

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Tempat penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biologi FKIP Universitas Pasundan. Waktu penelitian dilaksanakan pada bulan Mei 2017.

B. Metode Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode Eksperimen. Penelitian eksperimen merupakan penelitian dimana variable yang hendak diteliti (variable terikat) kehadirannya sengaja ditimbulkan dengan memanipulasi menggunakan perlakuan sesuai dengan kebutuhan.

C. Desain Penelitian

Desain yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan Kirby-Bauer, yaitu metode difusi dengan menggunakan kertas cakram. Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap, penempatan perlakuan secara acak dengan undian (Tabel 3.1). Perbandingan ekstrak kamboja putih yang digunakan pada penelitian ini yaitu konsentrasi 10%, 25%, 40%, 55% dan kontrol dengan aquadest. Banyaknya pengulangan yang dilakukan diperoleh dari penghitungan dengan rumus dibawah ini.

Untuk mendapatkan data yang valid dilakukan pengulangan sesuai rumus (Suhaerah, 2014) :

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

r = replikasi (banyak pengulangan)

t = treatment (perlakuan)

Dalam hal ini ada 5 perlakuan sehingga:

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

$$(5 - 1) (r - 1) \geq 15$$

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

$$4 r - 4 \geq 15$$

$$4r \geq 15 + 4$$

$$4r \geq 19$$

$$r \geq 4,75$$

$$r \geq 5$$

Jadi banyaknya pengulangan yang dilakukan pada penelitian ini adalah sebanyak 5 kali.

Tabel 3.1. Tata Letak Perlakuan Konsentrasi Ekstrak Daun Kamboja

Q1	A2	B3	Q4	B5
B2	D4	C2	A4	C5
C4	Q2	D5	C1	D1
A1	B1	Q3	D2	A5
D3	C3	A3	B4	Q5

Keterangan :

Q = Kontrol (Aquadest) B = Konsentrasi Ekstrak 25% D = Konsentrasi Ekstrak 55%

Q1 = Pengulangan 1

B1 = Pengulangan 1

D1 = Pengulangan 1

Q2 = Pengulangan 2

B2 = Pengulangan 2

D2 = Pengulangan 2

Q3 = Pengulangan 3

B3 = Pengulangan 3

D3 = Pengulangan 3

Q4 = Pengulangan 4

B4 = Pengulangan 4

D4 = Pengulangan 4

Q5 = Pengulangan 5

B5 = Pengulangan 5

D5 = Pengulangan 5

A = Konsentrasi Ekstrak 10%

C = Konsentrasi Ekstrak 40%

A1 = Pengulangan 1

C1 = Pengulangan 1

A2 = Pengulangan 2

C2 = Pengulangan 2

A3 = Pengulangan 3

C3 = Pengulangan 3

A4 = Pengulangan 4

C4 = Pengulangan 4

A5 = Pengulangan 5

C5 = Pengulangan 5

D. Subjek Dan Objek Penelitian

Subjek dan objek penelitian ini mencakup beberapa hal, diantaranya yaitu :

1. Subjek Penelitian

Subjek penelitian yaitu bakteri *Ralstonia solanacearum*

a. Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah bakteri *Ralstonia solanacearum* yang diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman dan Sayuran (BALITSA). Isolat diambil sebanyak 1 mata jarum ose penuh dimasukkan ke dalam 10 ml media BHL dan diencerkan secara seri sampai dengan pengenceran 10^8 . Kemudian kekeruhan isolat cair bakteri dibandingkan dengan suspensi standar McFarland pada latar belakang hitam. Standar 0,5 McFarland memiliki kekeruhan sebanding dengan $1,5 \times 10^8$ colony forming unit (CFU)/ml.

b. Sample

Sedangkan yang dijadikan sample sejumlah 25 buah cawan petri yang akan dijadikan media pertumbuhan bakteri *Ralstonia solanacearum* berdasarkan standar 0,5 McFarland dengan perkiraan densitas sel sebesar $1,5 \times 10^8$ cfu/ml Sehingga jumlah seluruh sample $1,5 \times 10^8$ cfu/ml \times 25 = $37,5 \times 10^8$ cfu/ml

2. Objek Penelitian

Objek penelitian yaitu zona hambat pertumbuhan bakteri *Ralstonia solanacearum*

E. Operasional Variable

Penelitian ini terdapat dua variable, yaitu satu variable bebas dan satu variable terikat seperti yang terdapat pada tabel dibawah ini :

Tabel 3.2. Operasional Variable Terdiri dari Variable Bebas dan Terikat

No.	Variabel	Konsep Variabel/Dimensi	Ukuran/Skala
Variabel Terikat			
1	Bakteri <i>Ralstonia solanacearum</i>	Zona Inhibisi yang terbentuk ditandai dengan daerah jernih pada cakram kertas yang telah diberi Ekstrak Kamboja pada medium biakan bakteri.	Diameter Zona Inhibisi (mm)
Variabel Bebas			
1	Ekstrak Daun Kamboja (<i>Plumeria acuminata</i> W.T.Ait)	Hasil maserassi menggunakan pelarut Etanol 70% dengan perbandingan konsentrasi 10%, 25%, 40%, dan 55%.	Persentase Konsentrasi Ekstrak (%)

F. Rancangan Pengumpulan Data dan Instrumen Penelitian

Data diperoleh setelah melakukan pengamatan dengan cara mengukur zona inhibisi yang terbentuk pada daerah yang mengelilingi kertas cakra menggunakan jangka sorong.

Tabel 3.3. Instrumen Penelitian

Pertanyaan Penelitian	Sifat	Perolehan Data		Cara Perolehan Data	Waktu	Jenis Instrumen
		Sumber	Jenis			
Apakah ekstrak daun kamboja dapat menghambat pertumbuhan bakteri <i>Ralstonia solanacearum</i> ?	Utama	Subjek (Bakteri)	Informasi setelah perlakuan	Pengamatan	Selama Perlakuan	Uji Difusi

Tabel 3.4. Pengamatan Diameter Zona Inhibisi pada Ekstrak Daun Kamboja Putih

	Konsentrasi	Diameter Zona Hambat (mm)					Rata-rata (mm)
		Pengulangan					
		1	2	3	4	5	
Ekstrak Kamboja	A (10%)						
	B (25%)						
	C (40%)						
	D (55%)						
Kontrol (Aquadest) (Q)							

Keterangan :

Q = Kontrol (Aquadest)

A = Konsentrasi Ekstrak 10%

B = Konsentrasi Ekstrak 25%

C = Konsentrasi Ekstrak 40%

D = Konsentrasi Ekstrak 55%

G. Rancangan Analisis Data

Data diameter hambatan terlebih dahulu dianalisis melalui uji prasyarat normalitas dan homogenitas untuk mengetahui apakah data sudah tersebar dengan normal dan homogen, bila data telah signifikan kemudian dilakukan analisis

varian satu arah (Anava One Way) dengan selang kepercayaan 5% dan dilanjutkan dengan uji menggunakan BNT . Tetapi bila data tidak normal dan tidak homogen maka analisis data menggunakan uji *Mann-Whitney* dan dilakukan uji lanjutan yaitu dengan uji *Krusikal-Wallis* untuk mengetahui letak perbedaan antar perlakuan konsentrasi. Analisis dibantu dengan menggunakan *SPSS versi 16 for Windows*.

H. Langkah-langkah Penelitian

1) Identifikasi Tanaman Kamboja

Tanaman Kamboja yang akan digunakan dilakukan identifikasi terlebih dahulu. Proses identifikasi dilakukan di Laboratorium Biologi FKIP Universitas Pasundan, Kabupaten Bandung, Jawa Barat.

2) Tahap Persiapan

- a. Mempersiapkan alat dan bahan yang diperlukan dalam penelitian

Tabel 3.5. Daftar Peralatan Penelitian

No	Nama Alat	Spesifikasi	Jumlah
1.	Cawan Petri	Kaca	13
2.	Pipet Tetes	Kaca	2
3.	Jangka Sorong	Besi	1
4.	Ose	Besi	2
5.	Rotary Evaporator	Besi	1
6.	Inkubator	Besi	1
7.	Tabung Erlenmeyer 1 L	Kaca	3
8.	Tabung Erlenmeyer 250 ml	Kaca	5
9.	Toples Kaca	Kaca	1
10.	Bunsen	Kaca	2
11.	Autoclaf	Besi	1

Tabel 3.6. Daftar Bahan Yang Diperlukan

No	Nama Bahan	Spesifikasi	Jumlah
1.	Cakram Kertas	Kertas	30 Buah
2.	Kertas Saring	Kertas	5 Lembar
3.	Alumunium Voil	Alumunium	Secukupnya
4.	Biakan Bakteri	Ralstonia solanacearum	Secukupnya
5.	Ekstrak Kamboja	Larutan	300 ml
6.	Etanol 70%	Larutan	1 L
7.	Aquadest	Larutan	1 L
8.	Nutrient Agar	Agar-Agar	30 gram

b. Sterilisasi Alat

Semua alat yang terbuat dari kaca dicuci bersih dan dikeringkan kemudian disterilkan dalam autoclaf dengan suhu 121° C selama 15 menit. Alat-alat berbahan plastik dicuci dan dikeringkan kemudian diulas alkohol 70%.

3) Tahap Pelaksanaan

a. Ekstraksi

Daun kamboja sebanyak 50 gram dicuci sampai bersih agar kotoran-kotoran seperti debu yang menempel pada daun kamboja berbunga putih (*Plumeria acuminata* W.T.Ait) tersebut hilang. Selanjutnya sampel daun kamboja dikeringkan tanpa terkena sinar matahari. Sampel daun kamboja yang telah kering kemudian dibuat serbuk dengan cara diblender agar ukuran menjadi lebih kecil sehingga dapat memperluas kontak dan meningkatkan daya interaksinya dengan pelarut. Ekstraksi dilakukan secara maserasi dengan pelarut etanol 70% ditutup lalu disimpan di ruang gelap selama tiga hari. Setelah itu, filtrat disaring menggunakan kertas Watmen No 1. Kemudian dilakukan pemekatan dengan menggunakan rotary evaporator pada suhu $\pm 40^{\circ}\text{C}$. Setelah itu dilakukan

pengenceran menggunakan aquadest untuk mendapatkan konsentrasi 10%, 25%, 40%, 55% dan kontrol menggunakan aquadest.

Hasil masserasi ekstrak etanol daun kamboja sebesar 100 ml, pembuatan konsentrasi ekstrak daun kamboja menggunakan rumus presentase melalui pelarut aquades, yaitu dengan rumus :

$$V_p \cdot K_p = V_e \cdot K_e$$

Keterangan :

V_p = Volume larutan pekat

K_p = Konsentrasi larutan pekat

V_e = Volume larutan encer

K_e = Konsentrasi larutan encer

(Suhara, 2013, hlm 44)

- Konsentrasi ekstrak daun kamboja putih 10%
Pembuatan konsntrasi ekstrak daun kamboja putih 10% adalah dengan melarutkan 10 ml ekstrak pekat daun kamboja ke dalam 90 ml aquades steril.
- Konsentrasi ekstrak daun kamboja putih 25%
Pembuatan konsntrasi ekstrak daun kamboja putih 10% adalah dengan melarutkan 25 ml ekstrak pekat daun kamboja ke dalam 75 ml aquades steril.
- Konsentrasi ekstrak daun kamboja putih 40%
Pembuatan konsntrasi ekstrak daun kamboja putih 10% adalah dengan melarutkan 40 ml ekstrak pekat daun kamboja ke dalam 60 ml aquades steril.
- Konsentrasi ekstrak daun kamboja putih 55%
Pembuatan konsntrasi ekstrak daun kamboja putih 10% adalah dengan melarutkan 55 ml ekstrak pekat daun kamboja ke dalam 45 ml aquades steril.

b. Pembuatan Media Tumbuh Bakteri

Natrium Agar (NA) merupakan media penyubur padat yang digunakan dalam pembuatan media tumbakteri. Sebelumnya Natrium Agara (NA) serbuk sebanyak 15 grm ditimbang menggunakan neraca analitik dan mengukur aquades steril sebanyak 500 ml dengan gelas ukur. NA dan aquades steril dimasukkan dalam tabung erlenmeyer dan diaduk menggunakan hot plate strirer hingga menjadi larutan yang homogen. Setelah itu ditutup dengan kapas dan disterilkan dalam autoclaf dengan suhu 121°C selama 15 menit.

4) Tahap Perlakuan

Uji Aktivitas Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan cara difusi. Sebanyak satu ose bakteri dari stok biakan *Ralstonia solanacearum* diambil lalu diinokulasikan di atas media nutrient agar (NA) beku dalam cawan petri dan disebar dengan tongkat penyebar. Lima buah cakram kertas masing-masing dicelupkan pada konsentrasi 10%, 25%, 40%, 55% larutan ekstrak kamboja dan aquasdest sebagai kontrol. Kertas cakram tersebut ditempelkan di atas permukaan agar. Semua media diinkubasi pada suhu 27⁰-29⁰C dalam inkubator selama 3x24 jam.

5) Tahap Pengamatan

Pengukuran Diameter Zona Hambat

Setelah dilakukan proses inkubasi selama 3x 24 jam, maka dilakukan pengamatan ukuran diameter zona hambat yaitu daerah yang tidak terdapat pertumbuhan vakteri. Pengukuran diameter dilakukan dengan menggunakan jangka sorong manual dengan ketelitian 0,01 mm. Diamter zona hambat dikukur dari tepi (break poin) ke tepi (break point) zona hambat yang bersebrangan melewati pusat cakram kertas. Jika tidak terdapat zona hambat disekitar cakram kertas, maka nilai zona hambat dikatakan 0.00 mm (Hudzicki dalam Putra, 2016, hlm 28).