

BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah *True Experiment* yang menganalisis pengaruh variasi konsentrasi VCO terhadap pertumbuhan jamur *Malassezia globose*. Penelitian ini menggunakan rancangan *Posttest Only Control Group Design*, rancangan ini memungkinkan peneliti mengukur pengaruh perlakuan (interval) pada kelompok eksperimen dengan cara membandingkan kelompok tersebut dengan kelompok kontrol. Rancangan ini tidak memungkinkan peneliti untuk menentukan sejauh mana atau seberapa besar perubahan itu terjadi, sebab pretest tidak dilakukan untuk menentukan data awal (Notoatmodjo, 2018). Bentuk rancangan ini, sebagai berikut:

	Perlakuan	Posttest
R (kelompok eksperimen)	X	O2
R (kelompok kontrol)		O2

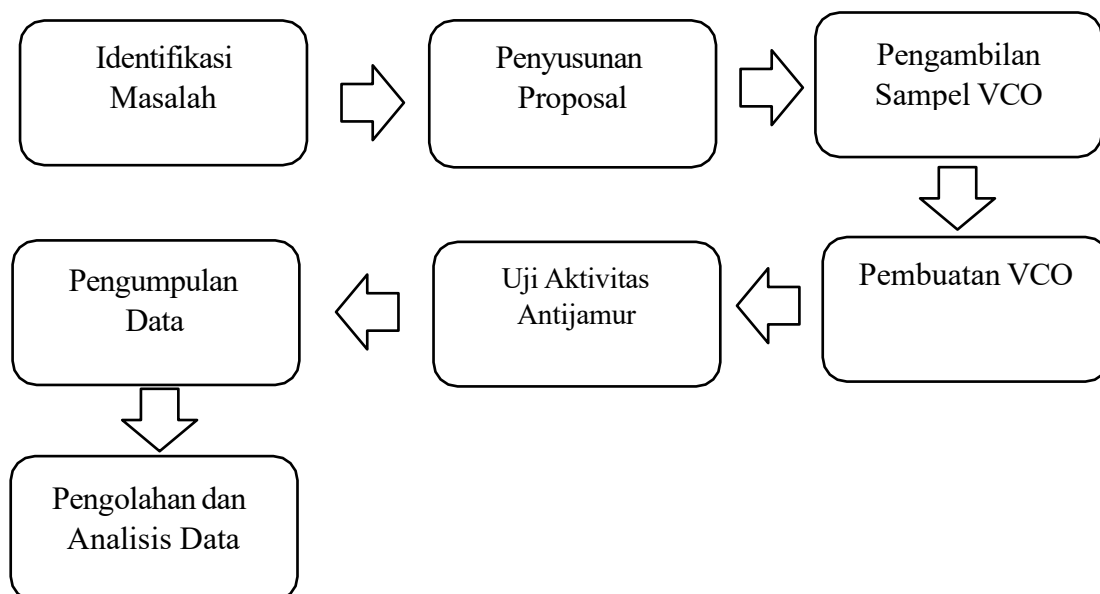
Gambar 4. Bentuk Rancangan *Posttest Only Control Group Design*

Keterangan :

X : Perlakuan

O : Hasil observasi sesudah perlakuan

B. Alur Penelitian



Gambar 5. Alur Penelitian

C. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Tempat yang digunakan dalam penelitian ini di Laboratorium Kimia dasar dan UPTD. Balai Laboratorium Kesehatan Kerthi Bali Sadhajiwa Provinsi Bali.

2. Waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Januari 2025 sampai dengan April 2025.

D. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi adalah wilayah generalisasi yang terdiri dari objek dan subjek yang memiliki kualitas dan karakteristik tertentu yang telah ditetapkan peneliti untuk dipelajari kemudian ditarik kesimpulannya. Populasi dalam penelitian ini adalah *Virgin Coconut Oil (VCO)*.

2. Sampel

a. Unit analisis

Unit analisis dalam penelitian ini yaitu diameter zona hambat pertumbuhan Jamur *Malassezia globosa*. Pada variasi konsentrasi Virgin Coconut Oil dengan empat jenis perlakuan konsentrasi yaitu 25%, 50%, 75% dan 100%. Konsentrasi ini dipilih untuk mengetahui konsentrasi yang paling efektif menghambat pertumbuhan jamur *Malassezia globosa*.

b. Besar sampel

Dari proses ekstraksi didapatkan ekstrak VCO dengan konsentrasi 100% yang digunakan sebagai stok sampel. Ekstrak VCO diuji dengan 4 perlakuan yaitu menjadi variasi konsentrasi 25%, 50%, 75%, dan 100% (v/v) yang dibuat dengan mengencerkan stok sampel menggunakan pelarut DMSO sehingga besar sampel yang dibutuhkan adalah 25 mL.

Total perlakuan dalam penelitian ini adalah 4 perlakuan. Dalam penelitian ini masing-masing perlakuan diulang dengan jumlah yang dapat ditentukan dengan rumus *Federer* berikut ini:

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

Keterangan:

r = jumlah ulangan

t = jumlah perlakuan

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

$$(4 - 1) (r - 1) \geq 15$$

$$3(r - 1) \geq 15$$

$$3r - 3 \geq 15$$

$$3r \geq 18$$

$$r \geq 6$$

Berdasarkan perhitungan tersebut, pengulangan yang dapat dilakukan dalam penelitian ini adalah lebih dari atau sama dengan enam kali. Jumlah ulangan Tingkat ketelitian pelaksanaan percobaan bergantung pada jumlah pengulangan yang diinginkan oleh peneliti terhadap kesimpulan hasil percobaan. Semakin banyak jumlah pengulangan yang dilakukan, semakin tinggi tingkat ketelitiannya (Hanafiah, 2016). Dalam penelitian ini, terdapat 4 perlakuan dan 6 kali pengulangan, sehingga akan diperoleh 24 data.

c. Teknik pengambilan sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah Virgin Coconut Oil (VCO) yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari industri rumah tangga di daerah Gianyar.

d. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan adalah Pisau, Parutan, Beaker Glass, Corong, Kertas saring, Alumunium Foil, Biological Safety Cabinet (BSC) level II, Inkubator, Mikroskop Binokuler, Mc Farland Densitometer, standar Mc Farland 0,5, Api bunsen, Cawan petri, jangka sorong, Ose, Kertas merang/koran, Cork borer, Mikropipet, Tip, Pinset, Kaca Objek, Cover Glass, Tabung reaksi,

2. Bahan

Bahan yang digunakan adalah VCO, dimetil sulfoksida (DMSO), jamur *Malassezia Globosa*, media Sabouraud Dextrose Agar (SDA), Chlorhexidine

gluconate 0,2%, akuades, BaCl₂ 1%, H₂SO₄ 1%, Etanol 70%, kalium hidroksida 10% (KOH), Blue Parker ink, Hidrogen Peroksida (H₂O₂) 3%, Kloramfenikol

3. Prosedur Kerja

a. Sterilisasi alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian telah disterilkan sebelum digunakan. Alat-alat yang terbuat dari kaca disterilkan dengan menggunakan oven selama satu jam. Sementara itu, alat-alat yang rentan rusak pada suhu tinggi disterilkan menggunakan autoklaf selama lima belas menit dengan suhu di bawah 125°C.

b. Isolasi dan identifikasi jamur *Malassezia globosa*

1) Pengambilan Sampel

Gunakan pinset yang tajam dan steril untuk memisahkan sampel rambut dan kulit kepala dari individu yang terinfeksi. Area yang terinfeksi terlebih dahulu dibersihkan dengan etanol 70%, kemudian dilakukan pengikisan menggunakan pinset steril yang dipegang pada sudut 90° terhadap kepala. Sampel kemudian ditempatkan di atas kertas sampel gelap untuk melindunginya dari paparan sinar matahari. Setiap sampel diberi label dengan nama pasien. Sampel-sampel tersebut kemudian dibawa ke laboratorium untuk dianalisis.

2) Analisis Sampel

a) Pemeriksaan Mikroskopis

Dibuat Preparat dengan kalium hidroksida 10% (KOH) yang dicampur dengan blue parker ink ditempatkan di atas kaca objek yang berisi sampel, kemudian ditutup dengan penutup kaca. Tujuan dari penambahan alkali tersebut adalah untuk mencerna keratin yang mengelilingi jamur sehingga hifa dan konidia (spora) dapat terlihat. Sampel kemudian dipanaskan di atas api Bunsen untuk menghilangkan

gelembung udara. Preparat mikroskop kemudian diamati menggunakan objektif x10 dan x40 dengan diafragma iris tertutup pada lensa kondensor. Mikroskopi langsung yang menunjukkan campuran khas dari blastokonidia globosa dan pseudoselulosa yang disertai dengan mycelium dalam bentuk "spageti" mengindikasikan perbedaan yang paling mudah diidentifikasi dari *Malassezia globosa* dibandingkan dengan spesies *Malassezia* lainnya.

b) Uji Katalase

Uji katalase dilakukan untuk memastikan keberadaan *Malassezia globosa*, karena, berbeda dengan *Malassezia restricta* yang bersifat katalase negatif, *Malassezia globosa* bersifat katalase positif. Cara kerjanya adalah sebanyak 3 ml larutan hidrogen peroksida (H_2O_2) 3% dituangkan ke dalam tabung reaksi.

Beberapa koloni jamur yang terisolasi dimasukkan ke dalam tabung reaksi menggunakan batang kaca steril. Gelembung aktif yang diamati, yang menandakan pelepasan oksigen dari H_2O_2 , menunjukkan hasil positif untuk produksi katalase.

c) Kultur Jamur

Sampel yang dikumpulkan dibiakkan pada SDA (Saboraud Dextrose Agar) yang ditambahkan dengan kloramfenikol untuk menghilangkan kontaminan bakteri dari media. Sampel yang dikumpulkan dimasukkan ke dalam cawan Petri yang berisi media menggunakan penjepit steril. Cawan Petri kemudian diberi label dan diinkubasi pada suhu ruangan ($25^{\circ}C$) selama tiga hari, kemudian hingga satu minggu untuk memperoleh pertumbuhan jamur yang optimal.

d) Pewarnaan Gram

Sediaan dari kultur murni yang diperoleh setelah dua minggu inkubasi pada suhu $32^{\circ}C$ dilakukan pewarnaan Gram. Tujuan dari prosedur ini adalah untuk

mempelajari morfologi sel ragi. Hasil tes positif yang khas mengindikasikan *Malassezia globosa*.

1) Pembuatan VCO

1. Parut 5 butir kelapa, masukkan ke dalam beaker glass kemudian ditambahkan 2,5L air hangat, tutup dengan aluminium foil.
2. Diamkan santan selama 2-3 jam hingga terbentuk dua lapisan (lapisan atas:kanil, lapisan bawah:air).
3. Air dan kanil dipisahkan dengan pengambilan kanil menggunakan sendok atau mengambil air dengan selang.
4. Kanil di tambahkan ragi (1liter kanil dengan 3gram ragi), ditutup dan di diamkan selama 24 jam.
5. Minyak dipisahkan dan di saring dari 3 lapisan (minyak, blendo dan air).
6. Masukkan ke dalam botol tertutup.

2) Pembuatan media SDA pengujian jamur *Malassezia Globosa*

1. Media dibuat dengan cara mencampurkan 7,8 gram Sabouraud Dextrose Agar (SDA) dengan konsentrasi 2,8% dalam 200 ml akuades, kemudian dipanaskan menggunakan autoklaf selama 30 menit.
2. Setelah proses pemanasan selesai, media didiamkan hingga setengah dingin, kemudian dituangkan ke dalam 4 cawan petri, masing-masing berisi 15 ml (ketebalan 4 mm), dan dibiarkan hingga mengeras.

3) Pembuatan stok variabel konsentrasi

VCO yang digunakan telah melalui proses pengenceran. Pengenceran dilakukan dengan menggunakan DMSO untuk menghasilkan konsentrasi 25%, 50%, 75%, dan 100%. Konsentrasi menggunakan %v/v dibuat dalam 10mL

- a) Konsentrasi 25%: 2,5mL VCO ditambahkan DMSO hingga 10mL
- b) Konsentrasi 50%: 5mL VCO ditambahkan DMSO hingga 10mL
- c) Konsentrasi 75%: 7,5mL VCO ditambahkan DMSO hingga 10mL
- d) Konsentrasi 100%: 10mL VCO

4) Pembuatan larutan standar McFarland

Larutan standar kekeruhan McFarland dibuat dengan mencampurkan 9,5 ml H₂SO₄ 1% dengan 0,5 ml larutan BaCl₂ 1% hingga tercampur homogen dan terlihat keruh. Kekeruhan larutan ini digunakan sebagai standar untuk dibandingkan dengan larutan suspensi jamur.

5) Pembuatan suspensi jamur

- 1. Disiapkan alat dan bahan yang digunakan
- 2. Dipipet 10 ml NaCl steril ke dalam tabung
- 3. Diambil koloni jamur dan dilakukan dengan steril (dengan bantuan api bunsen dan ose)
- 4. Dimasukkan koloni jamur kedalam tabung yang telah berisi NaCl steril
- 5. Masukkan tabung kedalam lubang densitometer (penambahan koloni jamur dilakukan hingga pembacaan pada densitometer menunjukkan angka 0,5).

6) Uji antijamur minyak kelapa murni (VCO)

1. Masing-masing variasi konsentrasi variasi konsentrasi dijenuhkan kedalam cakram disc.
2. Media SDA disediakan dalam cawan petri dengan, masing- masing cawan petri untuk diisi VCO dengan konsentrasi 25%, 50%, 75%, 100%, Chlorhexidine gluconate 0,2% sebagai kontrol positif dan DMSO sebagai kontrol negatif.
3. Menggoreskan lidi kapas steril yang berisikan suspensi bakteri 0,5 *Mc Farland Malassezia Globosa* pada permukaan media SDA, hingga tersebar merata ke seluruh permukaan media dan media ditutup kembali.
4. Memastikan permukaan media kering, kemudian menempelkan masing-masing cakram yang sudah dijenuhkan dengan VCO konsentrasi 25%, 50%, 75%, 100%, dan kontrol ditempelkan pada permukaan agar dalam plate yang sama dan ditekan perlahan dengan pinset hingga plate melekat sempurna pada permukaan media.
5. Menginkubasi media pada suhu 35°C

7) Pengamatan dan pengukuran zona hambat

Setelah masa inkubasi selesai, langkah selanjutnya adalah melakukan pengamatan dan pengukuran. Pengukuran dilakukan pada setiap zona bening, yang menunjukkan sensitivitas jamur terhadap bahan antijamur yang digunakan dalam uji, yang dinyatakan dalam bentuk diameter zona hambat. Zona hambat yang terbentuk di sekitar jamur yang diberi perlakuan dengan VCO, Chlorhexidine gluconate 0,2%, dan DMSO diukur baik diameter vertikal maupun horizontalnya menggunakan jangka sorong, dengan satuan millimeter (mm).

E. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis data

a. Data primer

Data primer merupakan data yang diperoleh melalui pengamatan langsung oleh peneliti. Data diperoleh dari eksperimen yang dilakukan di laboratorium yang diperoleh berupa data dari hasil uji pertumbuhan jamur *Malassezia globosa*.

b. Data sekunder

Data sekunder merupakan data yang diperoleh dari hasil penelitian orang lain berupa dokumentasi seperti laporan-laporan dinas kesehatan. Riset kesehatan, jurnal-jurnal pendukung yang relevan dengan penelitian ini, dan data-data lainnya.

2. Teknik pengumpulan data

Teknik pengumpulan data yang digunakan dalam penelitian ini adalah observasi dan pemeriksaan laboratorium. Observasi sendiri merupakan salah satu metode untuk mengumpulkan data yang berdasarkan suatu pengamatan yang disertai dengan pencatatan-pencatatan. Dalam penelitian ini observasi dilakukan untuk menentukan bahan alam yang akan diteliti. Sedangkan pemeriksaan laboratorium digunakan untuk memperoleh data hasil uji pertumbuhan jamur *Malassezia globosa*.

3. Instrumen pengumpulan data

Instumen penelitian merupakan alat yang digunakan untuk melakukan Dalam konteks ini, terdapat kaitan yang erat antara pendekatan penelitian yang dipilih dengan alat pengukuran yang digunakan untuk pengumpulan data. Hasil yang diperoleh dalam penelitian seringkali sangat dipengaruhi oleh kualitas alat pengukuran yang diterapkan, mengingat data yang terkumpul merupakan elemen

utama dalam proses penelitian dan menentukan kualitas hasil penelitian secara keseluruhan. Instrumen yang dipilih harus tepat untuk memperoleh data yang tepat pula. Instrumen dalam penelitian ini sebagai berikut:

- a. Alat tulis
- b. Kamera
- c. Alat untuk uji ekstrak VCO terhadap pertumbuhan jamur *Malassezia Globosa*.

F. Pengolahan dan Analisis Data

1. Teknik pengolahan data

Data yang diperoleh dicatat, dikumpulkan, diolah, dan kemudian disajikan dalam bentuk tabel dan narasi. Dalam penelitian ini, peneliti menggunakan teknik analisis data deskriptif dan kuantitatif. Proses pengolahan data bertujuan untuk menjelaskan akan menjelaskan bagaimana Ekstrak Virgin Coconut Oil (VCO) terhadap pertumbuhan jamur *Malassezia globosa*.

2. Analisis data

Berdasarkan tujuan dari penelitian ini, maka teknik analisis data yang digunakan dalam penelitian ini, sebagai berikut:

a. Uji normalitas

Uji normalitas data penting untuk dilakukan, adalah untuk melihat apakah variable pada data yang telah dikumpulkan sudah terdistribusi normal atau tidak. penelitian ini menggunakan metode statistic parametrik, sehingga uji normalitas harus dilakukan pada setiap variable data terlebih dahulu. Uji normalitas dalam penelitian ini dilakukan dengan menggunakan uji statistik Kolmogorov-Smirnov Test. Pengambilan kesimpulan didasarkan pada tingkat signifikansi 0,05, di mana

data dianggap berdistribusi normal jika nilai signifikansi lebih dari 0,05. Adapun penarikan kesimpulan dapat berpedoman pada:

- a) Nilai signifikansi $< 0,05$ berarti distribusi data tidak normal
- b) Nilai signifikansi $> 0,05$ berarti distribusi data normal.

b. One way anova

Untuk mengetahui perbedaan zona hambat pertumbuhan jamur *Malassezia globosa* dengan menggunakan VCO antara konsentrasi 25%, 50%, 75%, dan 100% apabila data berdistribusi normal digunakan uji one way anova. Hasil dinyatakan terdapat perbedaan signifikan apabila signifikansi $< 0,05$.

c. Kruskal wallis

Untuk mengetahui perbedaan zona hambat pertumbuhan jamur *Malassezia globosa* dengan menggunakan VCO antara konsentrasi 25%, 50%, 75%, dan 100% apabila data tidak berdistribusi normal digunakan uji kruskal wallis. Hasil dinyatakan terdapat perbedaan signifikan apabila signifikansi $< 0,05$.

d. LSD (Least Significant Different)

Untuk mengetahui perbedaan zona hambat antara masing-masing konsentrasi yang dapat menghambat pertumbuhan jamur *Malassezia globosa*, uji statistik yang digunakan adalah LSD (Least Significant Deference). Hasil dinyatakan terdapat perbedaan signifikan apabila signifikansi $< 0,05$.