

BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian kuantitatif dengan desain penelitian eksperimen sungguhan (*True Experiment*) dengan bentuk *Posttest-Only Control Group Design*. Menurut (Sugiyono, 2020), desain True Experiment dengan bentuk *Posttest-Only Control Group Design* adalah salah satu metode eksperimental yang menggunakan dua kelompok: kelompok eksperimen dan kelompok kontrol, di mana perlakuan hanya diberikan kepada kelompok eksperimen, sementara kelompok kontrol tidak diberikan perlakuan. Pada penelitian uji aktivitas antibakteri jamur endofit terhadap *Staphylococcus aureus*, desain ini dapat diterapkan dengan membagi sampel menjadi tujuh kelompok (5 isolat jamur endofit sebagai kelompok eksperimen dan 2 kontrol: positif dan negatif).

Tabel 2
Posttest Only Control Group Design

Kelompok	Perlakuan	Posttest
R1	X	O1
R2	-	O2

Sumber: (Sugiyono, 2020)

Keterangan:

R1 = Kelompok Eksperimen

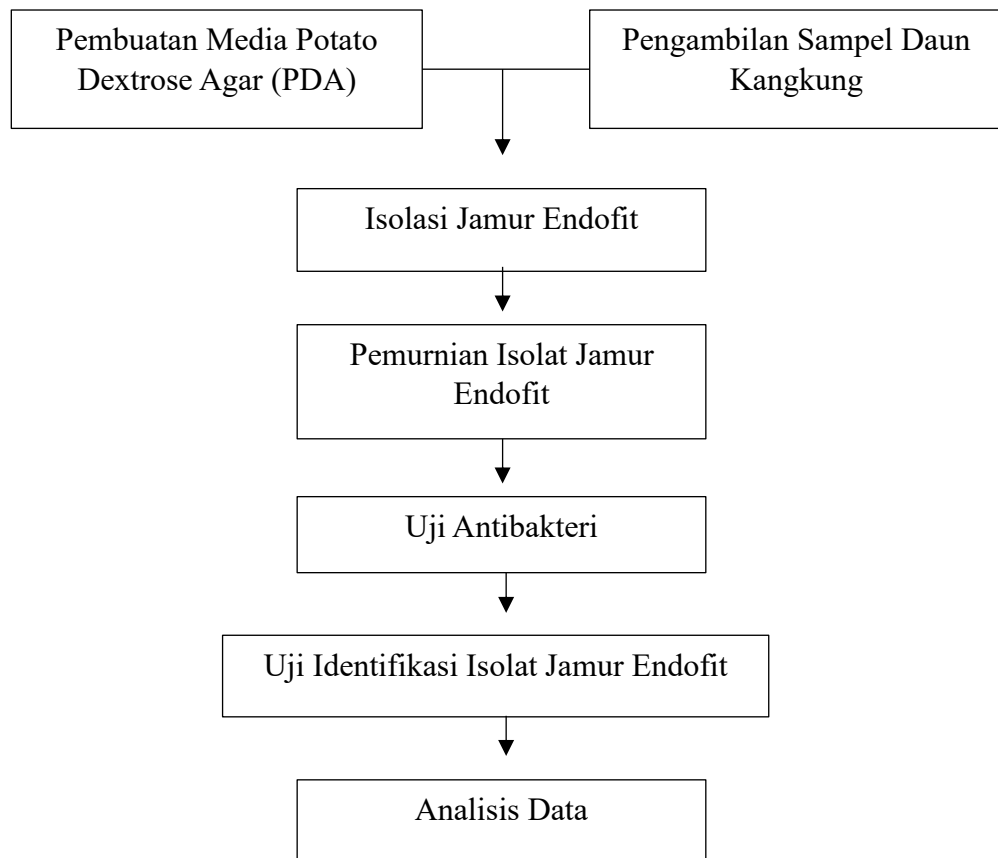
R2 = Kelompok Kontrol

X = Perlakuan Isolat Jamur Endofit dengan eksperimen

O1 = Posttest Pada Kelompok Eksperimen

O2 = Posttest Pada Kelompok Kontrol

B. Alur Penelitian



Gambar 7 Alur penelitian

C. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, dan Laboratorium Mikologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Politeknik Kesehatan Denpasar

2. Waktu penelitian

Penelitian ini dilaksanakan mulai pada bulan Oktober 2024 hingga maret 2025. Penelitian dimulai dari penyusunan proposal hingga penyusunan skripsi

D. Populasi dan Sampel

1. Unit analisa

Unit analisis pada penelitian ini ialah isolat jamur endofit yang diperoleh dari tanaman kangkung darat (*Ipomoea reptans*). Penelitian ini berfokus pada karakterisasi aktivitas antibakteri dari isolat jamur endofit tersebut terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*. Dengan demikian, setiap isolat jamur endofit yang diisolasi akan dianalisis untuk menentukan kemampuannya dalam menghambat pertumbuhan bakteri, yang diukur melalui diameter zona hambat yang dihasilkan. Selain itu, penelitian ini juga mencakup kontrol positif dan kontrol negatif untuk memastikan validitas hasil yang diperoleh,

2. Sampel penelitian

Sampel penelitian yang dipakai pada penelitian ini ialah jamur endofit yang diisolasi dari tanaman kangkung darat (*Ipomoea reptans*) dan bakteri *Staphylococcus aureus*. Jamur endofit dipilih karena kemampuannya untuk

hidup di dalam jaringan tumbuhan tanpa mengakibatkan penyakit, serta potensi antibakterinya yang belum sepenuhnya dieksplorasi. Tanaman kangkung darat dipilih sebagai sumber isolat karena merupakan tanaman yang umum dan mudah diakses. Bakteri *Staphylococcus aureus* digunakan sebagai target dalam pengujian aktivitas antibakteri, mengingat bakteri ini merupakan patogen yang sering mengakibatkan manusia terinfeksi. Dengan menggunakan sampel ini, penelitian bertujuan untuk mengevaluasi efektivitas jamur endofit dalam menghambat pertumbuhan bakteri, yang dapat memberikan kontribusi penting dalam pengembangan alternatif antimikroba.

3. Jumlah besar sampel

Dalam penelitian ini, jumlah besar sampel yang digunakan terdiri dari isolat jamur endofit, dengan target isolat jamur endofit sebanyak 5 dipilih dari isolat koloni yang terbanyak. Selain itu, penelitian ini juga mencakup kontrol positif dan kontrol negatif, sehingga total jumlah sampel yang digunakan adalah 7. Untuk menentukan jumlah pengulangan yang diperlukan, kita dapat memakai rumus $(t-1)(r-1) \geq 15$, di mana t adalah jumlah perlakuannya. Dalam hal ini, $t=7$ (5 isolat jamur endofit + 2 kontrol).

Berikut jumlah pengulangan (r):

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

Substitusi nilai t :

$$(7-1)(r-1) \geq 15$$

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

$$r - 1 \geq 2.5$$

$$r \geq 3.5$$

Karena jumlah pengulangan harus berupa bilangan bulat, maka r harus minimal 4. Dengan demikian, jika kita menggunakan 7 perlakuan (5 isolat jamur endofit + 2 kontrol), maka jumlah besar sampel yang diperlukan adalah:

$$t \times r = 7 \times 4 = 28$$

Jadi, total jumlah besar sampel yang dimanfaatkan pada penelitian ini adalah 28.

4. Metode pengambilan sampel

Pengambilan sampel untuk penelitian uji aktivitas antibakteri jamur endofit dari daun kangkung di perkebunan Desa Bongkasa dilakukan menggunakan metode random sampling dengan pengundian. Perkebunan dibagi menjadi beberapa area, dan tanaman kangkung yang sehat, bebas penyakit, serta memenuhi kriteria dipilih secara acak dengan undian. Dari setiap tanaman terpilih, beberapa helai daun yang sehat diambil menggunakan gunting steril, khususnya dari bagian tengah hingga atas tanaman, untuk memastikan keberadaan jamur endofit. Sampel daun kemudian masukkan ke kantong plastik steril, diberikan label, dan dilakukan penyimpanan ke dalam cooler box pada suhu $\pm 4^{\circ}\text{C}$ untuk menjaga kualitas hingga proses isolasi di laboratorium dilakukan. Metode ini memastikan sampel representatif, bebas kontaminasi, dan sesuai untuk menguji aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*.

5. Alat dan bahan

a. Alat:

Autoklaf, Inkubator, Laminar Air Flow (LAF), Cawan petri, Pipet mikropipet, Oase steril, Cork-borer steril, Pisau bedah steril, Timbangan analitik, Bunsen, Jangka sorong.

b. Bahan:

Media kultur (MHA) Muller Hilton Agar dan PDA (Potato Dextrose Agar), Aquadest, Daun Kangkung, Air steril, Bakteri *Staphylococcus aureus*, Antibiotik Kloramfenikol, alcohol 70%, natrium hipoklorit (NaOCl) 2%

6. Prosedur Kerja

a. Pembuatan media:

Prosedur yang sama digunakan untuk membuat setiap media, dimulai dengan penggunaan pengaduk magnet untuk mencampur bahan, dilanjutkan dengan sterilisasi dan inkubasi. Autoklaf digunakan untuk mensterilkan bahan selama 20 menit pada suhu 121 derajat Celcius. Sedangkan media diinkubasi selama 24 jam di bawah sinar UV. Adapun media yang digunakan adalah sebagai berikut:

1. Potato Dextrose Agar (PDA): pembuatan media PDA dengan mencampur 39 g bubuk PDA dengan satu liter aquadest. Kemudian panaskan larutan di atas hotplate atau kompor sambil diaduk perlahan hingga mendidih. Pastikan larutan benar-benar homogen dan tidak ada gumpalan kemudian pindahkan media ke cawan petri.

2. Media MHA (Muller Hilton Agar): MHA dibuat dengan melarutkan campuran komposisi standar, yaitu 38 gram serbuk MHA dalam 1 liter aquadest. Larutan ini diaduk hingga homogen, setelah itu dipanaskan dengan hot plate atau pemanas sambil terus diaduk sampai mendidih untuk melarutkan semua komponen. Setelah itu, larutan disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Sesudah sterilisasi, media didinginkan sampai sekitar 45-50°C, lalu dituang ke dalam cawan petri steril dengan ketebalan sekitar 4 mm. Media dibiarkan mengeras pada suhu ruang dan disimpan dalam kondisi steril jika tidak langsung digunakan.

b. Isolasi jamur:

Teknik pencucian untuk isolasi jamur endofit. Untuk mengisolasi jamur endofit, daun dibersihkan agar permukaannya steril. Hal ini dilakukan dengan harapan jamur yang berkembang adalah jamur asli jaringan daun. Isolasi jamur endofit dilakukan dengan *Laminar Air Flow Cabinet* (LAFC) dalam kondisi aseptik (Aji, Sari and Putri, 2022). Alkohol 70% digunakan untuk mensanitasi alat isolasi yaitu gunting dan pinset Steinlis, kemudian dipanaskan di atas bunsen beberapa saat. Daun tanaman kangkung segar yang sehat dibersihkan dengan air mengalir pada tahap pertama isolasi. Dilanjutkan dengan memasukkan ke alkohol 70% selama 1 menit, natrium hipoklorit 2% selama tiga puluh detik, dan air suling steril selama satu menit. Daun tersebut kemudian ditaruh di atas tisu steril hingga kering atau dibiarkan dikering dalam LAFC. Setelah kering daun dipotong $\pm 1 \text{ cm}^2$ pada kondisi aseptis dan ditanam dalam cawan petri yang berisi media PDA (Angelin *et al.*, 2022).

c. Pemurnian jamur:

Pada LAFC, kondisi aseptik digunakan untuk memurnikan setiap koloni jamur yang tumbuh pada media PDA ke media PDA baru. Pemurnian dilakukan berdasarkan kenampakan morfologi makroskopis koloni jamur, meliputi warna dan bentuknya. Jarum lingkaran digunakan untuk menghilangkan setiap bakteri, yang kemudian ditumbuhkan kembali dalam cawan petri yang berisi media PDA. Jika jamur yang berkembang masih tercampur dengan jamur lain setelah pemurnian, pemurnian dilanjutkan hingga diperoleh jamur murni.

d. Uji antibakteri:

Uji antibakteri jamur endofit terhadap *Staphylococcus aureus* menggunakan metode Agar Plug atau metode difusi keping agar. Jamur endofit murni yang sudah tumbuh akan di lubangi dan diambil beserta medianya dengan cork-borer steril. Kemudian media jamur tersebut akan dipindahkan ke media MHA yang sudah dilubangi dan sudah berisi supensi bakteri, lalu diinkubasi selama 24-48 jam (Rumalolas, Kotala and Allifah, 2024). Selanjutnya mengamati zona hambatan yang berkembang. Jangka sorong digunakan untuk mengukur diameter zona hambat pertumbuhan. Jika isolat jamur endofit positif mempunyai zona hambat, maka isolat tersebut mungkin berpotensi dapat menghasilkan bahan kimia antibakteri (Aji, Sari and Putri, 2022). Penanaman kontrol positif dan kontrol negatif juga diperlakukan sama yaitu dengan membuat Media PDA atau MHA yang di tambahkan antibiotik kloramfenikol untuk kontrol positif dan media tanpa antibiotik untuk kontrol negatif.(Azizah, Rachmawati and Hidayah, 2021)

E. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis data

Jenis data yang akan digunakan dalam penelitian ini terutama terdiri dari data kuantitatif, yang berfokus pada pengukuran diameter zona hambat yang dihasilkan oleh isolat jamur endofit terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Data kuantitatif ini sangat penting karena akan memungkinkan peneliti untuk melakukan analisis statistik yang diperlukan untuk menentukan apakah terdapat perbedaan yang signifikan dalam aktivitas antibakteri antara berbagai isolat jamur endofit yang diuji, serta untuk membandingkan hasil tersebut dengan kontrol positif dan kontrol negatif yang telah ditetapkan dalam penelitian. Dengan demikian, fokus pada data kuantitatif ini akan memberikan wawasan yang mendalam mengenai potensi jamur endofit sebagai agen antibakteri yang dapat dimanfaatkan dalam pengembangan produk antimikroba.

2. Teknik pengumpulan data

Teknik pengumpulan data dalam penelitian ini difokuskan pada pengukuran zona hambat yang dihasilkan oleh isolat jamur endofit terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Untuk mendapatkan hasil yang akurat, diameter zona hambat ini diukur menggunakan jangka sorong, yang merupakan alat ukur yang tepat dan sensitif. Penggunaan jangka sorong memungkinkan untuk mendapatkan pengukuran yang lebih presisi dalam milimeter, sehingga data yang diperoleh dapat dianalisis secara statistik untuk menentukan efektivitas aktivitas antibakteri dari masing-masing isolat jamur endofit. Dengan demikian,

teknik pengumpulan data ini tidak hanya memberikan informasi kuantitatif yang penting, tetapi juga mendukung tujuan penelitian untuk mengevaluasi potensi jamur endofit sebagai agen antibakteri.

F. Pengolahan dan Analisis Data

1. Pengolahan data

Pengolahan data yang digunakan dalam penelitian ini dilakukan dengan memanfaatkan perangkat lunak statistik SPSS (Statistical Package for the Social Sciences), yang merupakan alat yang sangat efektif untuk analisis data kuantitatif. Setelah data mengenai diameter zona hambat yang diukur dari isolat jamur endofit dikumpulkan, langkah pertama adalah memasukkan data tersebut ke dalam program SPSS untuk memudahkan analisis. Dengan menggunakan SPSS, peneliti dapat melakukan berbagai analisis statistik, seperti uji T untuk membandingkan rata-rata diameter zona hambat antara kelompok isolat jamur dan kontrol, serta analisis varians (ANOVA) jika terdapat lebih dari dua kelompok yang dibandingkan. (Baidowi, 2024)

2. Analisis data

Dalam penelitian ini, analisis data yang digunakan dengan metode SPSS. Data yang diperoleh dari hasil penelitian akan dilakukan uji normalitas dengan Uji normalitas *Kolmogorov-Smirnov* (K-S). Uji *Kolmogorov-Smirnov* adalah salah satu metode statistik yang digunakan untuk menguji apakah data dalam penelitian berdistribusi normal dengan jumlah sampel kurang dari 50. Dalam konteks penelitian seperti uji aktivitas antibakteri, uji ini dilakukan untuk memastikan bahwa data (misalnya, diameter zona inhibisi dari beberapa isolat

jamur endofit) memenuhi asumsi distribusi normal, yang menjadi syarat penting untuk analisis statistik non parametris seperti Kruskal-Wallis karena nilai uji normalitas K-S p kurang dari atau sama dengan 0,05, data dianggap tidak normal. Uji ini membandingkan distribusi kumulatif data sampel dengan distribusi kumulatif dari distribusi normal teoretis. Pada hasil uji Kruskal-Wallis didapatkan nilai hasil P kurang dari 0,05 maka terdapat perbedaan yang bermakna dan dilanjutkan dengan uji *Post-hoc* untuk melihat kelompok-kelompok yang memiliki nilai yang signifikan.

G. Etika penelitian

Etika penelitian merupakan seperangkat prinsip moral yang harus dipatuhi oleh para peneliti dalam melaksanakan penelitian. Prinsip-prinsip ini bertujuan untuk melindungi hak-hak subjek penelitian, menjaga integritas ilmiah, dan memastikan bahwa penelitian dilakukan secara bertanggung jawab. Pada penelitian ini mencakup beberapa aspek penting, antara lain:

1. Informed consent

- a. Pentingnya persetujuan: Sebelum melibatkan subjek penelitian (misalnya, manusia atau hewan), peneliti harus mendapatkan persetujuan tertulis yang informatif. Persetujuan ini harus diberikan secara sukarela setelah subjek memahami tujuan penelitian, prosedur yang akan dilakukan, potensi risiko dan manfaat, serta hak-hak mereka sebagai subjek penelitian.
- b. Klarifikasi: Dalam penelitian ini, meskipun tidak melibatkan manusia secara langsung, penting untuk menjelaskan bahwa bahan tanaman yang digunakan (daun kangkung) berasal dari sumber yang jelas dan tidak membahayakan lingkungan atau spesies lain.

2. Kerahasiaan

- a. Identitas Subjek: Meskipun penelitian ini tidak melibatkan manusia secara langsung, kerahasiaan tetap penting. Identitas sumber bahan tanaman (misalnya, kebun, petani) harus dirahasiakan jika tidak ada izin untuk dipublikasikan.
- b. Data Penelitian: Data penelitian yang diperoleh harus disimpan secara aman dan hanya dapat diakses oleh pihak-pihak yang berwenang

3. Integritas ilmiah

- a. Jujur dan objektif: Peneliti harus jujur dalam melaporkan semua data dan hasil penelitian, baik yang mendukung maupun yang tidak mendukung hipotesis penelitian.
- b. Hindari plagiarisme: Semua ide, data, dan hasil penelitian yang berasal dari sumber lain harus dikutip dengan benar.
- c. Mencegah fabrikasi data: Peneliti tidak boleh membuat data palsu atau memanipulasi data yang ada.