

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

Penelitian yang dilakukan bersifat eksperimental dengan desain penelitian berupa Rancangan Acak Lengkap (RAL). Terdapat dua variabel yaitu variabel bebas berupa air perasan daun pepaya (*Carica papaya* L.) dengan konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% dan variabel terikat pertumbuhan jamur *Malassezia furfur*. Sebagai kontrol negatifnya adalah aquades dan sebagai kontrol positifnya adalah ketokonazol. Pemeriksaan menggunakan metode difusi cakram *Kirby-Bauer* dengan melihat zona hambat yang terbentuk. Pengulangan dilakukan sebanyak 3 kali yang didapat dari perhitungan menggunakan rumus Federer yaitu $(t-1)(n-1) \geq 15$.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian akan dilakukan di Laboratorium Mikologi Teknologi Laboratorium Medis di Politeknik Kesehatan Tanjungkarang dan akan dilaksanakan pada bulan Februari - Juni 2022.

C. Subyek Penelitian

Daun pepaya yang digunakan adalah daun pepaya tua dengan kondisi segar yang berwarna hijau. Daun pepaya tua banyak mengandung zat alkaloid dan enzim papain yang bersifat sebagai antifungi. Daun pepaya (*Carica papaya* L.) dijadikan air perasan lalu dibuat konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, dan 100% yang digunakan sebagai larutan uji dalam menghambat pertumbuhan jamur *Malassezia furfur*. Jamur *Malassezia furfur* didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi Balai Laboratorium Kesehatan Provinsi Lampung.

D. Variabel dan Definisi Operasional Penelitian

Variabel	Definisi	Cara Ukur	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala
Variabel bebas: Air perasan daun pepaya (<i>Carica papaya</i> L.)	Daun pepaya yang tua ditimbang sebanyak 500 gram dicuci, diparut dan diambil air perasannya kemudian dibuat pengenceran dengan konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%	Air perasan diencerkan dengan rumus $V1 \times \%1 = V2 \times \%2$	Pipet ukur dan labu ukur	Air perasan daun pepaya (<i>Carica papaya</i> L.) konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%	Interval
Kontrol positif Ketokonazol	Obat antijamur ketokonazol dengan dosis 200 mg	Mengukur diameter zona hambat dengan metode difusi cakram Kirby Bauer	Jangka sorong	mm	Rasio
Variabel terikat: Zona hambat pertumbuhan jamur <i>Malassezia furfur</i>	Luas zona pertumbuhan jamur <i>Malassezia furfur</i> yang dapat dihambat oleh air perasan daun pepaya dan obat antijamur ketokonazol	Mengukur diameter zona hambat dengan metode difusi Kirby Bauer	Jangka sorong	Diameter zona hambat dalam kategori : 1. <10 mm daya hambat lemah 2. 10-15 mm daya hambat sedang 3. 16-20 mm daya hambat kuat 4. >20 mm daya hambat sangat kuat (Alfiah dkk., 2015).	Ordinal

E. Pengumpulan Data

1. Prosedur penelitian

- a. Pembuatan surat izin penelitian dan pemesanan strain jamur
- b. Pengumpulan alat dan bahan pemeriksaan

Alat yang digunakan adalah neraca analitik elektrik, *autoclave*, *beaker glass* 100 ml, wadah sampel, tabung reaksi, pipet ukur, lidi kapas steril, *disk*

blank, pinset, plate, kertas kopi, oven, corong gelas, *vortex mixer*, *hot plate*, erlenmeyer 250 ml, lampu spiritus, korek api, jangka sorong, *handscoon*, dan inkubator.

Bahan yang digunakan adalah aquades steril, NaCl, ketokonazol 200 mg, media *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA), minyak zaitun (*Olive oil*, daun pepaya (*Carica papaya* L.), dan strain murni *Malassezia furfur*.

c. Identifikasi daun pepaya

Daun pepaya (*Carica papaya* L.) yang didapatkan dideterminasi di Laboratorium Botani Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.

d. Identifikasi jamur *Malassezia furfur*

Strain murni jamur *Malassezia furfur* yang telah diidentifikasi dengan pengecatan LPCB didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Mulawarman Samarinda.

e. Pembuatan air perasan daun pepaya

Daun pepaya ditimbang sebanyak ± 500 gram dibersihkan dari kotoran-kotoran yang melekat dengan menggunakan air mengalir kemudian ditiriskan, dipotong kecil-kecil kemudian di tumbuk menggunakan mortar steril. Hasil tumbukan diperas dan disaring menggunakan kain kassa steril lalu di tampung dalam wadah steril, maka didapat air perasan dengan konsentrasi 100%. Larutan ini kemudian dilakukan pengenceran 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, dan 100%.

Pengenceran dengan menggunakan rumus berikut :

$$V_1 \times \%_1 = V_2 \times \%_2$$

Keterangan :

V_1 = Volume larutan uji yang dipipet (ml)

$\%_1$ = Konsentrasi larutan uji (100%)

V_2 = Volume larutan uji yang diinginkan (ml)

$\%_2$ = Konsentrasi larutan uji yang akan dibuat (%)

- f. Pengujian air perasan daun pepaya (*Carica papaya* L.) terhadap pertumbuhan jamur *Malassezia furfur*.

Metode : Difusi Cakram dengan cara *Kirby Bauer*

Prinsip : Cakram kertas filter yang mengandung sejumlah tertentu obat ditempatkan di atas permukaan medium padat yang telah diinokulasi pada permukaan dengan organisme uji. Setelah inkubasi, diameter zona jernih inhibisi di sekitar cakram diukur sebagai ukuran kekuatan inhibisi obat melawan organisme uji tertentu (Jawetz dkk, 2014).

1) Sterilisasi Alat

Alat-alat gelas yang digunakan dalam penelitian ini dibersihkan dan dikeringkan terlebih dahulu kemudian dibungkus dengan kertas pembungkus. Disterilkan dengan menggunakan oven pada suhu 160° selama 60 menit (Soemarno, 2000).

2) Pembuatan larutan kloramfenikol

Setiap 1000 ml *Sabouraud Dextrose Agar* memerlukan 400 mg kloramfenikol. Setiap 250 mg kloramfenikol dilarutkan dalam 10 ml NaCl 0,85% maka untuk 400 mg diperlukan NaCl 0,85% $\frac{400mg}{250 mg} \times 10 \text{ ml} = 16 \text{ ml}$ (Soemarno, 2000).

3) Pembuatan media *Sabouraud Dextrose Agar* + *Olive oil* 1%

Sebanyak 65 gram *Sabouraud Dextrose Agar* bubuk ditambahkan dengan 1000 ml aquades, diaduk kemudian dipanaskan. Setelah larut sempurna ditambahkan larutan kloramfenikol (untuk mencegah tumbuhnya kuman kontaminan) dan minyak zaitun (*Olive oil*) 1%. lalu media disterilkan di autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit pada tekanan 1 atm. Setelah disterilkan media dituang ke dalam plate yang telah disterilkan dan dibiarkan dingin (Soemarno, 2000).

Media yang sudah selesai dibuat, diambil beberapa plate kemudian diinkubasi dengan suhu 37°C. Apabila ada pertumbuhan 2 koloni saja per plate itu dianggap tidak steril (Soemarno, 2000).

4) Pembuatan larutan standar *Mac Farland* 0,5

Mencampurkan 9,95 ml larutan H_2SO_4 1% dengan 0,05 ml larutan $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1% sehingga volume menjadi 10 ml dengan perkiraan jumlah mikroba yaitu $1,5 \times 10^8$, dikocok sampai homogen. Larutan harus dikocok setiap akan digunakan untuk membandingkan suspensi jamur (Soemarno, 2000).

5) Pembuatan NaCl 0,85%

Menimbang 0,85 gram NaCl, kemudian larutkan dalam 100 ml aquades steril, dihomogenkan (Soemarno, 2000).

6) Pembuatan Suspensi *Malassezia furfur*

Biakan murni *Malassezia furfur*, dibuat suspensi dengan menambahkan larutan NaCl 0,85% di dalam tabung, dihomogenkan dengan alat *vortec mixer* sampai didapatkan kekeruhan yang disesuaikan dengan standar kekeruhan *Mac Farland* 0,5. Jika kurang keruh, maka suspensi ditambahkan koloni jamur *Malassezia furfur* sedangkan jika lebih keruh maka ditambahkan NaCl 0,85% (Soemarno, 2000).

7) Pembuatan kontrol positif

Dihaluskan 200 mg obat ketokonazol lalu ditambahkan dengan 10 ml alkohol dan dihomogenkan. Kemudian rendam disk blank ke dalam larutan tersebut selama 15 menit (Alfiah dkk., 2015).

8) Pelaksanaan Uji Daya Hambat

- a) Kedalam suspensi jamur yang sudah distandarisasi kekeruhannya, celupkan lidi kapas steril dan tunggu agar suspensi meresap ke dalam kapas, kemudian lidi kapas diangkat dan diperas dengan cara menekannya pada dinding tabung bagian dalam sambil diputar-putar (Pollack *et al.*, 2014).
- b) Pulaskan lidi kapas tersebut pada permukaan media SDA+*Olive oil* 1% sampai seluruh permukaan tertutup rapat dengan pulasan, dilakukan 3 x pulasan pada permukaan media dengan mombolak-balik lidi kapas pada setiap pulasan, dari pulasan I ke pulasan II plate diputar 90° sedangkan dari pulasan II ke pulasan III plate diputar 45° (Pollack *et al.*, 2014).
- c) Biarkan media SDA+*Olive oil* 1% tersebut diatas meja selama 5 menit agar suspensi jamur meresap ke dalam media, kemudian melakukan penempelan disk obat yang telah direndam dalam air perasan daun pepaya selama 15 menit

pada media SDA+*Olive oil* 1% dengan masing-masing media berisi 2 disk obat, dengan cara menaruhkan disk di permukaan media dengan pinset lalu ditekan sedikit sehingga disk obat menempel pada media SDA +*Olive oil* 1% dengan jarak antar disk obat lebih kurang 15 mm.

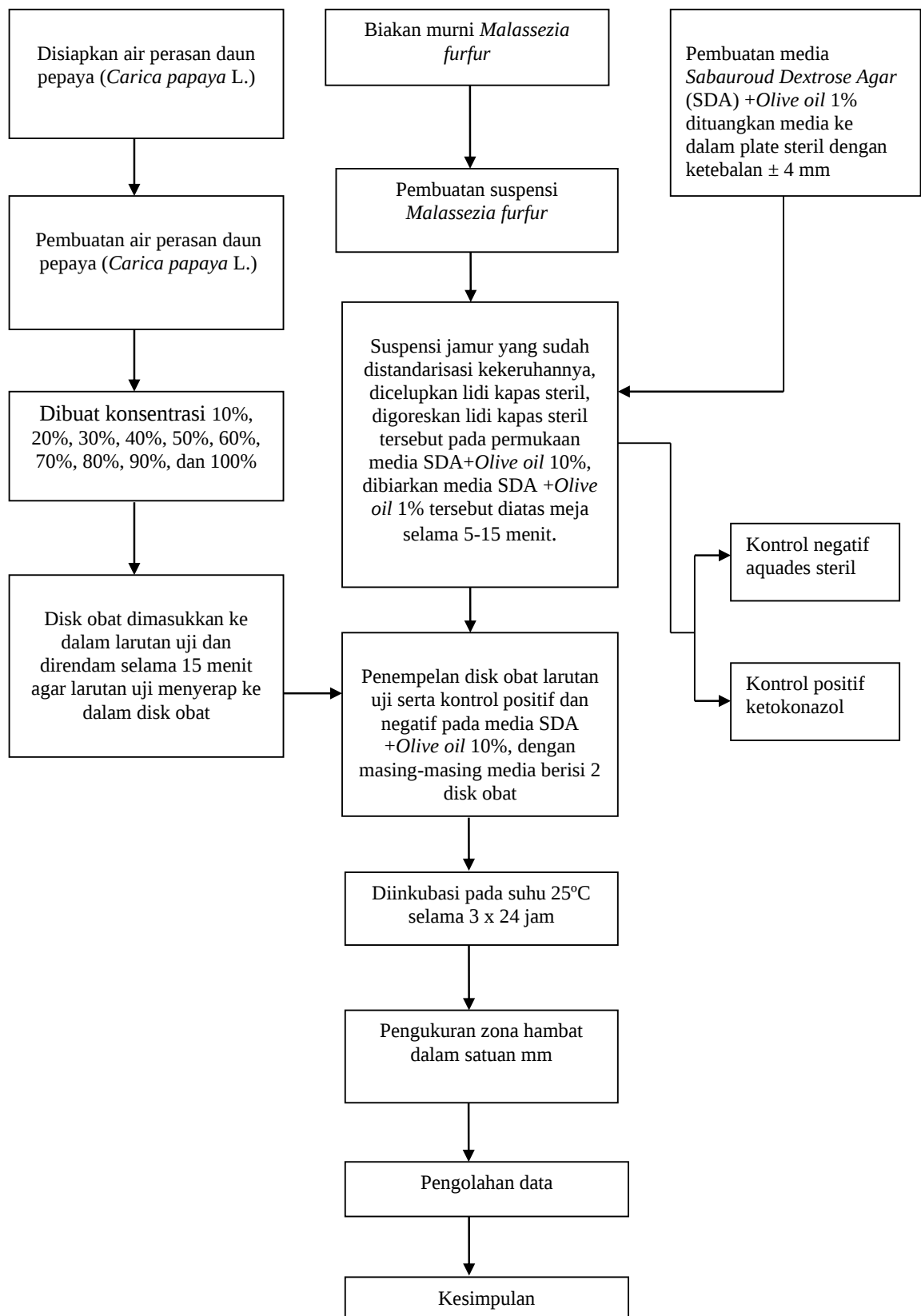
- d) Inkubasi lempeng agar pada suhu 37°C selama 3x24 jam (Soemarno, 2000).
- e) Zona bening yang terbentuk di sekitar disk obat diukur diameternya dengan menggunakan jangka sorong melalui tengah disk sebagai diameter daya hambat air perasan daun pepaya (*Carica papaya* L.) terhadap pertumbuhan jamur *Malassezia furfur*. Potensi antijamur diukur dengan mengukur zona radikal. Prosedur dilakukan sebanyak lima kali pengulangan (Soemarno, 2000).
- f) Interpretasi penentuan kategori respon hambatan pertumbuhan jamur dapat dilihat pada tabel 3.1.

Tabel 3.1 Klasifikasi respon hambatan pertumbuhan jamur

Diameter Zona Bening	Respon Hambatan Pertumbuhan
< 10 mm	Lemah
10 - 15 mm	Sedang
16 - 20 mm	Kuat
>20 mm	Sangat Kuat

(Alfiah dkk., 2015)

2. Skema Kerja Pemeriksaan



F. Pengolahan dan Anlisa Data

1. Pengolahan data

Data diperoleh dengan cara:

- Melakukan pengujian daya hambat air perasan daun pepaya konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, dan 100% terhadap pertumbuhan jamur *Malassezia furfur*.
- Melakukan pengukuran zona hambat dari masing-masing konsentrasi pada tiap pengulangan menggunakan alat ukur dalam satuan mm.
- Data zona hambat yang diperoleh disajikan dalam bentuk tabel dan dilakukan analisa univariat.

2. Analisa data

Analisa data yang digunakan adalah analisis data univariat dan bivariat.

- Analisa data univariat adalah data terhadap variabel dari hasil penelitian dengan masing-masing konsentrasi yang diukur zona hambatnya dilakukan pengulangan 3 kali kemudian diakumulasikan dan dihitung rata-ratanya.
- Analisa bivariat didapat dengan membandingkan zona hambat yang telah didapatkan rata-ratanya untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan signifikan antara zona hambat air perasan daun pepaya dengan pertumbuhan *Malassezia furfur* dilakukan dengan melihat hasil *P-value* pada uji *One-Way ANOVA*. Jika *P-value* <0,05 dilanjutkan ke uji BNT (dengan taraf kepercayaan 95% dan kesalahan 5%).

Tabel 3.2 Diameter zona hambat air perasan daun pepaya (*Carica papaya L.*) terhadap pertumbuhan jamur *Malassezia furfur*

Konsentrasi (%)	Diameter zona hambat pada masing-masing pengulangan (mm)			Jumlah (mm)	Rata-rata (mm)
	I	II	III		
10%					
20%					
30%					
40%					
50%					
60%					
70%					
80%					
90%					
100%					
Kontrol (+)					
Kontrol (-)					

Keterangan :

Kontrol (+): Ketokonazol

Kontrol (-): Aquades steril

G. *Ethical Clearance*

Penelitian yang dilakukan atas izin komisi etik, penelitian ini tidak akan menimbulkan bahaya bagi lingkungan, limbah yang dihasilkan dari proses penelitian ini akan dikumpulkan dan dimusnahkan dalam penanganan limbah. Limbah larutan uji air perasan daun pepaya ditangani dengan cara langsung dibuang pada saluran pembuangan, dikarenakan limbah larutan tidak membahayakan lingkungan. Limbah media plate serta limbah suspensi jamur *Malassezia furfur* pada tabung dimusnahkan dengan cara perebusan pada suhu 100°C selama 30 menit, limbah suspensi jamur *Malassezia furfur* yang telah direbus dibuang pada saluran pembuangan, lalu plate dan tabung direbus kembali dengan penambahan detergen, setelah itu air bekas rebusan plate dan tabung dibuang pada saluran pembuangan, plate dan tabung dicuci menggunakan detergen pada air mengalir.