

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian tentang pemanfaatan kunyit putih (*Curcuma mangga* Val.) pada penghambatan pertumbuhan jamur (*Candida albicans*) dan tingkat kerusakan dinding sel merupakan penelitian eksperimental yang menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan 5 perlakuan dan 4 kali ulangan. Perlakuan yang digunakan adalah kontrol (tanpa perlakuan) dan jamur yang diberi ekstrak kunyit putih dengan perbedaan konsentrasi.

3.2 Variabel Penelitian

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari 3 variabel yang meliputi :1) variabel bebas, 2) variabel terikat dan 3) variabel terkontrol. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi kunyit putih yaitu: 0,1%, 0,5%, 1,0%, 1,5% dan 2,0%. variabel terikat yang digunakan adalah pertumbuhan jamur *Candida albicans*, sedangkan variabel terkontrol adalah jenis jamur yang digunakan yaitu *Candida albicans*.

3.3 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April sampai Mei 2013 di laboratorium Mikrobiologi jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.4 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi: alat-alat gelas, Bunsen, Erlenmeyer, jarum ose, incubator, pinset, evaporator, water bath, blender, kertas saring, pengaduk, neraca analitik.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi: media padat Sabouraud Dextrose Agar, ekstrak kunyit putih, biakan jamur *Candida albicans*, kertas cakram (paper disk), plastik wrap, aquadest, kapas, larutan cat anylin, larutan cat safranin.

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Pembuatan Stok Jamur *Candida albicans*

Jamur *Candida albicans* ditanam dalam medium SDA miring, kemudian diinkubasikan pada suhu kamar selama 24-48 jam. Hasil inkubasi digunakan untuk stok jamur *Candida albicans* (Nopiyanti, 2011).

3.5.2 Pembuatan Media Pembiakan

Media yang digunakan adalah *Sabouroud Dextrose Agar* (SDA) sebanyak 19,5 g. Media tersebut dilarutkan dalam 300 mL aquades (65 g SDA per 1000 mL aquades). Kemudian dipanaskan menggunakan hot plate and stirrer sampai media tersebut matang dan homogen setelah itu dituang ke tabung reaksi masing-masing diisi dengan media sebanyak ± 15 mL dan dibiarkan sampai dingin (Murniana, 2011).

3.5.3 Sterilisasi Alat dan Bahan

Sterilisasi alat dan bahan dengan cara membungkus alat-alat dengan aluminium foil kemudian memasukkannya ke dalam autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 15 psi (*per square inchi*) selama 15 menit.

3.5.4 Pembuatan Ekstrak Kunyit Putih

Ekstrak yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak dari rhizoma kunyit putih (*Curcuma mangga* V.), rhizoma yang telah dicuci, dipotong-potong, kemudian dihancurkan dengan menggunakan blender sampai berbentuk serbuk. Serbuk rhizoma kunyit kemudian dimeserasi (direndam) dengan etanol 70% dengan perbandingan serbuk dan pelarut 200g/1000mL (Stangarlin, 2006). Selanjutnya diaduk dan dishaker dengan kecepatan 150 rpm selama 24 jam. Simplisia yang telah direndam disaring menggunakan kertas saring. Ekstrak etanol rizhoma kunyit dievaporasi dengan menggunakan evaporator pada suhu 50°C . kemudian diuapkan dengan waterbath untuk menguapkan sisa pelarut etanol. Ekstrak yang sudah diuapkan pelarutnya dan berbentuk pasta disimpan pada botol gelap pada suhu 4°C dan siap digunakan untuk uji.

3.5.5 Penentuan Zona Hambat

Suspensi jamur dibuat dari media biakan agar miring *Candida albicans*. Jamur dikerok dengan kawat ose steril dan dicelupkan ke dalam aquades steril sampai tingkat kekeruhannya sama dengan larutan standar Mc Farland 0,5. Setelah dingin atau media agak mengeras kemudian diinokulasikan suspensi jamur *Candida albicans* dengan memakai kapas yang telah disterilkan sebelumnya ke media

penanaman. Kemudian diletakkan kertas cakram yang telah dicelupkan ke dalam larutan uji. Cakram nistatin 100 ppm (kontrol positif) pada daerah yang berbeda dalam media tumbuh jamur. Cawan petri dibungkus dengan kertas buram dan dimasukkan ke dalam alat inkubator pada suhu 37°C selama 48 jam. Pertumbuhan jamur diamati untuk setiap area baik dari segi zona hambat maupun warna (Bonang dan Koeswandono, 1982).

Penentuan zona hambat dilakukan dengan cara mengamati zona terang yang berada di zona terluar kertas cakram yang mengandung ekstrak kunyit putih (*Curcuma mangga* V.) pada media agar yang telah disetrik jamur *Candida albicans*. Semakin besar zona hambat (zona terang) maka semakin besar pula kemampuan ekstrak kunyit putih untuk menghambat pertumbuhan jamur *Candida albicans*. Cara mengukur zona hambat adalah dengan mengukur zona terluar dari kertas cakram sampai pada batas terluar zona hambat dengan menggunakan jangka sorong (Bachtiar, 2012).

3.5.6 Uji Kerusakan Dinding Sel Jamur Dengan Metode Pewarnaan

Pewarnaan jamur *Candida albicans* dilakukan dalam beberapa tahap. Langkah pertama yaitu mengambil satu ose biakan jamur yang ada di medium cawan petri dan diratakan di atas kaca benda. Kemudian dikering anginkan dan difiksasi dengan Bunsen. Hal ini bertujuan agar biakan jamur melekat pada preparat. Langkah selanjutnya yaitu meneteskan kaca benda dengan larutan cat anylin crystal violet. Larutan ini memberikan warna ungu pada dinding sel. Kemudian memanaskan kaca benda yang telah ditetesi larutan tersebut diatas bunsen. Setelah itu dicuci dengan air

mengalir. Kemudian ditambahkan lagi dengan larutan cat safranin dan biarkan hingga 10-15 detik lalu kembali dicuci dengan air mengalir. Pencucian dengan air ini untuk menghilangkan kelebihan larutan yang tidak dapat diserap oleh biakan jamur. Kemudian, biakan jamur yang telah diwarnai tersebut diamati di bawah mikroskop. Kerusakan pada dinding sel ini menyebabkan zat warna crystal violet lepas atau luntur sewaktu dicuci dengan larutan pemucat (Lay, 1994).

3.6 Analisis Data

Data zona hambat pengaruh ekstrak kunyit putih (*Curcuma mangga* Val.) terhadap pertumbuhan jamur *Candida albicans* maka dapat dianalisis menggunakan one way Anova dengan uji lanjut Beda Nyata Terkecil (BNT).