 3, selanjutnya dilakukan pemindahan sebanyak 1 ml ke dalam tabung 4.



Gambar 4.3 Pencampuran Larutan SDB

Konsentrasi ekstrak biji mangga (*Mangifera indica L.*):

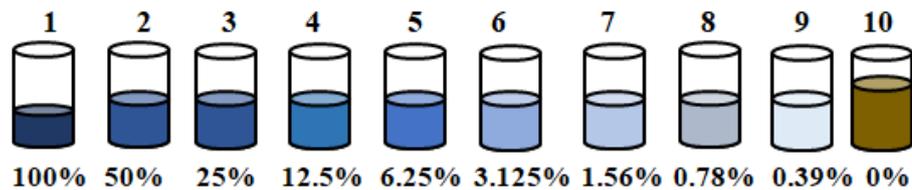
- 1) Tabung 3 → 1 ml sebesar 50%
- 2) Tabung 4 → 2 ml sebesar 25%
3. Hal yang sama dilakukan seperti Langkah-langkah diatas terhadap tabung 4 hingga tabung 9.
4. Larutan pada tabung 9 dibuang sebanyak 1 ml setelah tercampur rata.
5. Pengenceran telah dilakukan seperti di atas, maka diperoleh konsentrasi ekstrak daun mangga (*Mangifera indica L.*) dari setiap tabung yaitu:



Gambar 4.4 Hasil Pencampuran 1 mL pada setia suspensi

6. Larutan pada tabung 9 dibuang sebanyak 1 ml setelah tercampur rata

7. Kemudian isi tabung 2 hingga tabung 9 dengan masing – masing 1 ml suspensi cair jamur *M. Furfur*



Gambar 4.5 Hasil Pencampuran dengan suspensi *M. Furfur*

8. Inkubasikan tabung-tabung yang telah terisi ekstrak daun mangga (*Mangifera indica L.*) dan jamur *M. furfur* pada suhu 37°C selama 3x24 jam

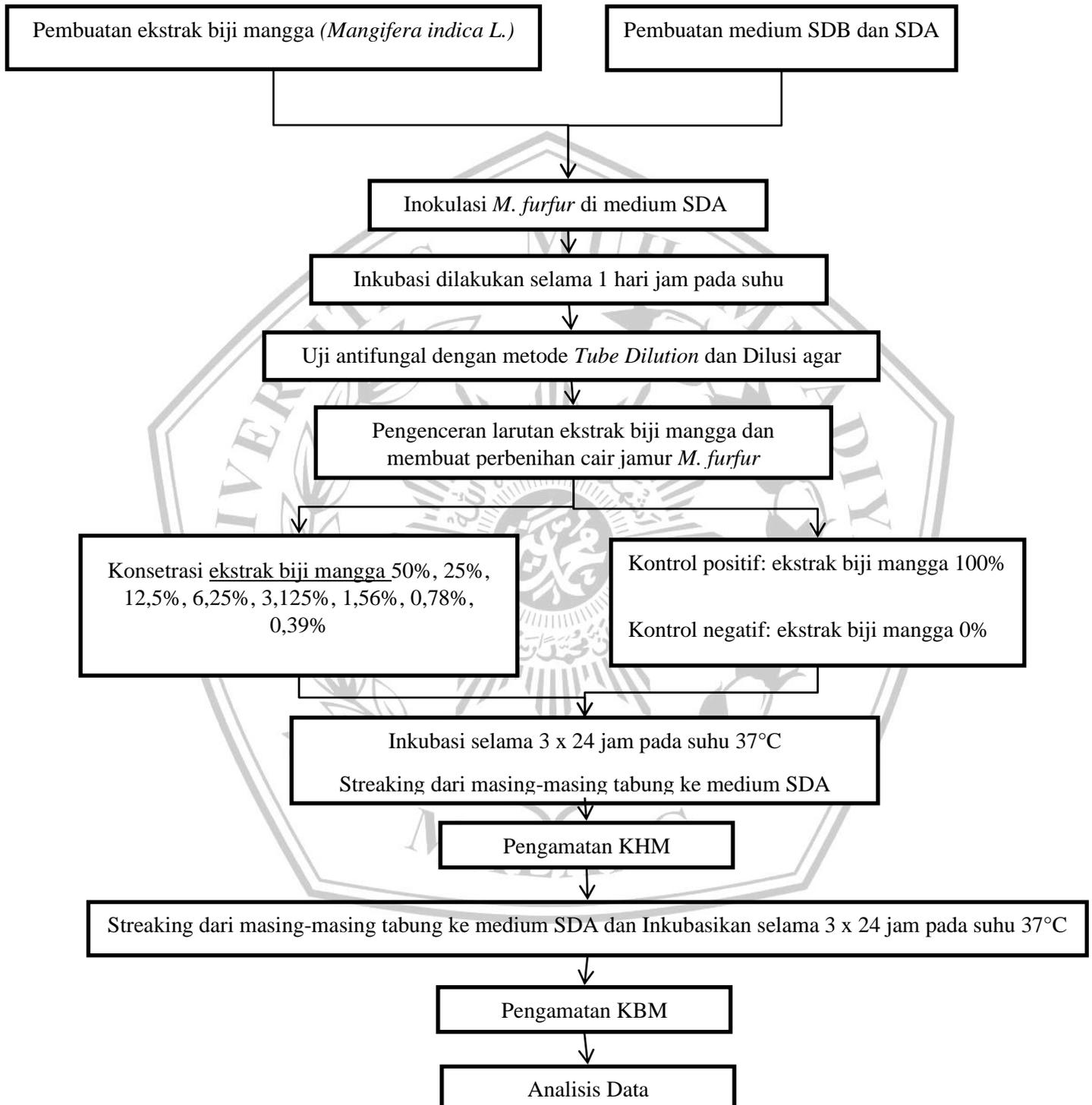
Hari ke 4

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 *M. furfur*. Pengamatan dilakukan setidaknya sebanyak 3 kali.

4.8 Alur Penelitian



4.9 Analisis Data

Data-data yang terkumpul dianalisis terlebih dahulu dengan menguji normalitas dan homogenitas. Jika data terdistribusi secara normal dan memiliki homogenitas, maka dilakukan analisis menggunakan uji *One-Way anova*.

a. Uji Normalitas

Untuk membuktikan data terdistribusikan dengan normal atau tidak normal dapat diujikan dengan uji normalitas. *Uji Shapiro-Wilk* digunakan untuk menguji sebaran data tersebut. Jika nilai p-value (sig) menunjukkan lebih tinggi 0,05 dapat diambil kesimpulan data terdistribusikan dengan normal. Namun, jika sebaran data tidak normal, langkah selanjutnya adalah melakukan transformasi data. Jika setelah dilakukan transformasi data, hasilnya menunjukkan bahwa data telah terdistribusi secara normal, maka dilanjutkan dengan uji *One-Way anova* dan uji *Post-Hoc Bonferroni*.

b. Uji Homogenitas

Uji homogenitas bertujuan untuk mengevaluasi kehomogenan atau perbedaan varian antara kelompok-kelompok dalam suatu data. Salah satu metode yang umum digunakan adalah uji *Levene*. Apabila hasil *uji Levene* menunjukkan bahwa nilai signifikansi (sig) lebih tinggi dari 0,05, maka dapat diambil kesimpulan data merupakan data yang homogen.

c. Uji *One Way Anova*

Data yang terdistribusi secara normal dan homogen, langkah selanjutnya adalah menggunakan uji *One-Way anova* dimana akan menunjukkan suatu

perbedaan signifikan antara variable kontrol dan varible bebas. Uji ini untuk menganalisis perbedaan rata-rata antara tiga kelompok atau lebih.

