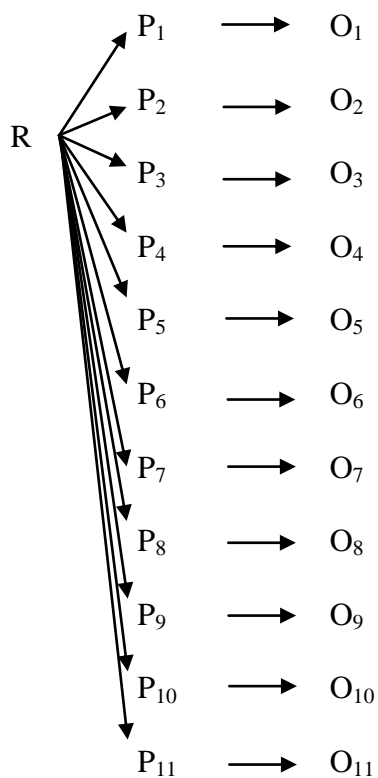


BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimental yang bertujuan untuk mengetahui daya hambat lendir lidah buaya (*Aloe vera Linn*) terhadap pertumbuhan jamur *Malassezia furfur* secara *In-vitro*. Sedangkan design penelitiannya adalah sebagai berikut :



Gambar 3.1 Design atau Rancangan Penelitian (Riwidikdo, 2008)

Keterangan :

R : Random

P₁ : Perlakuan pemberian konsentrasi lendir lidah buaya (*Aloe vera Linn*) 100%.

P₂ : Perlakuan pemberian konsentrasi lendir lidah buaya (*Aloe vera Linn*) 90%.

P₃ : Perlakuan pemberian konsentrasi lendir lidah buaya (*Aloe vera Linn*) 80%.

P₄ : Perlakuan pemberian konsentrasi lendir lidah buaya (*Aloe vera Linn*) 70%.

P₅ : Perlakuan pemberian konsentrasi lendir lidah buaya (*Aloe vera Linn*) 60%.

P₆ : Perlakuan pemberian konsentrasi lendir lidah buaya (*Aloe vera Linn*) 50%.

P₇ : Perlakuan pemberian konsentrasi lendir lidah buaya (*Aloe vera Linn*) 40%.

P₈ : Perlakuan pemberian konsentrasi lendir lidah buaya (*Aloe vera Linn*) 30%.

P₉ : Perlakuan pemberian konsentrasi lendir lidah buaya (*Aloe vera Linn*) 20%.

P₁₀ : Perlakuan pemberian konsentrasi lendir lidah buaya (*Aloe vera Linn*) 10%.

P₁₁ : Perlakuan pemberian kontrol positif (ketokonazol 2 %).

O₁ : Observasi pertumbuhan *Malassezia furfur* setelah pemberian lendir lidah buaya (*Aloe vera Linn*) dengan konsentrasi 100%.

O₂ : Observasi pertumbuhan *Malassezia furfur* setelah pemberian lendir lidah buaya (*Aloe vera Linn*) dengan konsentrasi 90%.

O₃ : Observasi pertumbuhan *Malassezia furfur* setelah pemberian lendir lidah buaya (*Aloe vera Linn*) dengan konsentrasi 80%.

O₄ : Observasi pertumbuhan *Malassezia furfur* setelah pemberian lendir lidah buaya (*Aloe vera Linn*) dengan konsentrasi 70%.

O₅ : Observasi pertumbuhan *Malassezia furfur* setelah pemberian lendir lidah buaya (*Aloe vera Linn*) dengan konsentrasi 60%.

- O₆ : Observasi pertumbuhan *Malassezia furfur* setelah pemberian lendir lidah buaya (*Aloe vera Linn*) dengan konsentrasi 50%.
- O₇ : Observasi pertumbuhan *Malassezia furfur* setelah pemberian lendir lidah buaya (*Aloe vera Linn*) dengan konsentrasi 40%.
- O₈ : Observasi pertumbuhan *Malassezia furfur* setelah pemberian lendir lidah buaya (*Aloe vera Linn*) dengan konsentrasi 30%.
- O₉ : Observasi pertumbuhan *Malassezia furfur* setelah pemberian lendir lidah buaya (*Aloe vera Linn*) dengan konsentrasi 20%.
- O₁₀ : Observasi pertumbuhan *Malassezia furfur* setelah pemberian lendir lidah buaya (*Aloe vera Linn*) dengan konsentrasi 10%.
- O₁₁ : Observasi pertumbuhan *Malassezia furfur* setelah pemberian kontrol positif ketokonazol 2 %.

3.2 Populasi dan Sampel Penelitian

3.2.1 Populasi penelitian

Populasi dalam penelitian ini adalah biakan murni jamur *Malassezia furfur* yang tumbuh pada media *Saboroud Dextrose Agar* (SDA) dengan ditambah olive oil.

3.2.2 Sampel penelitian

Sampel yang diperiksa adalah koloni dari biakan murni *Malassezia furfur* yang diisolasi pada media *Sabouroud Dextrose Agar* (SDA) dengan ditambah olive oil.

Dalam penelitian ini, untuk setiap perlakuan dilakukan masing-masing sebanyak 3 kali pengulangan yang diperoleh berdasarkan rumus Riwidikdo, (2008), hasil replikasi sebagai berikut :

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

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

$$9 (n - 1) \geq 15$$

$$9n - 9 \geq 15$$

$$9n \geq 9 + 15$$

$$n \geq 2,66 \approx 3$$

keterangan :

n : Replikasi atau pengulangan

k : Perlakuan

sehingga total seluruhnya terdapat 33 unit percobaan.

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 59 Surabaya.

3.3.2 Waktu penelitian

Waktu penelitian dilakukan pada bulan November 2014 sampai dengan bulan April 2015. Sedangkan waktu pemeriksaan dilakukan pada bulan Januari 2015.

3.4 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional Variabel

3.4.1 Variabel Penelitian

Dalam penelitian ini, variabel penelitian terdiri dari :

1. Variabel bebas : Daya hambat lendir lidah buaya (*Aloe vera Linn*).
2. Variabel terikat : Pertumbuhan jamur *Malassezia furfur*.
3. Variabel kontrol : Sterilisasi, inkubasi, cara inokulasi, volume lendir lidah buaya dengan berbagai konsentrasasi dan volume olive oil.

3.4.2 Definisi Operasional Variabel

1. Daya hambat lendir lidah buaya (*Aloe vera Linn*) yang dinyatakan dalam konsentrasi per volume aquadest (%), konsentrasi lendir terdiri dari 100%, 90 %, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20% dan 10%, variabel konsentrasi dalam skala interval.
2. Pertumbuhan jamur dalam penelitian ini berupa angka yang menunjukkan tumbuhnya koloni jamur *Malassezia furfur* pada metode difusi sumuran yang diketahui dari konsentrasasi minimum (MIC) lendir lidah buaya (*Aloe vera Linn*) untuk menghambat pertumbuhan jamur *Malassezia furfur*.

Diameter zona hambat *Malassezia furfur* adalah diameter zona bening yang terbentuk dari lendir lidah buaya yang terdifusi pada lubang sumur pada media *Saboroud Dextrose Agar* (SDA) yang sudah diinokulasi dengan *Malassezia furfur*, variabel pertumbuhan jamur *Malassezia furfur* dalam skala rasio.

3. Sterilisasi dengan suhu 121⁰C dengan tekanan 1,1 kg/cm² atau 10 Lb selama 15 menit. Lama proses inkubasi 5 x 24 jam dengan suhu 37⁰C sedangkan cara menginokulasi dari sediaan murni ke media *Saboroud Dextrose Agar* (SDA)

menggunakan lidi kapas steril. Adapun volume lendir lidah buaya dengan berbagai konsentrasi adalah 1ml sedangkan volume olive oil adalah 1 ml.

3.5 Metode pengumpulan data

Data yang digunakan dalam penelitian ini merupakan data primer yang diperoleh dari penelitian sampel langsung dengan menggunakan variasi konsentrasi lendir lidah buaya (*Aloe vera Linn*) terhadap pertumbuhan jamur *Malassezia furfur*.

Data pertumbuhan *Malassezia furfur* dikumpulkan dengan cara observasi melalui pengujian laboratorium yaitu dengan mengamati pertumbuhan jamur pada variasi konsentrasi lendir tanaman lidah buaya (*Aloe vera Linn*) dengan menggunakan metode difusi sumuran, adapun langkah-langkah pemeriksaan sebagai berikut :

3.5.1 Persiapan pemeriksaan

3.5.1.1 Bahan Penelitian

Adapun bahan-bahan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut : Biakan murni jamur *Malassezia furfur*, lendir lidah buaya (*Aloe vera Linn*), media *Saboroud Dextrose Agar* (SDA), olive oil, PZ (NaCl 0,85 – 0,9 %) steril, larutan clorin , aquadest steril, NaOH 2N, HCl 2N.

3.5.1.2 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut : Tabung reaksi, rak tabung, gelas arloji, api spirtus, pipet ukur 10 ml, filler, kapas berlemak, neraca triple beam balance, petridisk, batang pengaduk, autoclave, inkubator, kertas saring, hot plate, gelas ukur 500 ml, sendok, pH media, pipet tetes, erlenmeyer 250 ml, beaker glass 250 ml , aluminium foil, filler.

3.5.1.3 Cara Sterilisasi Alat dan Bahan Penelitian

1. Mengisi bagian dasar autoklaf dengan aquades hingga batas tertentu.
2. Menutup sekat yang berlubang-lubang antara bagian dasar dan bagian atas Autoklaf.
3. Memasukkan alat dan 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 $1,1 \text{ kg/cm}^2$ atau 10 Lb. Sterilisasi dipertahankan 15 menit setelah suhu atau tekanan uap mencapai batas tertentu.
8. Membuka katup autoklaf dengan cara buka-tutup hingga tekanan uap turun.
9. Membuka tutup autoklaf dengan hati-hati, kemudian mengeluarkan alat dan bahan-bahan yang telah disterilisasi (Novel dkk, 2010).

3.5.1.4 Pembuatan Media *Saboroud Dextrose Agar* (SDA)

Alat yang digunakan adalah gelas arloji, erlenmeyer 1000 ml, batang pengaduk, pipet ukur 10 ml, neraca analitik, hot plate, petridisk, gelas ukur 500 ml, pH media dan pipet tetes.

Prosedur kerja :

1. Menimbang *Saboroud Dextrose Agar* (SDA) dan memasukkan kedalam 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 kukuh, melakukan pengukuran pH media (5,5 – 7,8).
5. Menutup erlenmeyer dengan kapas berlemak yang diselimuti dengan kain kasa, dan bungkus mulut erlenmeyer dengan alumunium voil dan ikat dengan tali.
6. Sterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121⁰C selama 15 menit.
7. Tambahkan dengan larutan chlorampenicol 2 ml dan secara steril kedalam larutan media tadi (larutan Chlorampenicol steril : 250 mg chlorampenicol ditambah 10 ml PZ steril). Melakukan penambahan larutan chlorampenicol kedalam media sebelum media memadat. Setelah itu menuangkan media pada cawan petri steril. Melakukan semua tahapan diatas secara steril (Soewarsono, 1996).

3.5.1.5 Pengambilan cairan lendir lidah buaya (*Aloe vera Linn*)

Alat yang digunakan adalah sendok steril dan beaker glass 250 ml.

1. Mengambil tanaman lidah buaya (*Aloe vera Linn*) yang tidak cacat (daun tidak berlubang).
2. Mencuci tanaman lidah buaya (*Aloe vera Linn*) dengan air yang mengalir.
3. Mengambil cairan lendir tanaman lidah buaya (*Aloe vera Linn*) tepat dibawah kulit yang berwarna kuning dengan menggunakan sendok steril.

3.5.1.6 Pembuatan Lendir Tanaman lidah buaya (*Aloe vera Linn*)

Alat yang digunakan adalah neraca analitik, batang pengaduk, kertas saring, beaker glass 250 ml, erlenmeyer 250 ml dan corong.

Bahan yang digunakan adalah Tanaman lidah buaya dan aquadest steril.

Prosedur :

1. Semua alat yang akan digunakan disteril terlebih dahulu.
2. Saring lendir lidah buaya (*Aloe vera Linn*).
3. Menimbang sebanyak 100 gr.
4. Mendapatkan lendir lidah buaya (*Aloe vera Linn*) dengan konsentrasi 100%.
5. Memasukan dalam erlenmeyer steril kemudian ditutup dengan kapas berlemak.
6. Memanaskan lendir lidah buaya (*Aloe vera Linn*.) pada suhu 60 – 70°C selama 3 – 5 menit.
7. Menutup wadah lendir dengan aluminium foil.
8. Mendapatkan lendir lidah buaya (*Aloe vera Linn*) siap kerja.

3.5.1.7 Uji Sterilisasi Lendir

Melakukan sterilisasi dengan cara mengkulturkan lendir siap kerja pada media *Sabouroud Dextrose Agar* (SDA) dalam plate, kemudian inkubasi 37°C selama 2 x 24 jam. Lendir dinyatakan steril, jika tidak ada pertumbuhan jamur (Astutik, 2013).

3.5.1.8 Proses Pengenceran Lendir Lidah Buaya (*Aloe vera Linn*) dengan berbagai Konsentrasi

Menurut Isselbacher (1995) dalam karya tulis Adillah (2012) konsentrasi yang dibutuhkan untuk *Malassezia furfur* menyebabkan sakit pada manusia adalah $1,5 \cdot 10^7$ CFU/ml sama dengan konsentrasi virulensi dari *Candida*, karena merupakan jamur ragi. Untuk mendapatkan $1,5 \cdot 10^7$ CFU/ml, maka dilakukan pengenceran dari suspensi yang setara dengan Standart *Mc Farland* 0,5, yaitu sebagai berikut :

Pengenceran :

$$\frac{1,5 \cdot 10^8}{1,5 \cdot 10^7} = 10x$$

Sehingga diperoleh dari pengenceran setara *Mc. Farland* 0,5 yaitu 10x (1ml dari suspensi setara *Mc Farland* 0,5 + 9 ml PZ Steril).

Lendir lidah buaya (*Aloe vera Linn*) dibuat pengenceran dengan berbagai konsentrasi menggunakan aquadest steril menjadi 100%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%.

1. Tabung reaksi steril disiapkan dan diberi etiket dengan kode penulisan yaitu P₁ sampai P₁₁ untuk sampel lendir lidah buaya (*Aloe vera Linn*) dengan pengenceran 100%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, perlakuan positif (P₁₁) .

2. Untuk tabung yang berkode P₁ – P₁₀ dengan konsentrasi 100%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, diisi sebagai berikut :
 1. Tabung 1 dengan konsentrasi 100% (P₁) = 1 ml lendir lidah buaya (*Aloe vera Linn*).
 2. Tabung 2 dengan konsentrasi 90% (P₂) = 0,9 ml lendir lidah buaya (*Aloe vera Linn*) + 0,1 ml aquadest steril.
 3. Tabung 3 dengan konsentrasi 80% (P₃) = 0,8 ml lendir lidah buaya (*Aloe vera Linn*) + 0,2 ml aquadest steril.
 4. Tabung 4 dengan konsentrasi 70% (P₄) = 0,7 ml lendir lidah buaya (*Aloe vera Linn*) + 0,3 ml aquadest steril.
 5. Tabung 5 dengan konsentrasi 60% (P₅) = 0,6 ml lendir lidah buaya (*Aloe vera Linn*) + 0,4 ml aquadest steril.
 6. Tabung 6 dengan konsentrasi 50% (P₆) = 0,5 ml lendir lidah buaya (*Aloe vera Linn*) + 0,5 ml aquadest steril.
 7. Tabung 7 dengan konsentrasi 40% (P₇) = 0,4 ml lendir lidah buaya (*Aloe vera Linn*) + 0,6 ml aquadest steril.
 8. Tabung 8 dengan konsentrasi 30% (P₈) = 0,3 ml lendir lidah buaya (*Aloe vera Linn*) + 0,7 ml aquadest steril.
 9. Tabung 9 dengan konsentrasi 20% (P₉) = 0,2 ml lendir lidah buaya (*Aloe vera Linn*) + 0,8 ml aquadest steril.
 10. Tabung 10 dengan konsentrasi 10% (P₁₀) = 0,1 ml lendir lidah buaya (*Aloe vera Linn*) + 0,9 ml aquadest steril.
 11. Tabung 11 (P₁₁) untuk control positif (PP), yaitu diisi 1 ml ketokonazol 2 %, dengan cara menumbuk tablet ketokonazol dan

ditimbang sebanyak 0,02 gr kemudian dilarutkan dalam 200 ml etanol, kemudian larutan ini diambil 2 ml untuk melarutkan ke dalam 100 ml aquadest, menggunakan ketokonazol 2%.

12. Menginkubasi semua tabung pada suhu 37°C selama 2 x 24 jam.

3.5.1.9 Penanaman Suspensi Jamur *Malassezia furfur* pada Media *Saboroud Dextrosa Agar* (SDA)

Alat yang digunakan adalah lidi kapas dan api spiritus lalu bahan yang digunakan adalah jamur *Malassezia furfur*, olive oil, larutan clorin dan Media *Saboroud Dextrose Agar* (SDA).

Prosedur :

1. Mengambil koloni jamur *Malassezia furfur* dengan menggunakan lidi kapas steril, penanaman menggunakan api spiritus, lalu menggesekkan pada permukaan media *Saboroud Dextrose Agar* (SDA) dan menambahkan olive oil. Selanjutnya, lidi kapas steril dengan larutan clorin.
2. Inkubasi pada inkubator 37⁰C selama 5 x 24 jam.
3. Amati pertumbuhan koloni jamur *Malassezia furfur* yang tumbuh pada media SDA (Dwidjoseputro, 1998).

3.5.1.10 Penghambatan Lendir Lidah Buaya (*Aloe vera Linn*) terhadap Pertumbuhan Jamur *Malassezia furfur*

Prosedur :

1. Siapkan alat dan bahan.
2. Membuat sumuran pada media *Sabouroud Dextrose Agar* (SDA) yang tumbuh koloni jamur *Malassezia furfur*.
3. Masukkan lendir tanaman lidah buaya (*Aloe vera Linn*) berbagai konsentrasi pada masing – masing sumuran sebanyak 1ml.
4. Lakukan hal tersebut pada replikasi.
5. Amati diameter zona hambat yang terbentuk.

3.5.1.11 Interpretasi Hasil

Penghambatan dengan metode difusi sumuran dengan konsentrasi terendah (*Minimum Inhibition Concentration*) dari lendir tanaman lidah buaya (*Aloe vera Linn*) terhadap biakan jamur *Malassezia furfur* pada media *Sabouroud Dextrose Agar* (SDA) dapat menghambat pertumbuhan jamur *Malassezia furfur*.

3.5.1.12 Tabulasi Data

Data diperoleh dari pertumbuhan jamur *Malassezia furfur* yang tumbuh pada media *Sabouroud Dextrose Agar* (SDA) dengan penambahan olive oil yang mengalami inkubasi selama 5 x 24 jam, setelah diberi perlakuan dengan lendir tanaman lidah buaya (*Aloe vera Linn*) kemudian hasil perolehan data ditabulasikan kedalam tabel sebagai berikut :

Tabel 3.1 Tabulasi Data Hasil Penelitian Daya Hambat Lendir Lidah Buaya (*Aloe vera Linn*) Terhadap Pertumbuhan Jamur *Malassezia furfur*

Konsentrasi	Diameter Zona Hambat (cm)			Jumlah	Rata - rata
	Replikasi I	Replikasi II	Replikasi III		
10%					
20%					
30%					
40%					
50%					
60%					
70%					
80%					
90%					
100%					
Kontrol Positif					

3.6 Metode Analisis Data

Untuk mengetahui apakah ada daya hambat lendir lidah buaya (*Aloe vera Linn*) terhadap pertumbuhan jamur *Malassezia furfur* maka menggunakan uji Kruskal Wallis dengan taraf kesalahan (α) 5%.