

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

III.1 Jenis Penelitian

Merupakan penelitian eksperimen dengan pendekatan *Post Test – Only Control Group Design* dimana dilakukan perbandingan antara kelompok yang dilakukan perlakuan dengan menguji aktivitas antifungi daun kemangi terhadap *T. rubrum* terhadap satu atau lebih kelompok eksperimen yang nantinya akan dibandingkan dengan kelompok kontrol.

III.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

Lokasi penelitian di Lab. Parasitologi FK UPNVJ yang berlokasi di Jl. Pangkalan Jati, Pd. Labu, Jakarta Selatan, DKI Jakarta pada bulan Agustus sampai November 2020.

III.3 Subjek Penelitian

Koloni jamur *Trichophyton rubrum* yang nanti akan dikultur atau dibiakan dalam media SDA (*Sabouround Dextrose Agar*).

III.4 Besar Sampel Penelitian

Mengetahui berapa pengulangan pada tiap tiap kelompok dihitung dengan rumus Federer.

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

Keterangan :

r = banyak pengulangan

t = perlakuan, dalam hal ini ada 6 perlakuan (ekstrak daun kemangi konsentrasi 10%, 12,5%, 25%, 50%, DMSO, ketokonazol 2%)

15 = derajat kebebasan umum

Jika jumlah perlakuan ada 6 macam, maka jumlah pengulangan untuk tiap perlakuan adalah :

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

$$(r-1)(6-1) \geq 15$$

$$r = 4$$

Sehingga dari perhitungan tersebut diperoleh pengulangan untuk tiap perlakuan pada penelitian ini yaitu sebanyak 4 kali.

III.5 Bahan Uji Penelitian

- a. Suspensi jamur *T. rubrum* yang berasal dari Lab. Parasitologi FK UPNVJ,
- b. Daun kemangi dan ekstrak daun kemangi (*O. americanum* L.) yang diperoleh dari BALITRO,
- c. Media SDA (*Sabouroud Dextrose Agar*),
- d. Kertas cakram,
- e. Aquades steril,
- f. Dimetil sulfoksida,
- g. NaCl steril 10 ml,
- h. BaCl₂ 1%,
- i. H₂SO₄ 1%,
- j. Ketokonazol 2%,
- k. Tissue,
- l. Masker steril,
- m. Alumunium foil,
- n. *Hand gloves*.

III.6 Alat Penelitian

- a. *Vortex*,
- b. *Incubator*,
- c. Autoklaf,
- d. Lidi kapas steril,
- e. Bunsen,
- f. Rak tabung reaksi,
- g. Tabung tutup ulir,
- h. Ose steril,

- i. Jangka sorong,
- j. Lumpang alu,
- k. *Marker*,
- l. Pinset,
- m. Cawan petri.

III.7 Identifikasi Variabel Penelitian

III.7.1 Variabel Bebas

Ekstrak daun kemangi (*O. americanum* L.) dengan konsentrasi 10%, 12,5%, 25%, 50%.

III.7.2 Variabel Terikat

Zona hambat pertumbuhan jamur *Trichophyton rubrum*.

III.7.3 Variabel Terkendali

- a. Suhu inkubasi pada suhu kamar
- b. Waktu inkubasi 24 - 48 jam

III.8 Definisi Operasional

Tabel 2. Definisi Operasional

Variabel	Definisi	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala
Tergantung				
Ekstrak daun kemangi (<i>Ocimum americanum</i> L.) konsentrasi 10%, 12,5%, 25%, 50%	Banyaknya ekstrak daun kemangi yang terlarut dalam DMSO dengan konsentrasi berbeda	<i>Beaker glass</i>	Ekstrak daun kemangi dengan varian konsentrasi 10%, 12,5%, 25%, 50%	Rasio
Bebas				
Daya hambat terhadap jamur	Terhentinya pertumbuhan	Jangka sorong	Diameter zona hambat	Rasio

<i>Trichophyton</i>	jamur
<i>rubrum</i>	<i>Trichophyton</i>
	<i>rubrum</i>

III.9 Cara Penelitian

III.9.1 Sterilisasi Alat – Alat

Melakukan sterilisasi pada alat yang akan dipakai menggunakan *autoclave* dioperasikan selama 15-20 menit di suhu 121°C dan tekanan lima belas Psi. Alat yang sudah steril dikeringkan sebekum digunakan.

III.9.2 Peremajaan Jamur

Jamur *T. rubrum* yang digunakan untuk peremajaan diperoleh dari Lab. Parasitologi FK UPNVJ. Lalu alat dan bahan disiapkan untuk peremajaan jamur *T. rubrum*. Peremajaan dilakukan pada media SDA dengan suhu ruangan dalam waktu 48 jam.

III.9.3 Identifikasi dan Pembuatan Suspensi Jamur *T. rubrum*

Identifikasi makroskopis dilakukan setelah diinkubasi pada suhu kamar sebanyak dua pengamatan selama 24 jam untuk melihat pertumbuhan *T. rubrum* pada media SDA. Identifikasi mikroskopis dilakukan untuk memastikan pertumbuhan *T. rubrum* pada media SDA yaitu dengan menggunakan pewarnaan laktoferol.

Pembutan suspensi *T. rubrum* dengan cara koloni jamur diambil menggunakan lidi dan kapas dari media SDA lalu masukan ke dalam tabung rekasi yang berisi 10 ml NaCl 0,9% kemudian *vortex*. Jika sudah terlihat kekeruhan jamur, lalu bandingkan dengan standar 0,5 *Mc Farland* yang dimana kekeruhan tersebut memiliki konsentrasi 10⁸ CFU/ml.

III.9.4 Pembuatan Media SDA

Media SDA yang telah tersedia ditambahkan dengan 0,5 gram kloramfenikol lalu sterilisasi dengan *autoclave* pada suhu 121°C selama kurang lebih 15 menit.

Pratiwi Dwi Rivai, 2021

UJI EFEKTIVITAS EKSTRAK DAUN KEMANGI (*Ocimum americanum L.*) TERHADAP PERTUMBUHAN *Trichophyton rubrum* SECARA IN VITRO

UPN Veteran Jakarta, Fakultas Kedokteran, Program Studi Kedokteran Program Sarjana
[www.upnvj.ac.id – www.library.upnvj.ac.id – www.repository.upnvj.ac.id]

III.9.5 Pembuatan Suspensi Standar *Mc Farland*

Mencampurkan larutan 0,5 barium klorida 1% dengan larutan 9,95 mL asam sulfat 1% pada tabung reaksi, lalu kocok sampai homogen. Sehingga suspensi tersebut sama dengan 10^8 CFU/ml.

III.9.6 Pembuatan Ekstrak Daun Kemangi

Dalam pembuatan ekstrak daun kemangi (*O. americanum* L.) dilakukan di BALITRO dengan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%.

III.9.7 Pembuatan Kontrol Positif Ketokonazol

Satu tablet ketokonazol 200 mg dihancurkan menggunakan lumpang alu kemudian 2 mg dilarutkan dalam 10 ml aquades. Sehingga konsentrasi ketokonazol tersebut 2%.

III.9.8 Pembuatan Variasi Konsentrasi Larutan Ekstrak Daun Kemangi Dengan Pelarut Dimetil Sulfoksida (DMSO)

- Ekstrak daun kemangi dibagi dalam 4 *beaker glass*s dengan masing – masing volume : *beaker glass*s A = 1 ml , *beaker glass*s B = 1,25 ml , *beaker glass*s C = 2,5 ml, *beaker glass*s D = 5 ml
- Ekstrak daun kemangi kemudian dilarutkan dengan DMSO dengan masing – masing volume : *beaker glass*s A = 9 ml , *beaker glass*s B = 8,75 ml, *beaker glass*s C = 7,5 ml, *beaker glass*s D = 5 ml
- Kemudian masing masing larutan tersebut diaduk sampai homogen.
- Sehingga didapatkan konsentrasi larutan ekstrak daun kemangi dengan pelarut DMSO pada *beaker glass*s A, B, C, D secara berurutan yaitu konsentrasi 10%, konsentrasi 12,%, konsentrasi 25%, konsentrasi 50%

III.9.9 Penyiapan Larutan Ekstrak Daun Kemangi dan Larutan Kontrol

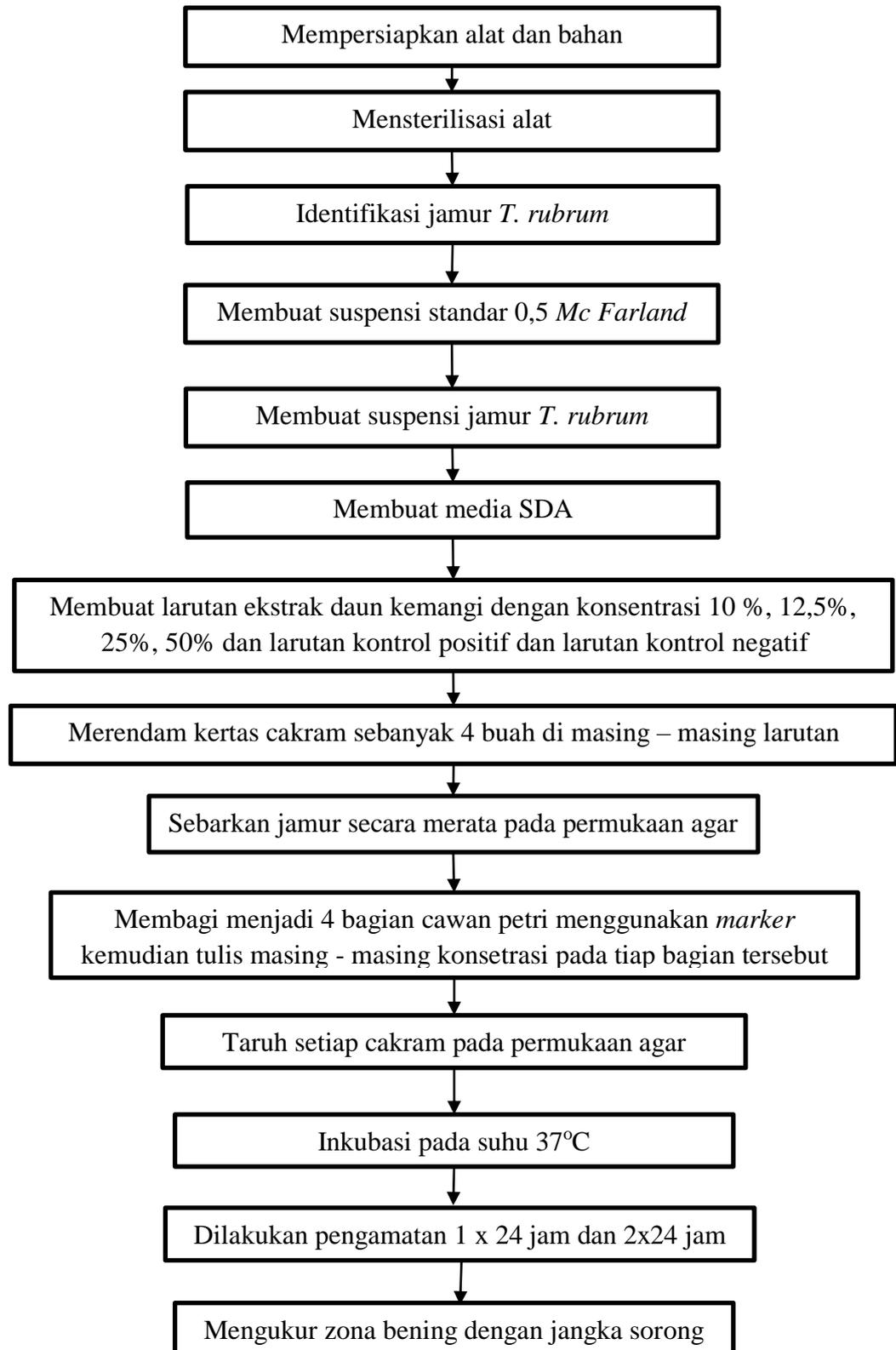
- Menyiapkan 6 *beaker glass* (A,B,C,D, kontrol negatif, kontrol positif)
- Beaker glass* A berisi senyawa uji dengan konsentrasi 10%

- c. *Beaker glass* B berisi senyawa uji dengan konsentrasi 12,5%
- d. *Beaker glass* C berisi senyawa uji dengan konsentrasi 25%
- e. *Beaker glass* D berisi senyawa uji dengan konsentrasi 50%
- f. *Beaker glass* kontrol positif berisi ketokonazol 10 ml
- g. *Beaker glass* kontrol negatif berisi DMSO 10 ml

III.9.10 Alur Penelitian

- a. Menyiapkan alat yang telah disterilisasi dengan *autoclave* dan menyiapkan bahan uji yang akan digunakan.
- b. Identifikasi jamur yang diperoleh dari Laboratorium Parasitologi FK UPNVJ pada media SDA dan sudah dilakukan peremajaan.
- c. Membuat suspensi standar *Mc Farland* dengan mencampurkan BaCl₂ 1% dengan 9,95 mL H₂SO₄ 1% kemudian homogenkan.
- d. Pembuatan suspensi *T. rubrum* dengan cara koloni jamur diambil menggunakan lidi dan kapas dari media SDA lalu masukan ke dalam tabung rekasi yang dimana terisi 10 ml NaCl 0,9% kemudian *vortex*. Jika sudah terlihat kekeruhan jamur, lalu bandingkan dengan standar 0,5 *Mc Farland* yang dimana kekeruhan tersebut memiliki konsentrasi 10⁸ CFU/ml.
- e. Media SDA yang telah tersedia ditambahkan dengan 0,5 gram kloramfenikol lalu sterilisasi dengan *autoclave* pada suhu 121°C selama kurang lebih 15 menit. Setelah masukan SDA tersebut pada cawan petri setelah itu ke dalam lemari es dengan keadaan sudah dingin.
- f. Pembuatan larutan ekstrak daun kemangi yang didapat dari BALITRO dengan konsentrasi 10%, konsentrasi 12,5%, konsentrasi 25%, konsentrasi 50%, larutan DMSO dan larutan ketokonazol 2%
- g. Masing - masing sebanyak 4 buah kertas cakram dimasukan ke dalam larutan ekstrak daun kemangi konsentrasi 10%, 12,5%, 25%, 50%, larutan kontrol positif, dan larutan kontrol negatif menggunakan pinset steril. Kemudian kertas cakram tersebut direndam <30 menit.

- h. Sebarkan suspensi jamur *Trichophyton rubrum* di permukaan SDA dengan menggunakan lidi kapas steril kemudian diratakan.
- i. Membagi menjadi 4 bagian cawan petri menggunakan *marker* kemudian tulis masing - masing konsentrasi pada tiap bagian tersebut.
- j. Masing – masing kertas cakram yang sudah direndam dalam larutan ekstrak daun kemangi, larutan kontrol positif dan kontrol negatif diambil menggunakan pinset lalu menyusunnya pada permukaan SDA.
- k. Kemudian semua cawan petri yang tersebut diinkubasi pada suhu ruangan 37°C.
- l. Setelah itu lakukan pengamatan dalam 2 x 24 jam apakah terdapat zona bening yang merupakan zona hambatan disekeliling kertas cakram.
- m. Zona bening tersebut kemudian diukur oleh jangka sorong.



Bagan 3. Alur Uji Efektivitas

III.10 Teknik Analisa Data

Penelitian ini selanjutnya dianalisa dari pengukuran diameter zona hambat yang dimasukkan dalam tabel dengan bentuk data kuantitatif berskala rasio. Data nanti akan dianalisis menggunakan aplikasi pengolahan data statistik yaitu dengan aplikasi *Statistical Product and Service Solution* (SPSS). Uji statistik penelitian ini menggunakan uji *One Way Anova*. Uji normalitas menggunakan *Shapiro-Wilk* dan uji homogenitas *Levene*. Jika data varian sama atau data homogen maka gunakan uji *One Way Anova* dengan uji *Post Hoc Bonferroni* namun jika varian tidak sama atau tidak homogen gunakan uji *One Way Anova* dengan uji *Post Hoc Tamhane's*. Dimana uji *Post Hoc* digunakan untuk mengetahui perbedaan setiap kelompok. Jika data tidak berdistribusi normal gunakan transformasi data. Namun, jika data tetap tidak berdistribusi normal maka dilakukan uji alternatif menggunakan uji *Kruskal-Wallis* dan untuk adanya perbedaan pada setiap kelompok perlakuan digunakan uji *Mann-Whitney* pada setiap perlakuan.