

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian ini termasuk dalam penelitian eksperimen murni (*Pure Experiment*) pada skala laboratorium, dengan memberikan perlakuan (*treatment*) terhadap objek penelitian serta adanya kontrol penelitian.²³

B. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan selama 2 bulan, yaitu pada bulan Maret sampai dengan bulan Mei 2015. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Program Studi Pendidikan Biologi, Jurusan MIPA Institut Agama Islam Negeri (IAIN) Palangka Raya.

C. Variabel Penelitian

Variabel dalam penelitian ini terdiri dari variabel bebas dan variabel terikat. Sebagai variabel bebas adalah perlakuan konsentrasi ekstrak daun Ceremai (*Phyllanthus acidus* L.). Sedangkan variabel terikatnya adalah pertumbuhan *Candida albicans*.

D. Rancangan Percobaan

Rancangan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL), karena faktor kondisi lingkungan dapat diseragamkan (homogen), kecuali faktor perlakuan yang diberikan.

²³Yayu Srirahayu, *Isolasi Pemurnian dan Uji Aktivitas Antibakteri Senyawa Sinensetin dari Ekstrak Daun Kumis Kucing (Otrhosiphonis aristatus)*, Jurusan Kimia, IPB 2003

Oleh karena dasar teoritis dan jarak tingkat perlakuan belum ada, berdasarkan hasil uji pendahuluan pada umur 1x24 jam dengan konsentrasi 70% terlihat bahwa zona bening yang tampak berjarak 3,51 mm, daerah yang tampak tersebut merupakan zona bening terluas dari hasil uji pendahuluan yang telah dilakukan. Maka dari itu berdasarkan teori perancangan himpunan perlakuan bahwa perlakuan yang diperlakukan berpengaruh paling baik selaras dengan hipotesis yang diajukan sebelum penelitian harus diletakan diantara minimal dua perlakuan lain yang bertaraf lebih rendah dan lebih tinggi, tetapi diperkirakan mempunyai pengaruh kurang baik dibanding perlakuan hipotesis tersebut.²⁴ Oleh sebab itu rentangan dan taraf perlakuan konsentrasi ekstrak daun ceremai (*Phyllanthus acidus* L.) pada penelitian ini disusun menjadi 6 taraf yaitu:

S₀ = Akuades steril tanpa ekstrak daun Ceremai 0 %.

S₁ = Ekstrak daun Ceremai dengan konsentrasi 50 %.

S₂ = Ekstrak daun Ceremai dengan konsentrasi 60 %.

S₃ = Ekstrak daun Ceremai dengan konsentrasi 70 %.

S₄ = Ekstrak daun Ceremai dengan konsentrasi 80 %.

S₅ = Ekstrak daun Ceremai dengan konsentrasi 90 %.

Jumlah ulangan ditentukan berdasarkan rumus federer: $(t-1)(r-1) \geq 15$, dimana t adalah perlakuan dan r adalah ulangan.

Berdasarkan hal tersebut maka diperoleh jumlah ulangan adalah sebanyak 4 kali, sehingga total unit penelitian ini adalah 6 taraf x 4 ulangan

²⁴ Kemas Ali Hanafiah, *Rancangan Percobaan Teori dan Aplikasi*. Jakarta: Rajawali Pers, 2010, h.6

= 24 unit. Tujuan dilakukannya ulangan ini yaitu untuk memperkecil tingkat kesalahan yang akan terjadi. Adapun perhitungan ulangan adalah sebagai berikut:

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

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

$$5r - 5 \geq 15$$

$$5r - 15 + 5$$

$$r \geq \frac{20}{5}$$

$$r \geq 4$$

E. Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Alat-alat yang digunakan adalah:

Tabel 3.1 Alat Yang Digunakan Dalam Penelitian

No	Nama Alat	Keterangan
1	Mikropipet	2 buah
2	<i>Hand sprayer</i> 200 ml	1 buah
3	Labu Erlenmeyer	5 buah
4	<i>Beaker glass</i> 50 ml	9 buah
5	<i>Beaker glass</i> 200 ml	2 buah
6	<i>Beaker glass</i> 500 ml	2 buah
7	Labu Erlenmeyer 500 ml	5 buah
8	Gelas ukur 25 ml	2 buah
9	Gelas ukur 100 ml	2 buah
10	Sapu tangan	2 buah
11	Inkubator	1 buah
12	Pisau	2 buah
13	Pengaduk kaca	2 buah
14	Cawan petri	30 buah
15	Jarum inokulasi	4 buah
16	Jangka sorong	1 buah
17	Tabung reaksi	4 buah
18	Lampu spiritus	2 buah
19	Corong kaca	2 buah
20	Panci	2 buah
21	<i>Autoclaf</i>	1 buah
22	Oven	1 buah
23	Kulkas	1 buah
24	Timbangan	1 buah
25	Blender	1 buah
26	Korek api	1 buah
27	Kompor	1 buah
28	LAF (<i>Laminar Air Flow</i>)	1 buah
29	Hot Plate Stirer	1 buah
30	Sarung tangan	2 buah
31	Baskom	2 buah
32	Sarigan/Penyaring	3 buah

2. Bahan-bahan yang digunakan adalah:

Tabel 3.2 Bahan Yang Digunakan Dalam Penelitian

No	Nama Bahan	Keterangan
1	Daun <i>Phyllanthus acidus</i> L	200 gr
2	<i>Agar powder</i>	10 gr
3	<i>Beef ekstrak</i>	3 gr
4	<i>Bacto pepton</i>	5 gr
5	<i>Dextrose</i>	19 gr
6	Alcohol 96%	1200 ml
7	<i>Aquades</i>	2000 ml
8	Kapas	2 gulung
9	Vaselin	500 gr
10	Kultur murni <i>Candida albicans</i>	1 tabung
11	Kertas saring	1 pak
12	Kasa	2 pak
13	Kertas kraf	10 lbr
14	Kertas temple	2 buah
15	Tali kasur	1 gulung
16	Alcohol 70%	500 ml
17	Cotton buds	1 pak
18	Lysol	500 ml

F. Prosedur Penelitian

Penelitian ini dilakukan dalam skala laboratorium dengan tahapan penelitian sebagai berikut :

a. Menyiapkan medium lempeng SDA (*Sabouraud Dextrose Agar*).

Pembuatan medium padat SDA (*Sabouraud Dextrose Agar*). yang langkah-langkahnya sebagai berikut :

- (1) Menyiapkan alat-alat yang bersih, kering, dan steril
- (2) Tahapan pembuatan medium lempeng SDA (*Sabouraud Dextrose Agar*). dengan formula :

- *Dextrose* 19 gr

- *Bacto peptone*..... 5 gr
- *Agar powder*..... 10 gr
- *Aquadest*..... 250 ml²⁵

- (3) Membagi *akuades* menjadi dua bagian, satu bagian untuk melarutkan *dextrose* dan *bacto pepton*, sebagian lagi untuk melarutkan *agar powder*.
- (4) Melarutkan *agar powder* pada sebagian air tersebut dengan mengaduk secara konstan dan meletakkannya di atas kompor gas atau hot plate. Setelah keduanya larut, menuangkan larutan *dextrose* dan *bacto pepton* ke larutan agar dan mengaduknya sampai homogen.²⁶
- (5) Memasukkan larutan ke dalam cawan petri sebanyak 10 ml per cawan setelah itu membungkus masing-masing cawan dengan kertas kraft.
- (6) Mensterilkan seluruh cawan petri ke dalam autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 15 lb (pound) selama 30 menit.
- (7) Setelah proses sterilisasi selesai, selanjutnya bahan-bahan dibiarkan selama 1-2x24 jam. Jika medium terkontaminasi maka sterilisasi diulang kembali, sebaliknya jika medium tidak terkontaminasi maka medium telah siap untuk digunakan.²⁷

b. Penyiapan medium cair

²⁵ Raniyanti, Rieska alfiah. *Efektivitas Ekstrak Metanol Daun Sembung Rambati (Mekanika micrantha Kunth) Terhadap Pertumbuhan Jamur Candida albicans*, Universitas Tanjungpura: Pontianak, 2008, h. .

²⁶ Rida hasanah. "Uji Daya Hambat Ekstrak Sisik Naga (*Drymoglossum Piloselloides* presl) Terhadap Pertumbuhan Jamur *Candida albicans*". STAIN Palangka raya. 2013 hal 30

²⁷ Hujjatusnaini, *Petunjuk Praktikum Mikrobiologi*, Palangka Raya ; 2012, h 2

Pembuatan medium NB (*Nutrient Broth*) yang langkah-langkahnya sebagai berikut:

- (1) Menyiapkan alat-alat yang bersih, kering dan steril.
- (2) Menimbang komponen medium dengan menggunakan neraca digital sesuai dengan komposisi berikut:
 - *Beef extract* 3 gram
 - *Bacto peptone* 5 gram
 - *Akuades* 1000 ml
- (3) Melarutkan *beef extract* dan *bacto pepton* ke dalam *akuades*.²⁸
- (4) Mengaduk larutan *beef extract* dan *bacto pepton* secara konstan dan meletakkannya di atas kompor gas atau *hot plate*.
- (5) Mensterilkan medium kultur cair 100 ml dalam labu Erlenmeyer menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 15 lb (pound) selama 30 menit.
- (6) Memasukkan larutan ke dalam tabung reaksi sebanyak 5 ml per tabung setelah itu meletakkan semua tabung tersebut pada rak tabung reaksi. Setelah proses sterilisasi selesai, selanjutnya bahan-bahan dibiarkan selama 2x24 jam. Jika medium terkontaminasi maka sterilisasi diulang kembali, sebaliknya jika medium tidak terkontaminasi maka medium telah siap untuk dipergunakan.²⁹

c. Menyiapkan biakan murni *Candida albicans*

²⁸Rida hasanah. "Uji Daya Hambat Ekstrak Sisik Naga (*Drymoglossum Piloselloides* presl) Terhadap Pertumbuhan Jamur *Candida albicans*". STAIN Palangka raya. 2013 hal 30

²⁹Noor Hujjatusnaini, *Pengaruh Ekstrak Daun Ketepeng Cina (Cassia alata L) Terhadap Penghambatan Pertumbuhan Trichophyton sp*, Palangkaraya: Universitas Palangka Raya, 2000,

Langkah-langkah dalam mempersiapkan biakan murni *Candida albicans* adalah sebagai berikut:

1. Menyediakan 2 buah medium lempeng dan 2 medium miring.
 2. Menyiapkan koloni *Candida albicans*.
 3. Menulis nama koloni pada medium lempeng dan medium miring yang telah tersedia.
 4. Secara aseptik menginokulasikan koloni *Candida albicans* tersebut ke:
 - a. Medium lempeng dengan arah zig-zag dengan memakai jarum inokulasi lurus.
 - b. Medium miring, dengan arah lurus mulai dari permukaan medium miring bagian bawah menuju ke atas.
 5. Menyimpan biakan tersebut dalam lemari penyimpanan biakan mikroba dan melakukan pengamatan setelah biakan *Candida albicans* berumur 2x24 jam, setelah itu biakan murni *Candida albicans* siap untuk digunakan dalam penelitian.
- d. Menyiapkan ekstrak daun Ceremai

Langkah-langkah dalam menyiapkan ekstrak Ceremai adalah sebagai berikut:

- 1) Menyiapkan dan mencuci sampai bersih 200 gr daun ceremai yang segar, lalu diiris-iris kasar.

- 2) Memasukkan daun ceremai yang sudah dibersihkan kedalam oven dengan suhu 70 °C selama 60 menit, untuk mengurangi kadar air yang terdapat dalam ekstrak daun ceremai.
 - 3) Memblender irisan kasar daun ceremai dengan menambahkan 1000 ml alkohol 96%, sampai diperoleh 1200 ml suspensi daun ceremai, kemudian didiamkan selama 2 jam.
 - 4) Selanjutnya menyaring suspensi tersebut dengan menggunakan saputangan steril, kemudian menyaringnya kembali dengan menggunakan kertas kering.
 - 5) Setelah itu, hasil saringan daun ceremai dipanaskan pada suhu 75° C – 80° C, sampai diperoleh 100 ml ekstrak murni daun ceremai, yang kemudian dijadikan sebagai stok induk.
 - 6) Menyiapkan 10 ml ekstrak daun ceremai dengan konsentrasi 90%, yaitu dengan cara mencampurkan 9 ml stok induk ekstrak ceremai dengan 1 ml akuades steril, yang bagian ceremai adalah 9 bagian dalam 10 ml volume atau 90% dimana perhitungan konsentrasi setiap perlakuan digunakan rumus: $M_1 V_2 = M_2 V_1$.
 - 7) Menyiapkan 10 ml ekstrak daun ceremai dengan konsentrasi 90 %, 80%, 70%, 60%, 50% dan 0 % sebagai kontrol perlakuan.³⁰
- e. Pemberian ekstrak daun ceremai pada koloni *Candida albicans*

Langkah-langkah kerja dalam memberikan perlakuan ekstrak daun ceremai pada koloni *Candida albicans* adalah :

³⁰Noor Hujjatusnaini, *Pengaruh Ekstrak Daun Ketepeng Cina (Cassia alata L) Terhadap Penghambatan Pertumbuhan Trichophyton sp*, Palangkaraya: Universitas Palangka Raya, 2000, h. 23-24.

- 1) Menyiapkan 24 cawan medium lempeng SDA (*Sabouraud Dextrose Agar*), kemudian memberikan kode-kode perlakuannya pada setiap cawan.
- 2) Menyiapkan *paper disc* dengan diameter 2 cm sebanyak 24, kemudian merendamnya ke dalam 10 beaker glass yang masing-masing berisi 10 ml larutan ekstrak daun ceremai sesuai dengan konsentrasi perlakuannya, yaitu 50%, 60%, 70%, 80%, 90%. Pada konsentrasi 0% yang berfungsi sebagai kontrol. Perendaman tersebut dilakukan selama 30 menit.
- 3) Menggoyang-goyangkan kultur cair *Candida albicans* secara perlahan selama 3 menit, sehingga penyebaran mikroba menjadi merata.
- 4) Kemudian menuangkan kultur murni cair *Candida albicans* yang telah berumur 2 x 24 jam sebanyak 0,5 ml pada masing-masing 30 medium lempeng SDA, dengan menggunakan *syrink* sehingga diperoleh inokulan yang relatif seragam.
- 5) Selanjutnya meletakkan masing-masing 1 *paper disc* yang telah direndam selama 30 menit tersebut ke bagian tengah-tengah permukaan medium lempeng SDA secara aseptik sesuai dengan kode perlakuannya sebanyak 24 cawan.
- 6) Kemudian menyimpan 24 cawan petri ke dalam Inkubator pada suhu 30 °C. Melakukan pengambilan data pada saat kultur *Candida albicans* berumur 1 x 24 jam, 2 x 24 jam, 3 x 24 jam dan 4x24 jam setelah pemberian perlakuan.

G. Teknik Pengumpulan Data

Teknik pengumpulan data pada penelitian ini adalah teknik observasi langsung terhadap objek penelitian, melalui kegiatan pengukuran. Pengukuran data dilakukan berjumlah 30 cawan petri berumur 1 x 24 jam, 2 x 24 jam, 3 x 24 jam, dan 4 x 24 jam setelah pemberian perlakuan.

Data diambil pada semua unit penelitian, yaitu berupa hasil pengukuran lebar (dalam satuan mm) antara sisi terluar *paper disc* yang mengandung ekstrak perlakuan dengan koloni *Candida albicans* dipermukaan medium lempeng SDA (*Sabouraud Dextrose Agar*). Dalam hal ini yang diukur adalah jarak koloni tumbuh *Candida albicans* yang terdekat dengan *paper disc*.

H. Teknik Analisis Data

Teknik analisis data yang digunakan untuk menguji hipotesis adalah analisis variansi (ANOVA) yang merupakan teknik analisis data yang menguji perbedaan rerata nilai dua sampel atau lebih. Langkah – langkah pengujian hipotesis menggunakan analisis variansi adalah sebagai berikut :

1. Menyusun data ke dalam tabel

Data yang dikumpulkan seluruhnya dimasukkan ke dalam Tabel

3.1 data hasil penelitian, seperti di bawah ini.

Tabel 3.1. Contoh Tabel Data Hasil Pengamatan

Perlakuan	Ulangan			Total	$\bar{x}$
	1	2	3		
S ₀					
S ₁					
S ₂					
S ₃					
S ₄					
S ₅					

a. Menghitung faktor koreksi (FK)

$$\text{Faktor koreksi (FK)} = \frac{T_{ij}^2}{r \times t}$$

b. Menghitung Jumlah Kuadrat (JK)

$$\text{Faktor koreksi (FK)} = \frac{(\sum X_{\text{total}})^2}{N}$$

$$JK_{\text{Total}} = (\sum X_{\text{total}})^2 - FK$$

$$JK_{\text{perlakuan}} = \frac{(S_0)^2 + (S_1)^2 + (S_2)^2 + \dots + (S_9)^2}{N_{\text{ulangan}}} - FK$$

$$JK_{\text{Galat}} = JK_{\text{total}} - JK_{\text{perlakuan}}$$

c. Menentukan Derajat bebas (db)

$$Db_{\text{perlakuan}} = t - 1 = 6 - 1 = 5$$

$$Db_{\text{Galat}} = t(r - t) = 6(4 - 1) = 18$$

$$Db_{\text{Total}} = (t \cdot r) - 1 = (6 \cdot 4) - 1 = 23$$

d. Menentukan Kuadrat Tengah (KT)

$$KT_{\text{perlakuan}} = \frac{JK_{\text{perlakuan}}}{db_{\text{galat}}}$$

$$KT_{\text{Galat}} = \frac{JK_{\text{galat}}}{db_{\text{galat}}}$$

e. Menghitung Harga F_{hitung} :³¹

$$F_{hitung} = \frac{KT_{perlakuan}}{KT_{galat}}$$

f. Menghitung harga koefisien Keragaman (KK)

Koefisien keragaman (KK) berfungsi untuk mengukur besarnya variasi data hasil penelitian, yang dinyatakan dalam satuan persen (%). Makin besar harga KK, maka variasi data makin besar pula, begitu pula sebaliknya. Rumus untuk menghitungnya adalah sebagai berikut:

$$KK = \frac{\sqrt{KT_{galat}}}{X}$$

2. Membuat tabel Ringkasan Analisis Variansi

Tabel 3.2. Contoh Tabel Ringkasan Analisis Variansi

Sumber keragaman	Db	JK	KT	F-Hitung	F-Tabel	
					5%	1%
Perlakuan Galat						
Total						

3. Kriteria Pengujian Hipotesis

Hipotesis yang diajukan pada penelitian ini disusun dalam bentuk hipotesis statistik, yaitu:

³¹Kemas Ali Hanapiah, *Rancangan Percobaan & Teori Aplikasi*, Palembang: USP, 2011, h.26

H_0 = Perlakuan pemberian ekstrak daun ceremai (*Phyllanthus acidus* L.) **tidak berpengaruh** signifikan dalam menghambat pertumbuhan *Candida albicans*.

H_1 = Perlakuan pemberian ekstrak daun ceremai (*Phyllanthus acidus* L.) **berpengaruh** signifikan dalam menghambat pertumbuhan *Candida albicans*

Pengujian Hipotesis dilakukan dengan cara membandingkan harga F_{hitung} dengan F_{tabel} . Adapun kriteria pengujian hipotesis adalah sebagai berikut:

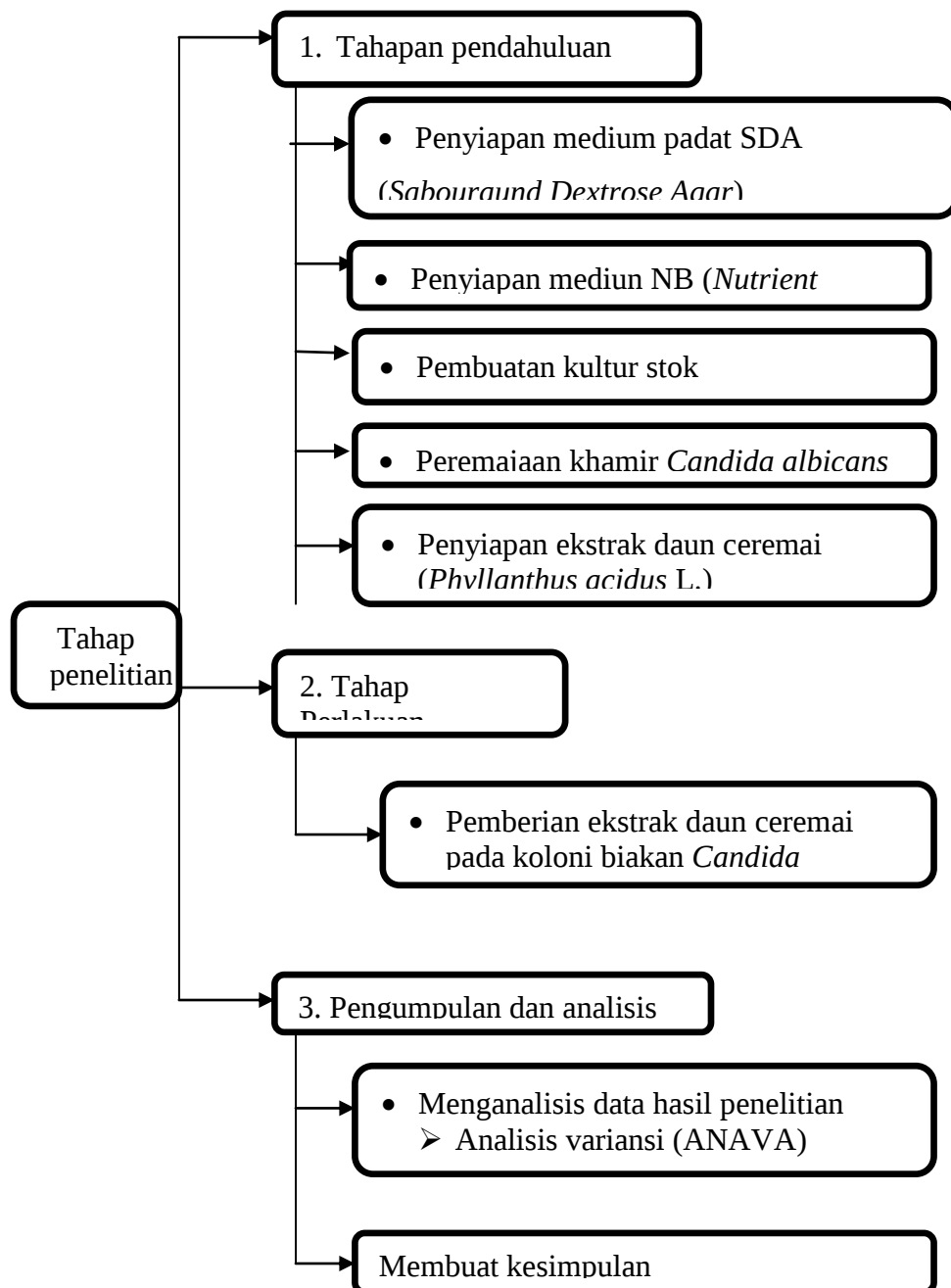
- 1) Jika harga $F_{hitung} < F_{tabel} 1\%$ berarti H_0 diterima, sedangkan H_1 ditolak dan dinyatakan bahwa perlakuan yang diberikan tidak berpengaruh nyata.
- 2) Jika harga $F_{hitung} \geq F_{tabel} 1\%$ berarti H_0 ditolak, sedangkan H_1 diterima dan dinyatakan bahwa perlakuan yang diberikan berpengaruh sangat nyata.

Uji lanjut :

Apabila $F_{hitung} \geq F_{tabel} 1\%$ maka dapat dinyatakan perlakuan yang diberikan berpengaruh nyata, sehingga dapat dilanjutkan dengan uji BNT 1%.

1) Skema Alur Penelitian

Langkah-langkah dalam pengumpulan data yang diawali dengan tahapan pendahuluan, perlakuan, dan pengujian yang dijelaskan dalam diagram pada Gambar 2.5 berikut:



Gambar 2.5 Diagram Alur Penelitian

2). Jadwal Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret sampai dengan bulan Mei

2015. Jadwal kegiatan penelitian disusun dalam Tabel 3.3.sebagai berikut:

Tabel 3.3. Jadwal Kegiatan Penelitian

No	Kegiatan	April				Mei				Juni			
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
1.	Perijinan persiapan penelitian	X	x										
2.	Konsultasi persiapan penelitian			x									
3.	Persiapan alat dan bahan				x								
4.	Pelaksanaan penelitian				x	x							
5.	Pengambilan data					x							
6.	Analisis data						x	x					
7.	Pembahasan data							x	x	x			
8.	Penyusunan laporan									x	x	x	x
Bulan													
No	Tahapan kegiatan Lanjutan	Juli				Agustus				September			
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
1	Konsultasi kepada pembimbing			x	x	x	x	x	x				
2	Munaqasah									x			
3	Perbaikan									x	x	X	