

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Ruang lingkup penelitian

Penelitian ini adalah penelitian di bidang mikrobiologi, kimia dan farmakologi.

3.2 Tempat dan waktu penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kimia Organik Fakultas Sains dan Matematika UNDIP untuk pembuatan ekstrak jahe merah dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran UNDIP Rumah Sakit Nasional Diponegoro Tembalang untuk uji efektivitas dan isolasi jamur. Penelitian ini dilakukan selama 5 bulan dimulai dari tahap penyusunan proposal.

3.3 Jenis dan rancangan penelitian

Pada penelitian ini, jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental dengan rancangan *post test only control group design* pada uji efektivitas antijamur. Perlakuan yang diberikan yaitu dengan memberikan ekstrak jahe merah (*Zingiber officinale var. rubrum*) dan ketokonazol 2%, sedangkan keluarannya (outcome) adalah perbedaan efektivitas ekstrak jahe merah dan ketokonazol sebagai antijamur. Penelitian dilakukan dengan mengamati hasil *post test* kemudian membandingkan dengan kontrol.

3.4 Populasi dan sampel

3.4.1 Sampel

Sampel yang akan digunakan pada penelitian ini adalah suspensi biakan *Malassezia sp.* yang diisolasi oleh Laboratorium Mikrobiologi FK Undip dari penderita pada media Mueller Hinton (MH) agar yang telah memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi.

3.4.2 Cara sampling

Pada penelitian ini, pengambilan sampel penelitian dari pasien tidak dilakukan karena sampel yang digunakan sudah terdapat di laboratorium dan sudah memenuhi target sampel.

3.4.3 Besar sampel/ replikasi

Jumlah replikasi/sampel penelitian ini ditentukan menurut rumus Federer untuk uji eksperimental, yaitu :

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

Dimana (t) adalah kelompok perlakuan dan (n) adalah jumlah replikasi perkelompok perlakuan. Karena perlakuan meliputi pengujian dengan ketokonazol 2%, ekstrak jahe merah dengan konsentrasi 0%, 83%, 90% dan 95 % (4 perlakuan), maka perhitungan jumlah replikasi sebagai berikut :

$$(4 - 1)(n - 1) > 15$$

$$3(n - 1) > 15$$

$$n - 1 > 15 : 3$$

$$n - 1 > 5$$

$$n > 5 + 1$$

$$n > 6 = 7$$

3.5 Variabel penelitian

3.5.1. Variabel bebas

1. Larutan antijamur yang diuji, berupa :
 - ekstrak jahe merah dengan konsentrasi 83%
 - ekstrak jahe merah dengan konsentrasi 90%
 - ekstrak jahe merah dengan konsentrasi 95%
 - ketokonazol 2%

3.5.2. Variabel terikat

1. Pertumbuhan *Malessezia sp.* pada Mueller Hinton agar yang mengandung anti jamur yang di uji.

3.6 Definisi operasional

Tabel 3. Definisi operasional

No.	Variabel	Definisi Operasional	Unit	Skala
1	Antijamur yang di uji :			
	a. Ekstrak jahe merah (<i>Zingiber officinale</i> <i>var. rubrum</i>)	Jahe merah yang diekstraksi menggunakan etanol 96% dengan metode maserasi.	b/b	Nominal 1. 83% 2. 90% 3. 95%
	b. Ketokonazol tablet	Ketokonazol tablet total 2 g (10 tablet @ 200 mg) yang dilarutkan dalam 100 ml aquades	b/v	4. 2 %
2	Pertumbuhan <i>Malassezia sp.</i>	Ada tidaknya pertumbuhan <i>Malassezia sp.</i> setelah diinkubasi pada media MH agar yang mengandung antijamur yang diuji		Nominal 0 = tidak tumbuh 1 = tumbuh

3.7 Cara pengumpulan data

3.7.1 Alat

- a. Biakan standar *Malassezia sp.*
- b. Media ekstraksi
- c. Rak tabung reaksi
- d. Tabung reaksi
- e. Osse steril
- f. Gelas ukur
- g. Gelas erlenmeyer
- h. Cawan petri
- i. Inkubator
- j. Autoklaf
- k. Pipet mikro
- l. Kertas PH
- m. Skot
- n. Batang pengaduk
- o. Kaca preparat
- p. Mikroskop

3.7.2 Bahan

- a. Media Mueller Hinton Agar
 - Ekstrak daging 2gr/L
 - *Acid Hydrolase of Casein* 17,5 gr/L
 - Pati 1,5 gr/L

- Agar 17 gr/L
- b. Media Saboraud Dextrose Agar
- c. Aquadest
- d. Larutan standart 0.5 *McFarland*
- e. Larutan NaCL 0,9%
- g. Cat pewarna Gram
- i. Ekstrak Jahe Merah
- j. Ketokonazol 2%

3.7.3 Jenis data

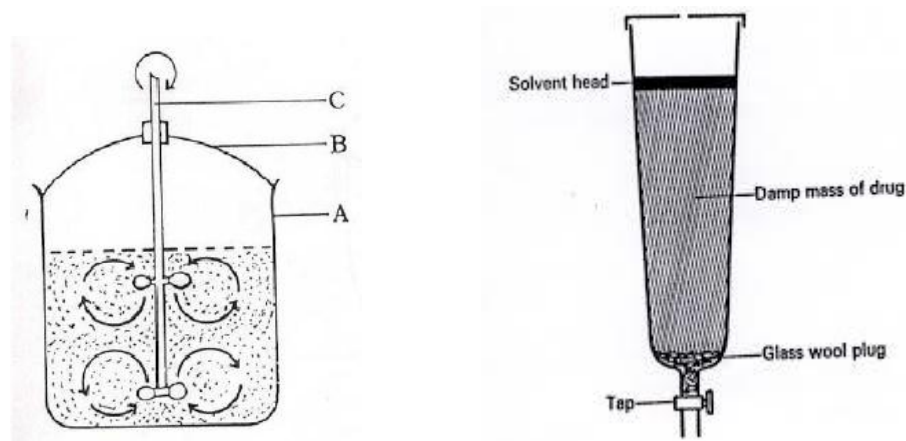
Data yang dikumpulkan adalah merupakan data primer hasil penelitian, yaitu ada tidaknya pertumbuhan *Malassezia sp.* pada media MH agar yang mengandung ekstrak jahe merah serta ketokonazol 2%. Media pertumbuhan pada Mueller Hinton Agar merupakan data primer yang bersifat kualitatif.

3.7.4 Cara kerja

3.7.4.1 Pembuatan ekstrak jahe merah

1. Jahe merah dicuci bersih hingga hilang kotorannya kemudian dipotong potong tipis dan diangin-anginkan dibawah sinar matahari
2. Timbang seksama sampel (I) +/-60 gr dan dan sampel (II) +/-54 gr Jahe merah yang telah kering, kemudian masukkan keduanya dalam dua erlenmeyer ukuran 1 liter.
3. Tambahkan keduanya pelarut etanol 96%, sampai sampel terendam semua (-/+ 300 ml).

4. Tutup dan gojok rendaman, simpan di tempat gelap lalu biarkan selama 24 jam.
5. setelah 24 jam, saring rendaman tersebut dengan kertas saring/kain flannel dan tuangkan dalam cawan porselin
6. Uapkan diatas waterbath dengan suhu 60-70° C atau di angina-anginkan sampai air dan pelarutnya hilang dan didapatkan ekstraknya.
7. Sisa rendaman ditambah pelarut serupa dengan volume yang lebih kecil dari yang pertama (-/250 ml) dan dilakukan percobaan yang sama
8. Proses rendaman keduanya dilakukan 3 kali dengan volume pelarut masing masing rendaman (I) 300 ml, rendaman (II) 250 ml dan rendaman (III) 200 ml
9. Timbang ekstrak kental jahe merah yang diperoleh



Gambar 6. Alat pembuatan ekstraksi Maserasi

3.7.4.2 Pembuatan suspensi jamur *Malassezia sp*

Dengan osse steril, koloni jamur *Malassezia sp.* diambil sebanyak 1 osse dari media Saboraud Dextrose Agar. Kemudian disuspensikan kedalam aquades steril. Konsentrasi jamur dalam suspensi tersebut diukur berdasarkan kekeruhan

menggunakan spektrofotometer pada transmitten 80% yang setara dengan larutan standar *Mc Farland 0,5*.

3.7.4.3 Pembuatan larutan antijamur

1. Menimbang bahan bahan sesuai kebutuhan.
2. Melarutkan antijamur dengan konsentrasi 10 kali lipat yang diuji (sebab larutan antijamur yang diuji akan diencerkan dengan media MH dengan konsentrasi 1: 19) yaitu :
 - Konsentrasi ekstrak 83% : 5 gram + 1 ml aquades
 - Konsentrasi ekstrak 90% : 10 gram + 1 ml aquades
 - Konsentrasi ekstrak 95% : 20 gram + 1 ml aquades
3. Melakukan sterilisasi antijamur dengan media BAP

3.7.4.4 Pembuatan media Mueller Hilton (MH) Agar yang mengandung antijamur dengan konsentrasi tertentu

1. Menimbang media MH agar sebanyak 4 gram diatas neraca analitik
2. Memasukkan bahan MH agar ke dalam labu Erlenmeyer, lalu ditambahkan aquades sebanyak 200 ml dipanaskan sambil diaduk supaya larut, sampai menjadi homogen, jangan sampai mendidih.
3. Mengatur pH supaya mencapai 7,2 – 7,4 (apabila pH awal asam ditambahkan NaOH, apabila pH Basa ditambahkan HCl).
4. Lakukan sterilisasi dengan otoklaf pada 121°C selama 15 menit, dinginkan hingga mencapai 60°C.

5. Tuangkan 19 ml larutan MH agar cair ke dalam cawan petri
6. Masukkan 1 ml larutan antijamur konsentrasi tertentu yang sesuai, kocok hingga merata. Dibiarkan hingga memadat

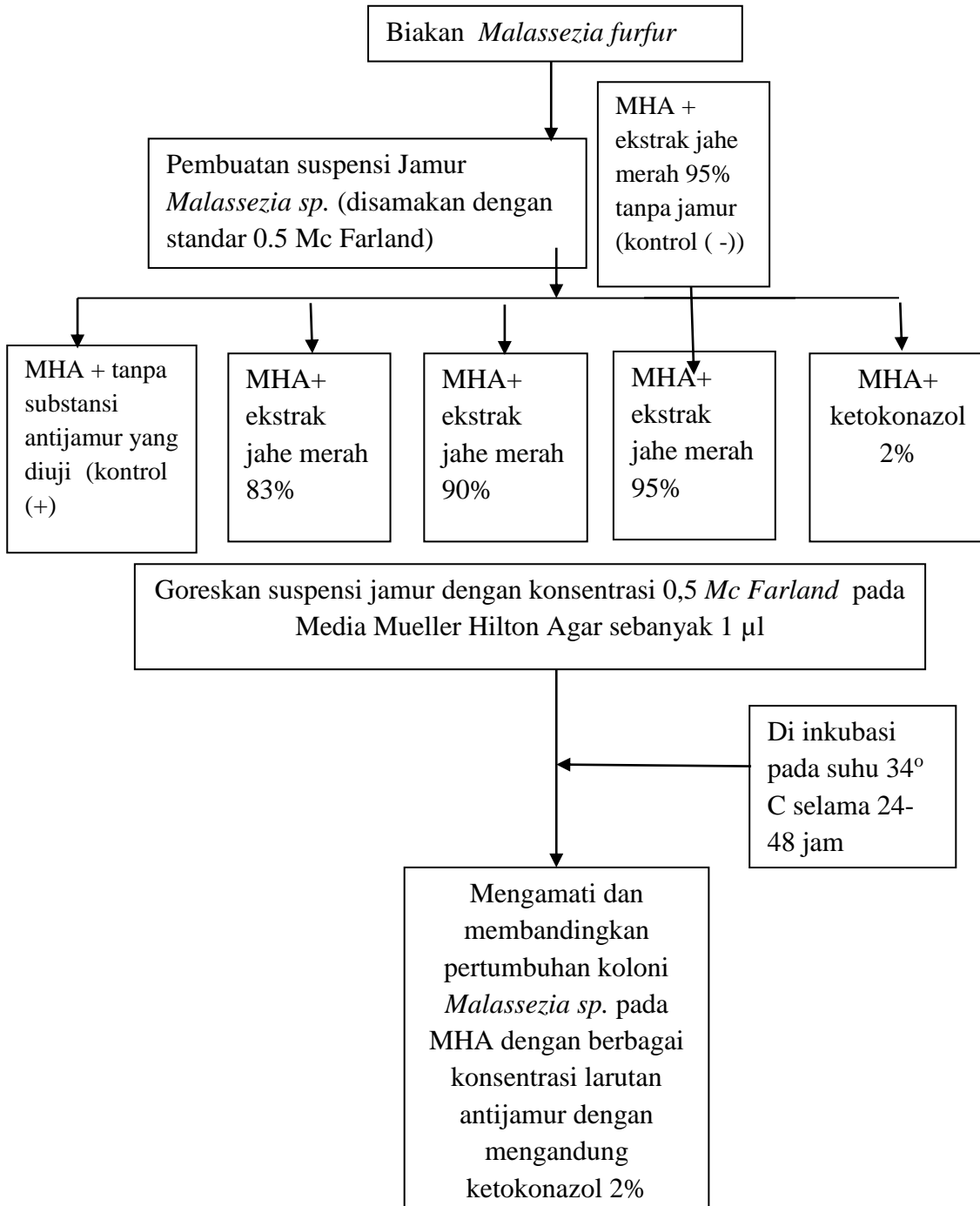
3.7.4.5 Pengujian aktivitas antijamur

- a. 1 µl suspensi *Malassezia sp.* ditanam pada media MH agar yang telah mengandung antijamur yang akan diuji dengan metode streak.
- b. Media MH agar diinkubasi pada suhu 34°C selama 24-48 jam, selanjutnya diamati adanya pertumbuhan jamur atau tidak adanya pertumbuhan koloni jamur *Malassezia sp.* yang terbentuk pada cawan media MH agar.
- c. Pertumbuhan jamur *Malassezia sp.* di dalam cawan MH agar dari masing-masing larutan antijamur dibandingkan dan dianalisis.

3.7.5 Pengambilan data

Pengumpulan data dilakukan pada setiap jenis antifungi yang telah menjalani uji efektivitas antifungi dalam 7 kali percobaan (antifungi tanpa ekstrak jahe merah dan ketokonazol 2% serta konsentrasi ekstrak jahe merah).

3.8 Alur Penelitian



Gambar 7. Alur Penelitian

3.9 Analisa Data

Analisa dalam penelitian ini akan menggunakan uji nonparametrik *Kruskal Wallis* yang apabila ditemukan perbedaan bermakna akan dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney*. H_0 (hipotesis yang menyatakan tidak adanya hubungan antara variabel independen (X) dan variabel dependen (Y)) ditolak apabila nilai derajat kemaknaan adalah $p < 0,05$, pada interval kepercayaan 95%.

3.10 Etika Penelitian

Penelitian ini telah dimintakan *ethical clearance* dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/ RSUP Dr. Kariadi Semarang dengan nomor 302/EC/FK-RSDK/2016, serta ijin penelitian di Laboratorium Mikrobiologi Rumah Sakit Nasional Diponegoro Semarang.