

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah eksperimental dengan tujuan Untuk mengetahui Apakah ekstrak daun durian (*Durio zibethinus*) dapat menghambat pertumbuhan jamur *Malassezia furfur*". Untuk desain penelitiannya yaitu sebagai berikut :

Tabel 3.1 Rancangan Penelitian

Sampel	Kelompok	Perlakuan	Post test
Random	Kontrol	P1	O1
	Eksperimen 1	P2	O2
	Eksperimen 2	P3	O3

(Sumber : Notoatmodjo, 2012).

Keterangan :

R : Random

P1 : Perlakuan tanpa pemberian ekstrak daun durian (*Durio zibethinus*) konsentrasi 0%.

P2 : Perlakuan pemberian ekstrak daun durian (*Durio zibethinus*) konsentrasi 50%.

P3 : Perlakuan pemberian ekstrak daun durian (*Durio zibethinus*) konsentrasi 100%.

- O1 : Observasi pertumbuhan *Malassezia furfur* tanpa pemberian ekstrak daun durian (*Durio zibethinus*) dengan konsentrasi 0%.
- O2 : Observasi pertumbuhan *Malassezia furfur* setelah pemberian ekstrak daun durian (*Durio zibethinus*) dengan konsentrasi 50%.
- O3 : Observasi pertumbuhan *Malassezia furfur* setelah pemberian ekstrak daun durian (*Durio zibethinus*) dengan konsentrasi 100%.

3.2 Populasi dan Sampel Penelitian

3.2.1 Populasi penelitian

Populasi dalam penelitian ini adalah dari biakan murni jamur *Malassezia furfur* yang tumbuh pada media *Saboroud Dextrose Agar* (SDA) yang didapat dari Divisi Unit Rawat Jalan (URJ) Penyakit Kulit dan Kelamin RSUD Dr. Soetomo Surabaya.

3.2.2 Sampel penelitian

Sampel penelitian yang diperiksa adalah koloni dari biakan murni *Malassezia furfur* yang diisolasi pada media *Saboroud Dextrose Agar* (SDA).

Dalam penelitian ini, untuk setiap perlakuan dilakukan masing-masing sebanyak 9 kali pengulangan yang diperoleh berdasarkan rumus (Notoatmodjo, 2012) hasil replikasi sebagai berikut :

$$\begin{aligned} (r-1)(t-1) &\geq 15 \\ (r-1)(3-1) &\geq 15 \\ (r-1)2 &\geq 15 \\ 2r-2 &\geq 15 \\ 2r &\geq 15+2 \\ 2r &\geq 17 \\ r &\geq 17/2 \\ 8,5 &\geq 9 \end{aligned}$$

Keterangan :

r : Jumlah replikasi atau pengulangan

t : Banyak kelompok perlakuan

Dari rumus diatas digunakan 9 replikasi setiap kelompok. Penempatan perlakuan dilakukan secara random dengan menggunakan 9 plate sebagai wadah media pertumbuhan. Setiap plate berisi 3 perlakuan. Setiap plate berisi 0,2 ml suspensi jamur yang setara dengan standar Mac Farland $1,5 \times 10^8$ CFU/ml. Jadi dari keseluruhan jumlah koloni yang digunakan dalam penelitian ini sebanyak $9 \times 0,2 \times 1,5 \times 10^8 = 2,7 \times 10^8 / 270.000.000$ koloni.

3.3 Lokasi dan Waktu penelitian

3.3.1 Lokasi penelitian

Lokasi pemeriksaan sampel dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Prodi D3 Analis Kesehatan Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Surabaya Jl. Sutorejo nomor 59 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 Devinisi Operasional Variabel

3.4.1 Variabel penelitian

Dalam penelitian ini, variabel penelitian terdiri dari :

1. Variabel bebas : Pemberian ekstrak daun buah durian (*Durio zibethinus*).

2. Variabel terikat : Pertumbuhan *Malassezia furfur*.
3. Variabel kontrol : Suhu, pH, lama inkubasi, volume suspensi.

3.4.2 Devinisi Operasional Variabel

1. Pemberian ekstrak daun durian dalam penelitian ini dikategorikan menjadi 0%, 50% dan 100%.
2. Zona hambat dalam pertumbuhan jamur *Malassezia furfur* adalah zona bening yang terbentuk dari masing-masing ekstrak yang terdifusi pada sumuran paper disk pada media *Saboroud Dextrose Agar* (SDA) yang sudah diinokulasi dengan jamur *Malassezia furfur*. Dalam penelitian ini zona hambat ditetapkan sebagai angka (dalam skala rasio) yang menunjukkan diameter dari zona bening (mm).

3.5 Metode Pengumpulan Data

Data pertumbuhan *Malassezia furfur* dikumpulkan dengan cara observasi atau pengamatan melalui pengujian laboratorium, yaitu dengan mengamati pertumbuhan jamur pada variasi konsentrasi ekstrak daun durian (*Durio zibethinus*) dengan menggunakan metode difusi cakram kertas, langkah-langkah pemeriksaannya sebagai berikut :

3.5.1 Persiapan Pemeriksaan

3.5.1.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

Dalam tahap ini dilakukan sterilisasi kering dan basah. Sterilisasi kering bertujuan untuk mensterilisasi alat-alat yang digunakan dalam pemeriksaan.

Sedangkan sterilisasi basah bertujuan untuk mensterilisasi bahan untuk pemeriksaan.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah autoclave, oven, pipet ukur 1 ml dan 10 ml, erlenmeyer 250 ml, petridisk, pinset, tabung reaksi, tabung venoject, erlenmeyer .

Bahan yang digunakan adalah aquades, pz, kertas Whatman yang sudah dilingkari.

Prosedur kerja :

A. Sterilisasi kering

1. Menyiapkan semua alat yang akan di sterilkan, yaitu pipet ukur 1 ml dan 10 ml, erlenmeyer 250 ml, petridisk, pinset, tabung reaksi, tabung venoject, erlenmeyer.
2. Membungkus satu per satu alat yang akan di steril dengan menggunakan kertas aluminium foil.
3. Memasukan semua alat ke dalam oven dengan mengatur suhu 161°C selama 60 menit (1 jam).
4. Menunggu oven hingga berbunyi “ting”.
5. Alat steril siap digunakan.

B. Sterilisasi basah

Alat yang digunakan adalah autoclave.

Bahan yang digunakan adalah aquadest, pz, kertas Whatman yang sudah dilingkari.

Prosedur kerja :

1. Mengisi bagian dasar autoklaf dengan aquadest hingga batas tertentu.
2. Menutup sekat yang berlubang-lubang antara bagian dasar dan bagian atas autoklaf.
3. Memasukan bahan-bahan yang akan disterilkan.
4. Menutup autoklaf dengan seksama dan serapih mungkin, dengan cara berlawanan.
5. Membuka 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 dengan tekanan 1,1 kg/ cm₂. Sterilisasi dipertahankan 15 menit setelah suhu atau tekanan uap mencapai batas tertentu.
8. Membuka katup atau autoklaf dengan cara buka-tutup hingga tekanan uap tertentu.
9. Membuka tutup autoklaf dengan hati-hati, kemudian mengeluarkan bahan-bahan yang telah disterilisasi.

3.5.1.2 Pembuatan Media *Saboroud Dextrose Agar* (SDA)

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah Neraca triple beam, sendok plastik, gelas arloji, erlenmeyer 250 ml, batang pengaduk, pipet ukur 10 ml, hot plate, petridisk (plate), gelas ukur 250 ml, pH media dan pipet tetes.

Bahan yang digunakan adalah aquadest, media *Saboroud Dextrose Agar* (SDA), Chlorampenicol 250 mg.

Prosedur kerja :

1. Menimbang media *Saboroud Dextrose Agar* (SDA) dan memasukkan ke dalam erlenmeyer.
2. Melarutkan bahan-bahan tersebut dengan 600 ml aquadest ke dalam erlenmeyer.
3. Memanaskan sampai larut sempurna (mendidihkan kira-kira 1 sampai 3 menit).
4. Suam-suam kuku (40°C), melakukan pH media (5,5 – 7,8).
5. Menutup erlenmeyer dengan kapas berlemak yang diselimuti dengan kain kasa, dan bungkus mulut erlenmeyer dengan aluminium foil dan ikat dengan tali.
6. Sterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121° C selama 15 menit.
7. Menambahkan dengan larutan chlorampenicol 2 ml dan secara steril ke dalam larutan media tadi (larutan Chlorampenicol steril : 250 mg chlorampenicol ditambah 10 ml PZ steril). Melakukan penambahan larutan chlorampenicol ke dalam media sebelum memadat. Dan menambahkan 2 ml olive oil dan homogenkan. Setelah itu menuangkan media pada cawan petri steril. Melakukan semua tahapan di atas secara steril.

3.5.1.3 Pembuatan Standart *Mc Farland* 0,5

Alat yang digunakan adalah tabung reaksi, pipet ukur 1 ml dan 10 ml, filler.

Bahan yang digunakan adalah Barium klorida (BaCl_2) 1% dan Asam sulfat (H_2SO_4) 1%.

Prosedur kerja

1. Menyiapkan tabung reaksi yang bersih dan kering
2. Memipet dan memasukan 0,05 ml Barium klorida (BaCl_2) 1% kedalam tabung reaksi tersebut.
3. Menambahkan 9,95 ml Asam sulfat (H_2SO_4) 1% kedalam tabung yang telah berisi 0,05 ml Barium klorida (BaCl_2) 1%.
4. Mencampur kedua larutan dalam tabung tersebut sehingga didapatkan standard *Mc Farland* 0,05 dan setara dengan jumlah spora jamur $1,5 \times 10^8$ CFU/ml.

3.5.1.4 Pembuatan Ekstrak Daun Durian (*Durio zibethinus*)**A. Pemilihan dan Proses Pengeringan Daun Durian (*Durio zibethinus*)**

Alat yang digunakan adalah Oven, loyang besi

Bahan yang digunakan adalah Daun durian

Prosedur kerja :

1. Mengambil daun durian (*Durio zibethinus*) dengan spesifikasi yang berasal dari satu pohon, berwarna hijau dan kuning kemerahan.
2. Mencuci daun durian (*Durio zibethinus*) dengan air mengalir.
3. Menyiapkan daun durian yang sudah bersih
4. Memasukan daun ke dalam oven dengan alas loyang besi.
5. Mengatur oven dengan suhu 50°C selama 60 menit. Tiap 1 jam dilihat supaya tidak gosong.
6. Mengeluarkan daun yang sudah kering dari oven, daun siap digunakan.

B. Proses Pembuatan Serbuk Daun Durian (*Durio zibethinus*)

Alat yang digunakan adalah Blender, gunting, saringan, wadah bersih dan kering, sendok.

Bahan yang digunakan adalah Daun durian yang sudah kering.

Prosedur kerja :

1. Menyiapkan alat dan bahan yang akan digunakan.
2. Memotong kecil-kecil daun yang sudah kering.
3. Menghaluskan daun yang kering dengan menggunakan blender
4. Menuang daun yang sudah di haluskan ke dalam saringan untuk mendapatkan serbuk daun yang halus.
5. Serbuk daun durian (*Durio zibethinus*) siap digunakan.

C. Ekstraksi daun durian (*Durio zibethinus*) Dengan Metode Soxhletasi

Alat yang digunakan adalah Labu ekstraksi, soxhlet, statif, pemanas air, hotplate, selang plastik, kondensor, termometer.

Bahan yang digunakan adalah serbuk daun durian (*Durio zibethinus*), etanol 96%.

Prosedur kerja :

1. Menyiapkan alat dan bahan yang akan digunakan.
2. Menyiapkan alat ekstraksi soxhlet.
3. Menimbang 100 gram serbuk halus daun durian (*Durio zibethinus*).
4. Membungkus bahan ekstraksi dengan kertas saring dan memasukkannya ke dalam soxhlet.
5. Memasukkan 400 ml etanol 96% ke dalam labu ekstraksi.

6. Memanaskan pelarut menggunakan waterbath dengan suhu 70 – 80°C. Pemanasan pelarut di bawah titik didih bertujuan agar senyawa fitokimia yang terkandung dalam daun durian (*Durio zibethinus*) tidak rusak
7. Memperhatikan siklus ekstraksi, ekstraksi .berakhir setelah siklus pelarut menjadi jernih yang berarti semua senyawa fitokimia yang terkandung dalam daun durian (*Durio zibethinus*) sudah terekstrak secara keseluruhan.
8. Ekstrak daun durian (*Durio zibethinus*) yang didapat 375ml, siap di destilasi.

D. Pembuatan Ekstrak Kental Daun Durian (*Durio zibethinus*) Dengan Metode Destilasi

Alat yang digunakan adalah Labu destilasi, kondensor, waterbath, selang, statif, klem, karet penutup, erlenmeyer, gelas kimia, termometer, corong.

Bahan yang digunakan adalah Ekstrak etanol daun durian (*Durio zibethinus*).

Prosedur kerja :

1. Menyiapkan alat dan bahan yang akan digunakan.
2. Menyiapkan rangkaian alat destilasi.
3. Memasukkan hasil ekstraksi daun durian (*Durio zibethinus*) ke dalam labu destilasi.
4. Melakukan proses destilasi, pemanasan dilakukan di bawah titik didih pelarut yaitu 78°C untuk mencegah senyawa fitokimia rusak.
5. Melakukan proses destilasi sampai tidak ada destilat yang keluar dari kondensor.

E. Pembuatan Konsentrasi Ekstrak Daun Durian (*Durio zibethinus*)

Alat yang digunakan adalah Pipet pasteur, filler, gelas kimia, gelas ukur.

Bahan yang digunakan adalah Ekstraksi etanol daun durian (*Durio zibethinus*), aquadest.

Prosedur kerja :

1. Konsentrasi ekstrak daun durian (*Durio zibethinus*) 0%. Memipet 10 ml aquadest tanpa diberi ekstrak daun durian (*Durio zibethinus*).
2. Konsentrasi ekstrak daun durian (*Durio zibethinus*) 50 %. Memipet 5 ml ekstrak daun durian (*Durio zibethinus*) 100%, lalu menambahkan aquadest sebanyak 5 ml, kemudian mengocoknya sampai homogen.
3. Konsentrasi ekstrak daun durian (*Durio zibethinus*) 100%. Memipet 10 ml ekstrak daun durian (*Durio zibethinus*) tanpa pemberian aquadest.

F. Pembuatan Suspensi Jamur *Malassezia furfur*

Alat yang digunakan adalah ose bulat, tabung reaksi beserta tutup ulir, pipet ukur 1 ml dan 10 ml, filler.

Bahan yang digunakan adalah biakan murni jamur *Malassezia furfur*, pz steril.

Prosedur kerja :

1. Mengambil satu mata ose jamur *Malassezia furfur* yang diambil dari biakan murni media *Saboroud Dextrose Agar* (SDA) dengan penambahan olive oil.
2. Kemudian memasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi larutan PZ (NaCl 0,85%) steril 10 ml, setelah itu di homogenkan.

3. Dibandingkan dengan standard *Mc Farland* 0,5. Jika didapatkan kekeruhan suspensi jamur *Malassezia furfur* melebihi standart Mac Farland 0,5 maka tambahkan PZ (NaCl 0,85%) steril, dan apabila kekeruhan yang diperoleh masih kurang dari standart Mac Farland 0,5 maka tambahkan dengan biakan murni jamur *Malassezia furfur*.
4. lakukanlah hal tersebut sampai didapatkan suspensi jamur *Malassezia furfur* yang sesuai dengan standart Mac Farland 0,5. Maka jumlah koloni yang didapat $1,5 \cdot 10^8$ CFU/ml.
5. Suspensi jamur *Malassezia furfur* siap digunakan.

G. Pembuatan Cakram Kertas Ekstrak Daun Durian (*Durio zibethinus*)

Alat yang digunakan adalah Plong-plongan, tabung venoject steril, pinset steril

Bahan yang digunakan adalah Kertas Whatman, ekstrak daun durian (*Durio zibethinus*), aquadest steril.

Prosedur kerja :

1. Menyiapkan kertas Whatman.
2. Memotong kertas dengan menggunakan alat plong-plongan dengan lubang diameter 6 mm.
3. Meletakkan kertas saring tersebut ke dalam petridisk dan di steril menggunakan oven dengan suhu 161°C selama 60 menit.
4. Menyiapkan tabung venoject dan mengisinya dengan cakram kertas steril dan menambahkan larutan ekstrak 0,2 ml.
5. Melakukan hal tersebut hingga semua tabung terisi.

6. Kemudian menunggu ± 2 jam hingga larutan ekstrak terserap oleh cakram kertas.
7. Cakram kertas siap digunakan.

H. Perlakuan Cakram Kertas Ekstrak Daun Durian (*Durio zibethinus*)

Alat yang digunakan adalah Yellow tip steril, batang pengaduk “L”, pinset steril.

Bahan yang digunakan adalah Suspensi jamur *Malassezia furfur*, media *Saboroud Dextrose Agar* (SDA), spirtus, Cakram kertas ekstrak daun durian (*Durio zibethinus*).

Prosedur kerja :

1. Mengambil 0,2 mikron suspensi jamur *Malassezia furfur* dengan menggunakan pipet mikron, penanaman menggunakan api spirtus, lalu menggesekkan dengan batang pengaduk “L” pada permukaan media *Saboroud Dextrose Agar* (SDA) dan menambahkan olive oil.
2. Membagi setiap petridisk yang berisi media menjadi 3 bagian dengan cara memberi tanda garis dengan spidol.
3. Meletakkan cakram kertas yang telah direndam ekstrak daun durian (*Durio zibethinus*) dengan konsentrasi 0%, 50%, 100% menggunakan pinset steril letakan pada media *Saboroud Dextrose Agar* (SDA) dengan cara sedikit di tekan supaya melekat.
4. Posisi peletakan konsentrasi cakram kertas searah dengan jarum jam. Satu petridisk diisi 3 konsentrasi 0%, 50%, 100%.
5. Melakukan hal tersebut pada replikasi.
6. Dinkubasi selama 5 x 24 jam pada suhu 37⁰C.

I. Pengukuran Zona Hambat Jamur *Malassezia furfur*

Alat yang digunakan adalah penggaris ukuran cm, buku, bulpoin.

Bahan yang digunakan adalah Media *Saboroud Dextrose Agar* (SDA) yang sudah ditumbuhi jamur *Malassezia furfur*.

Prosedur kerja :

1. Mengeluarkan media yang sudah diberi perlakuan dari suhu ruang.
2. Mengukur zona hambat dari kanan ke kiri kemudian dari atas ke bawah lalu dibagi 2, melakukan tiap masing-masing paper disk dengan penggaris ukuran cm.
3. Mencatat hasil pada buku.
4. Melakukan hal tersebut pada replikasi.

3.6 Tabulasi Data

Data hasil pengamatan zona hambat pada jamur *Malassezia furfur* adalah sebagai berikut:

Tabel 3.2 Contoh Tabulasi Data Hasil Pemeriksaan Daya Hambat Ekstrak Daun Durian (*Durio zibethinus*) Terhadap Pertumbuhan Jamur *Malassezia furfur*

Replikasi	Konsentrasi daun durian (<i>Durio zibethinus</i>)		
	0 %	50 %	100 %
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
Jumlah			
Rata-rata			
SD			

3.7 Metode Analisis Data

Untuk mengetahui daya hambat ekstrak daun durian (*Durio zibethinus*) terhadap pertumbuhan jamur *Malassezia furfur* pada konsentrasi 0 %, 50 % dan 100 % maka data menggunakan One-Way ANOVA dengan tingkat kesalahan 5% atau $\alpha = 0,05$ dalam skala rasio.