

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1.1 Rancangan dan Jenis penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimental yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh Perasan Bunga pepaya (*Carica papaya* Linn) terhadap pertumbuhan *Malassezia furfur*. Sedangkan rancangan penelitian pada Gambar 3.1 adalah sebagai berikut :

Desain dan rancangan penelitian *Posttest Only Control Group Desing* adalah sebagai berikut:

Random	Perlakuan	Post test
P (0)	-	O (0)
P (1)	X	O (1)
P (2)	X	O (2)
P (3)	X	O (3)
P (4)	X	O (4)
P (5)	X	O (5)

Gambar 3.1 Rancangan Penelitian (Notoatmojo, 2012).

Keterangan:

R :random

P(0) : tidak diberi perasan bunga pepaya atau kontrol negatif

P1 : perlakuan konsentrasi perasan bunga pepaya 12,5%

P2 : perlakuan konsentrasi perasan bunga pepaya 25%

P3 : perlakuan konsentrasi perasan bunga pepaya 50%

P4 : perlakuan konsentrasi perasan bunga pepaya 100%

- O1 : observasi setelah perlakuan konsentrasi 12,5%
- O2 : observasi setelah perlakuan konsentrasi 25%
- O3 : observasi setelah perlakuan konsentrasi 50%
- O4 : observasi setelah perlakuan konsentrasi 100%

3.2 Populasi dan Sampel Penelitian

3.2.1 Populasi penelitian

Populasi dalam penelitian ini adalah *Malassezia furfur* di dalam media pertumbuhan. *Malassezia furfur* yang ditumbuhkan berasal dari biakan murni yang didapatkan dari Rumah Sakit Umum Daerah (RSUD) Dr. Soetomo.

3.2.2 Sampel penelitian

Sampel yang diperiksa adalah *Malassezia furfur* di dalam media pertumbuhan. *Malassezia furfur* yang ditumbuhkan berasal dari biakan murni yang didapatkan dari RSUD Dr. Soetomo.

Dalam penelitian ini, untuk setiap perlakuan dilakukan masing-masing sebanyak 5 kali pengulangan yang diperoleh berdasarkan rumus Zainnudin (2003), hasil replikasi sebagai berikut :

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

$$(5 - 1) (r - 1) \geq 15$$

$$4(r - 1) \geq 15$$

$$4r - 4 \geq 15$$

$$4r = 15 + 4$$

$$r = 4,75 \approx 5$$

keterangan :

r :Replikasi atau pengulangan

t :Perlakuan

sehingga seluruhnya terdapat 5 pengulangan x 5 perlakuan = 25 unit percobaan.

3.3 Lokasi dan waktu penelitian

3.3.1 Lokasi

Lokasi pemeriksaan sampel dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Prodi D3 Analis Kesehatan Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Surabaya.

3.3.2 Waktu penelitian

Waktu penelitian dilakukan pada bulan Desember 2016 sampai dengan bulan Juli 2017. Sedangkan waktu pemeriksaan dilakukan pada bulan April 2017.

3.4 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

3.4.1 Variabel Penelitian

Dalam penelitian ini, variable penelitian terdiri dari :

1. Variabel bebas: Kosentrasi Perasan Bunga Papaya (*Carica papaya* Linn)
2. Variabel terikat: Pertumbuhan *Malassezia furfur*
3. Variabel kontrol : Sterilisasi, inkubasi, volume suspensi jamur, volume media, volume perasan Bunga Pepaya.

3.4.2 Definisi Operasional

Definisi operasional variable penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Pemberian perasan bunga pepaya (*Carica papaya* Linn) dalam penelitian ini dikategorikan menjadi : 100%, 50%, 25%, 12,5%, dan 0%
2. *Malassezia furfur* yang digunakan pada penelitian ini adalah suspensi *Malassezia furfur* yang sudah dihitung menggunakan haemocytometer
3. Penanaman dilakukan dengan metode difusi sumuran
4. Media *Saboroud Dextrose Agar* (SDA) di swab dengan jamur *Malassezia furfur*
5. Pertumbuhan *Malassezia furfur* dalam penelitian ini berupa hasil observasi yang menunjukkan daya hambat *Malassezia furfur* yang menunjukkan zona terang pada media pertumbuhan.

3.5 Metode Pengumpulan Data

Data tentang pertumbuhan jamur *Malassezia furfur* diperoleh dari hasil uji laboratorium pada sampel yang telah diberi perlakuan dengan berbagai konsentrasi perasan Perasan Bunga pepaya (*Carica papaya* Linn) dengan langkah-langkah sebagai berikut :

3.5.1 Persiapan pemeriksaan

3.5.1.1 Cara Sterilisasi alat dan bahan

1. Bagian dasar Autoklaf diisi dengan *Aquadest* (ingat jangan air biasa), hingga batas tertentu

2. Ditutup sekat yang berlubang-lubang antara bagian dasar dan bagian atas Autoklaf
3. Dimasukkan alat dan bahan-bahan yang akan disterilkan
4. Ditutup Autoklaf dengan seksama dan serapih mungkin, dengan cara berlawanan
5. Dibuka katup udara agar uap air dapat mengusir udara yang ada dalam Autoklaf pada saat pemanasan
6. Apabila suhu telah mencapai 10°C tutuplah katup udara untuk meningkatkan tekanan uap di dalam Autoklaf
7. Perhatikan kenaikan suhu atau tekanan uap apabila telah mencapai 121°C atau tekanan atm. Sterilisasi dipertahankan 15 menit setelah suhu atau tekanan uap mencapai batas tertentu
8. Dibuka katup Autoklaf dengan cara buka-tutup hingga tekanan uap turun
9. Dibuka tutup Autoklaf dengan hati-hati
10. Mengeluarkan alat dan bahan-bahan yang telah disterilisasi (Novel dkk, 2010).

3.5.1.2 Pembuatan Media *Saboroud Dextrose Agar* (SDA)

3.5.1.2.1 Alat:

Alat yang digunakan untuk membuat SDA antara lain: gelas Arloji, Erlenmeyer 500 ml, Batang pengaduk, Pipet ukur 1 ml, Neraca Analitik, Hot plate, Petri disk, Gelas ukur 500 ml, Ph media, Pipet tetes.

3.5.1.2.2 Bahan :

Bahan yang digunakan untuk membuat SDA antara lain: media *Saboroud Dextrose Agar* (SDA) yang terdiri dari : Pepton 10 gram, glukosa 40 gram, bacto agar 18 gram, *aquadest* 1000 ml, Chloramphenicol (Soewarsono, 1996).

3.5.1.2.3 Prosedur :

1. Ditimbang semua bahan dan memasukkan kedalam Erlenmeyer
2. Dilarutkan bahan-bahan tersebut dengan 1000 ml *Aquadest* kedalam Erlenmeyer
3. Dipanaskan sampai larut sempurna (mendidihkan kira-kira 1 sampai 3 menit)
4. Ditutup Erlenmeyer dengan kapas berlemak yang diselimuti dengan kain kasa, dan bungkus mulut Erlenmeyer dengan kertas Koran dan ikat dengan tali
5. Disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit
6. Setelah selesai disterilisasi tambahkan dengan larutan chloramphenicol 2 ml secara steril kedalam larutan media tadi (larutan Chloramphenicol steril : 250 mg chloramphenicol ditambah 10 ml PZ steril). Dilakukan penambahan larutan chloramphenicol pada saat media dalam keadaan suhu 80°C
7. Setelah itu dituangkan media pada cawan petri steril. Melakukan semua tahapan diatas secara steril (Soewarsono, 1996).

3.5.1.3 Pembuatan Perasan Bunga pepaya (*Carica papaya* Linn)

3.5.1.3.1 Alat :

Alat yang digunakan untuk pembuatan perasan bunga pepaya antara lain: Neraca analitik, mortar, beaker glass, pengaduk (spatula), gelas ukur 10ml, pipet Pasteur, corong, botol.

3.5.1.3.2 Bahan :

Bahan yang digunakan untuk pembuatan perasan bunga pepaya antara lain: Bunga pepaya sebanyak 10 gram, dan *Aquadest*.

3.5.1.3.3 Prosedur :

1. Pertama ditimbangbungapepayasebanyak 10 gram, menimbang 10 gram inididapatdarirumus

$$\% = \text{gram}/\text{volume} \times 100\%$$

$$100\% = \text{gram}/10\text{ml} \times 100\%$$

$$\text{Gram} = 10 \text{ gram}$$
2. Bunga papaya dihaluskan dengan mortar
3. Dipindahkan Bunga pepaya yang sudah halus kekain kasa untuk dilakukan pemerasan
4. Ditampung air perasan di beaker glass.
5. Dengan menggunakan pipet Pasteur ditambah *Aquadest* sampai volume tepat 10 ml

6. Dipindahkan perasan Bunga pepaya yang sudah siap kebotol dan beri label (etiket).

Cara Pembuatan Konsentrasi :

- a. Pipet sebanyak 5 ml dari konsentrasi 100% + larutkan dengan *Aquadest* steril sebanyak 10 ml.
- b. Pipet sebanyak 2,5 ml dari konsentrasi 100% + larutkan dengan *Aquadest* steril sebanyak 10 ml.
- c. Pipet sebanyak 1,25 ml dari konsentrasi 100% + larutkan dengan *Aquadest* steril sebanyak 10 ml (Pebriani, 2015).

3.5.1.4 Mengitung dan Mengukur Jumlah Spora

3.5.1.4.1 Alat :

Alat yang digunakan untuk menghitung dan mengukur jumlah spora antara lain: Haemocytometer, cover glass, pipet tetes, mikroskop, ose jarum

1.5.1.4.2 Bahan:

Bahan yang digunakan untuk menghitung dan mengukur jumlah spora antara lain: Biakan *Malassezia furfur*

1.5.1.4.3 Prosedur :

1. Sel dipanen dari biakan dengan cara menuang 5 ml *aquadest* kedalam cawan biakan sambil digosokan batang gelas bentuk L kemudian suspense sel dipipet dan dimasukkan dalam gelas Erlenmeyer 50 ml. pemanenan diulangi lagi sampai mendapatkan 20 ml suspense atau sampai sesuai yang dibutuhkan
2. Haemocytometer dibersihkan dengan menggunakan alcohol sampai benar-benar bersih, kemudian dikeringkan

3. Suspensi spora dikocok kemudian dipipet dan diteteskan pada haemocytometer tepat pada ruang hitungnya
4. Tetesan suspense ditutup menggunakan gelas penutup
5. Preparat diamati menggunakan mikroskop dan dihitung jumlah sel dalam setiap kotak (Putri, 2013).

$$\text{Rumus: } S = \frac{x}{L(\text{mm}^2) \times t(\text{mm}) \times d} \times 10^3$$

Keterangan: S = jumlah spora/ml

x = jumlah spora yang dihitung

L = luas kotak hitung (0,04 x 5 = 0,2 mm²)

t = kedalaman bidang hitung (0,1 mm)

d = factor pengenceran

10³ = volume suspensi yang dihitung (1 ml = 10³ mm³)

3.5.1.5 Penanaman Suspensi jamur pada media Saboroud Dextrose Agar (SDA)

3.5.1.5.1 Alat :

Alat yang digunakan untuk pembuatan suspensi jamur pada media SDA antara lain: Swab steril, Bunsen spirtus.

3.5.1.5.2 Bahan :

Bahan yang digunakan untuk pembuatan suspensi jamur pada media SDA antara lain: Suspensi Jamur, Perasan bunga pepaya

3.5.1.5.3 Prosedur :

1. Diambil suspensi kuman dengan menggunakan swab steril, kemudian tanam di atas permukaan media SDA dengan cara digoreskan secara perlahan dan merata ke semua permukaan media, inkubasi selama 15 menit
2. Dibuat sumuran pada media SDA dengan diameter 6 mm
3. Diambil 40 µl perasan bunga pepaya dengan setiap konsentrasi dan dimasukkan di setiap lubang sumuran. Dan letakkan 40 µl *Aquadest* steril di satu lubang sumuran untuk kontrol negatif
4. Dinkubasi selama 5 x 24 jam pada suhu 37⁰C
5. Diamati zona terang jamur *Malassezia furfur* pada media SDA (Dwiyanti dkk., 2015).

3.5.2 Tabulasi data

Data diperoleh dari pertumbuhan jamur *Malassezia furfur* yang tumbuh pada media *Sabouroud Dextrose Agar* (SDA) yang telah diinkubasi selama 5x24 jam setelah diberi perlakuan dengan perasan bunga pepaya, yang kemudian hasil perolehan data, ditabulasikan kedalam Tabel 3.1 sebagai berikut :

Tabel 3.1 Contoh Tabulasi Data Hasil Pemeriksaan Pengaruh Perasan Bunga pepaya (*Carica papaya* Linn) terhadap pertumbuhan *Malassezia furfur*.

Konsentrasi perasan bunga pepaya	Diameter zona hambat pertumbuhan <i>Malassezia furfur</i> pengulangan ke- (mm)					Rata-rata (mm)
	1	2	3	4	5	
100%						
50%						
25%						
12,5%						
Kontrol (-) Aquadest						

3.6 Analisis Data

Data yang diperoleh dari uji laboratorium kemudian ditabulasi selanjutnya data diuji dengan menggunakan uji Kruskal Wallis dengan tingkat kesalahan 5% (0.05).