

## **BAB III METODE PENELITIAN**

### **3.1. Rancangan Penelitian**

Penelitian tentang uji efektivitas jamu keputihan dengan parameter zona hambat dan tingkat kerusakan dinding sel pada jamur *Candida albicans* merupakan penelitian eksperimental yang menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan 4 ulangan dan perlakuan sebagai berikut:

P1: Tanpa perlakuan (Kontrol)

P2: Jamu Sidoarjo dengan konsentrasi 50%

P3: Jamu Sidoarjo dengan konsentrasi 100%

P4: Jamu Madura dengan konsentrasi 50%

P5: Jamu Madura dengan konsentrasi 100%

### **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 terkendali. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah jenis yaitu jamu keputihan dari Sidoarjo dengan komponen daun sirih, kunyit putih dan pinang, jamu keputihan dari Madura dengan komponen kulit delima dan sambiloto, yang termasuk variabel terikat yang digunakan adalah pertumbuhan jamur *Candida albicans*, sedangkan variabel terkendali adalah jenis jamur yang digunakan yaitu jamur *Candida albicans*.

### 3.3. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang, pada bulan Mei-Juni 2013.

### 3.4. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian meliputi: Cawan petri, Penggaris, Bunsen, Botol semprot, Erlenmeyer, Tabung reaksi, Jarum Ose, hot plate and stirrer Inkubator, Pinset, Mikroskop, Deck glass, obyek glass, autoklaf, beaker glass, micropipet.

Bahan yang digunakan dalam penelitian meliputi: medium padat agar Sabouraud Dekstrosa, medium PDB (Potato Dextrose Broth), jamu keputihan dari Sidoarjo dan Madura, suspensi jamur *Candida albicans*, Kertas cakram (Paper disk), Plastik wrap, Alkohol 70 %, kapas, larutan cat anylin crystal violet, larutan cat safranin, aquades dan aluminium foil.

### 3.5. Prosedur Penelitian

#### 3.5.1. Pembuatan Media

➤ Media SDA (*Sabouroud Dextrose Agar*)

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  $\pm 15$  mL dan dibiarkan sampai dingin (Murniana, 2011).

➤ Media PDB (*Potato Dextrose Broth*)

Media yang digunakan adalah PDB manual. Bahan yang dibutuhkan yaitu kentang sebanyak 200 g, aquades sebanyak 1000 mL, dan dextrose sebanyak 20 g. Pertama yaitu mengupas kentang dan membersihkannya, lalu memotongnya seperti dadu kecil-kecil. Kemudian memasaknya dalam 1000 mL aquades sampai volume menjadi 500 mL. Selanjutnya menyaring ekstrak kentang dan mengambil filtratnya. Setelah itu memasukkan dextrose dan aquades 1000 mL, kemudian memanaskannya sampai mendidih dan homogeny (Tim penyusun, 2011).

### 3.5.2. Sterilisasi Alat dan Bahan

Apabila pembuatan media telah selesai maka setelah itu disterilisasi bersama-sama dengan cawan petri, aquades dan paper disk dalam autoklaf pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit (Murniana, 2011).

### 3.5.3. 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). Selain itu jamur *Candida albicans* juga ditanam dalam media cair PDB (*Potato Dextrose Broth*), kemudian diinkubasi selama 7 hari pada suhu kamar. Hasil inkubasi digunakan untuk uji seri pengenceran.

#### 3.5.4. Uji Zona hambat

Uji zona hambat dilakukan dengan metode dilusi atau uji seri pengenceran tabung, menggunakan 10 tabung reaksi steril (setiap tabung diisi dengan aquades steril sebanyak 9 mL) dengan interval pengenceran 10 kali secara aseptis, yaitu diambil 1 mL suspensi jamur *Candida albicans* dari media Potato Dextrose Broth (PDB) dengan menggunakan micropipet. Suspensi jamur *Candida albicans* sebanyak 1 mL diencerkan dari tabung 1 ke tabung 2 dipindah ke tabung 3, dan seterusnya sampai tabung 10. Setelah itu hasil pengenceran tersebut dituang ke cawan petri yang telah disterilkan sebelumnya dan ditambahkan media SDA di atasnya lalu ditunggu sampai padat. Apabila media telah padat, maka selanjutnya memasukkan paper disk yang telah direndam dengan jenis jamur dan konsentrasi berbeda selama 30 menit. Kemudian diinkubasi 24-48 jam pada suhu 37°C dan diamati zona hambatnya (Bonang dan Koeswandono, 1982).

Penentuan zona hambat dilakukan dengan cara mengamati zona terang yang berada di zona terluar kertas cakram yang mengandung jamur keputihan pada media agar yang telah disetrik jamur *Candida albicans*. Semakin besar zona hambat (zona terang) maka semakin besar pula kemampuan jenis jamur keputihan 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 atau penggaris (Murniana, 2011).

#### 3.5.5. 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 anyelin 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 dibawah mikroskop. Kerusakan pada dinding sel ini menyebabkan zat warna crystal violet lepas atau luntur sewaktu dicuci dengan larutan pemucat (Lay, 1994). Apabila dinding sel dalam kondisi baik maka akan berwarna ungu namun apabila dinding sel rusak maka akan berwarna pucat atau tidak berwarna ungu. Semakin besar kerusakan dinding sel maka warnanya akan semakin pucat apabila dibandingkan dengan kontrol.

### **3.6. Analisis Data**

Zona hambat yang telah dihitung dianalisis menggunakan uji Anava tunggal. Apabila  $F_{hitung} > F_{tabel}$  maka dilakukan uji lanjut dengan BNT  $\alpha 0,01$ .