

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Ruang Lingkup Penelitian

Ruang lingkup disiplin ilmu penelitian ini yaitu Ilmu Farmakologi, Ilmu Mikrobiologi, dan Ilmu Penyakit Kulit dan Kelamin.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan pada bulan Maret hingga Juni 2016. Kegiatan penelitian seperti pembuatan air perasan jeruk nipis serta media *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) dan penanaman biakan jamur *Malassezia furfur* serta perlakuan pada isolat *Malassezia furfur* telah dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro-Rumah Sakit Nasional Diponegoro.

3.3 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental dengan rancangan *Post Test Only Control Group Design*.

3.4 Populasi dan Sampel

3.4.1 Populasi Target

Jamur *Malassezia furfur*.

3.4.2 Populasi Terjangkau

Jamur *Malassezia furfur* yang tersedia di laboratorium dibiakan pada media *Saboraud Dextrose Agar olive oil* di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro-Rumah Sakit Nasional Diponegoro.

3.4.3 Sampel

Sampel yang digunakan adalah biakan jamur *Malassezia furfur* pada media *Saboraud Dextrose Agar olive oil* di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro-Rumah Sakit Nasional Diponegoro diinkubasi pada suhu 25°C selama 3 hari.

3.4.4 Besar Sampel

Penentuan jumlah subjek minimal ditentukan berdasarkan rumus Federer yaitu $(t-1)(n-1) \geq 15$, bahwa t merupakan jumlah perlakuan, sedangkan n merupakan banyak pengulangan pada tiap perlakuan, sehingga didapatkan $n \geq 2,7$. Penelitian ini menggunakan pengulangan tiap perlakuan sebanyak 5 kali pengulangan.

Formula Federer = $(T-1)(N-1) > 15$

$$\begin{aligned} \text{Singkatan} & : T & : \text{Jumlah perlakuan} \\ & N & : \text{Jumlah pengulangan tiap perlakuan} \\ & = & (10-1) (N-1) > 15 \\ & = & 9N-9 > 15 \\ & = & N > 2,7 \end{aligned}$$

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Bebas atau Independen

- a. Air perasan jeruk nipis
- b. Ketokonazol 2%

3.5.2 Variabel Terikat atau Dependen

Pertumbuhan dari koloni *Malassezia furfur* pada media *Saboraud Dextrose Agar olive oil*.

3.6 Definisi Operasional

Tabel 2. Definisi Operasional

No	Definisi Operasional	Keterangan	Skala	Unit
1.	Pertumbuhan koloni <i>Malassezia furfur</i>	Ada atau tidaknya pertumbuhan koloni <i>Malassezia furfur</i> yang dinilai dengan penghasilan koloni mengilat atau berwarna putih pucat hingga krem pada media <i>Saboraud Dextrose Agar olive oil</i> yang diinkubasi pada suhu 25°C selama 2-5 hari. (+) : Terdapat pertumbuhan koloni <i>Malassezia furfur</i> . Lalu dilanjutkan pemeriksaan mikroskopik dan tidak didapatkan <i>Malassezia furfur</i> . (-) : Tidak terdapat pertumbuhan koloni <i>Malassezia furfur</i> . Lalu dilanjutkan pemeriksaan mikroskopik dan tidak didapatkan <i>Malassezia furfur</i> .	Nominal	-
2.	Air Perasan Jeruk Nipis	Air perasan jeruk nipis dengan berbagai konsentrasi. Konsentrasi hambat minimal merupakan konsentrasi terendah dimana zat dapat menghambat pertumbuhan jamur dalam agar.	Ordinal	-
3.	Ketokonazol 2%	Didapatkan dengan menambahkan 2 gr ketokonazol yang telah digerus pada bahan media <i>SDA olive oil</i> .	Nominal	-

3.7 Cara Pengumpulan Data

3.7.1 Bahan

- a. Biakan *Malassezia furfur* pada media *Saboraud Dextrose Agar + olive oil*.
- b. Media *Saboraud Dextrose Agar + olive oil*.
- c. Media *Saboraud Dextrose Agar + olive oil* dengan formalin 1 ml.
- d. Media *Saboraud Dextrose Agar + olive oil* yang mengandung ketokonazol 2%.
- e. Media *Saboraud Dextrose Agar + olive oil* yang mengandung air perasan jeruk nipis.

Media *Saboraud Dextrose Agar* ini mengandung dextrose 1,2 gram, pepton 0,3 gram, agar-agar 2 gram, aquadest 30ml, pH 5,5 - 6. Bahan lain yang diperlukan adalah amoxicillin 50 µg/ml setiap tabung.

3.7.2 Alat

Alat pada penelitian ini menggunakan tabung reaksi, rak tabung, ose jarum, labu Erlenmeyer, autoklaf, alat timbangan, kapas, alat pemeras, dan lampu spiritus.

3.7.3 Jenis Data

Jenis data yang digunakan pada penelitian ini adalah data primer hasil dari penelitian yaitu ada pertumbuhan atau tidak dari *Malassezia furfur* pada media SDA + *olive oil* dengan air perasan jeruk nipis serta media SDA + *olive oil* dengan ketokonazol 2%. Kemudian dilakukan perbandingan antara media SDA + *olive oil* air perasan jeruk nipis dengan konsentrasi hambat minimal dan media SDA + *olive oil* + ketokonazol terhadap pertumbuhan *Malassezia furfur*.

3.7.4 Cara Kerja

3.7.4.1 Pembuatan Media *Saboraud Dextrose Agar Olive Oil*

1. Melakukan penimbangan bahan-bahan yang akan digunakan.
2. Semua bahan dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer untuk masing-masing media, digojok dan dipanaskan hingga homogen.
3. Melakukan pemberian antibiotic Amoxicilin sebanyak 50 µg/ml dan *olive oil* sebanyak 1 ml.
4. Melakukan penambahan 2 gr ketokonazol tablet yang telah digerus untuk media *Sabourad Dextrose Agar olive oil*, maka akan didapatkan media SDA *olive oil* dengan ketokonazol 2%.

5. Melakukan penambahan air perasan jeruk nipis untuk media *Saboraud Dextrose Agar olive oil* dengan air perasan jeruk nipis berbagai jenis konsentrasi.
6. Memberikan Formalin 1 ml untuk media *Saboraud Dextrose Agar olive oil* sebagai kontrol negatif.
7. Menyesuaikan pH agar mencapai 5,5 – 6,5 dengan menambahkan KOH.
8. Mengisi tabung reaksi dengan media sebanyak 10 ml setiap tabung.
9. Melakukan sterilisasi media dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 30-60 menit.
10. Mengeluarkan tabung berisi media dari autoklaf dan ditunggu hingga sedikit dingin (sekitar 55°C - 60°C), kemudian meletakkan tabung reaksi dengan posisi miring sudut 15°. Biarkan hingga dingin sampai agar-agar menjadi padat.

3.7.4.2 Pembuatan Media *Saboraud Dextrose Agar Olive Oil* dengan Air Perasan Jeruk Nipis dalam Berbagai Konsentrasi

1. Menyiapkan jeruk nipis dan alat pemeras. Jeruk nipis dilakukan pencucian terlebih dahulu. Selanjutnya, dilakukan Pemerasan air jeruk nipis dengan dipotong menjadi 2 bagian sama besar terlebih dahulu dan disaring airnya sebanyak 300 ml menggunakan saringan dimasukkan kedalam tabung Erlenmeyer steril, lalu ditutup dengan aluminium foil steril dan disimpan pada suhu 4°C sampai saat digunakan.
2. Menyiapkan 7 kelompok tabung dengan masing-masing kelompok 5 tabung reaksi.
3. Kelompok Tabung I terdiri dari air perasan jeruk nipis dengan konsentrasi 100% dalam 10 ml SDA *olive oil*.
4. Kelompok Tabung II terdiri dari air perasan jeruk nipis dengan konsentrasi 50% dalam 10 ml SDA *olive oil*.

5. Kelompok Tabung III terdiri dari air perasan jeruk nipis dengan konsentrasi 25% dalam 10 ml SDA *olive oil*.
6. Kelompok Tabung IV terdiri dari air perasan jeruk nipis dengan konsentrasi 12,5% dalam 10 ml SDA *olive oil*.
7. Kelompok Tabung V terdiri dari air perasan jeruk nipis dengan konsentrasi 6,25% dalam 10 ml SDA *olive oil*.
8. Kelompok Tabung VI terdiri dari air perasan jeruk nipis dengan konsentrasi 3,13% dalam 10 ml SDA *olive oil*.
9. Kelompok Tabung VII terdiri dari air perasan jeruk nipis dengan konsentrasi 1,56% dalam 10 ml SDA *olive oil*.
10. Melakukan penutupan tabung dengan kapas lalu media disterilkan dengan autoklaf dengan suhu 121°C selama 30 menit.
11. Tabung dikeluarkan dan didinginkan dalam posisi miring hingga agar-agar menjadi padat.

3.7.4.3 Penanaman Sampel

Penanaman sampel dilakukan dengan mengencerkan biakan *Malassezia furfur* dengan NaCl 0,9% disesuaikan dengan Mc Farland 0,5 dan diambil 0,1 cc kemudian ditanamkan pada :

- a. Media *Saboraud Dextrose Agar olive oil* yang mengandung ketokonazol 2% kemudian media ditutup dengan kapas dan diinkubasi selama 2-5 hari pada suhu 25°C.
- b. Media *Saboraud Dextrose Agar olive oil* yang mengandung air perasan jeruk nipis dengan berbagai konsentrasi kemudian media ditutup dengan kapas dan diinkubasi selama 2-5 hari pada suhu 25°C.
- c. Media *Saboraud Dextrose Agar olive oil* sebagai kontrol positif, kemudian media ditutup dengan kapas dan diinkubasi selama 2-5 hari pada suhu 25°C.
- d. Media *Saboraud Dextrose Agar olive oil* dengan Formalin sebagai kontrol negatif, kemudian media ditutup dengan kapas dan diinkubasi selama 2-5 hari pada suhu 25°C.

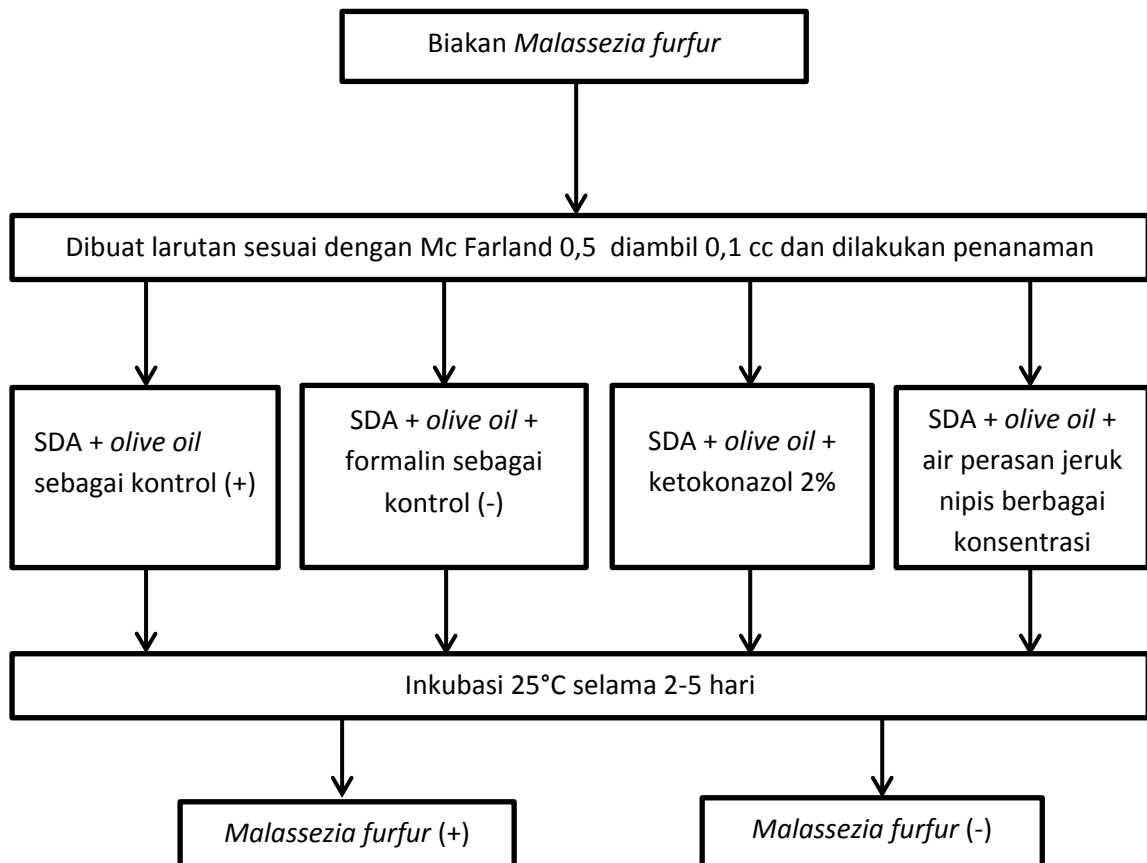
3.7.4.4 Pengamatan Sampel Hasil Penelitian

Setelah diinkubasi selama 2-5 hari pada suhu 25°C, diamati ada tidaknya pertumbuhan koloni *Malassezia furfur* pada media *Saboraud Dextrose Agar olive oil*.

3.7.4.5 Penentuan Konsentrasi Hambat Minimal

1. Menyiapkan sediaan SDA *olive oil* + air perasan jeruk nipis dengan berbagai konsentrasi yang telah dibuat sebelumnya.
2. Melakukan penanaman 0,1 ml suspensi *Malassezia furfur* ke setiap sediaan yang telah disiapkan.
3. Setelah ditanam, letakan pada rak dan masukan dalam inkubator dengan suhu 25°C selama 2-5 hari.
4. Hasil dikeluarkan dari inkubator, diamati apakah terdapat pertumbuhan dari *Malassezia furfur*. Kelompok dengan konsentrasi terkecil yang tidak memiliki pertumbuhan *Malassezia furfur* dianggap sebagai konsentrasi hambat minimal dan dibandingkan dengan ketokonazol 2%.

3.8 Alur Penelitian



Gambar 3. Alur Penelitian

3.9 Analisis Data

Analisis data pada penelitian ini meliputi uji normalitas data dan uji hipotesis. Uji normalitas data pada penelitian ini menggunakan uji *Shapiro-Wilk*. Kemudian dilanjutkan dengan uji hipotesis penelitian dengan menggunakan uji yaitu dengan uji *Kruskal-Wallis* jika $p < 0,05$, maka terdapat minimal 2 kelompok yang memiliki perbedaan bermakna. Untuk mengetahui kelompok yang memiliki perbedaan, maka dilakukan analisis *Post Hoc* yaitu uji *Mann-Whitney*.

3.10 Etika Penelitian

Sebelum dilakukan penelitian, *ethical clearance* diperoleh dari Komisi Etik Penelitian Kedokteran (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.