

## **BAB III METODOLOGI PENELITIAN**

### **3.1 Jenis Penelitian**

Jenis penelitian dari uji efektivitas bakteri tumbuhan mangrove terhadap penyakit layu secara *in vitro* adalah jenis penelitian kuantitatif dengan metode eksperimen. Menurut Payadnya (2018), metode penelitian eksperimen merupakan salah satu metode dalam penelitian kuantitatif. Metode eksperimen ditujukan untuk meneliti hubungan sebab akibat dengan memanipulasikan suatu data atau lebih variabel pada satu (atau lebih) kelompok eksperimental, dan membandingkan hasilnya dengan kelompok kontrol yang tidak mengalami manipulasi. Manipulasi berarti mengubah secara sistematis sifat-sifat (nilai-nilai) variabel bebas.

### **3.2 Waktu dan Tempat Penelitian**

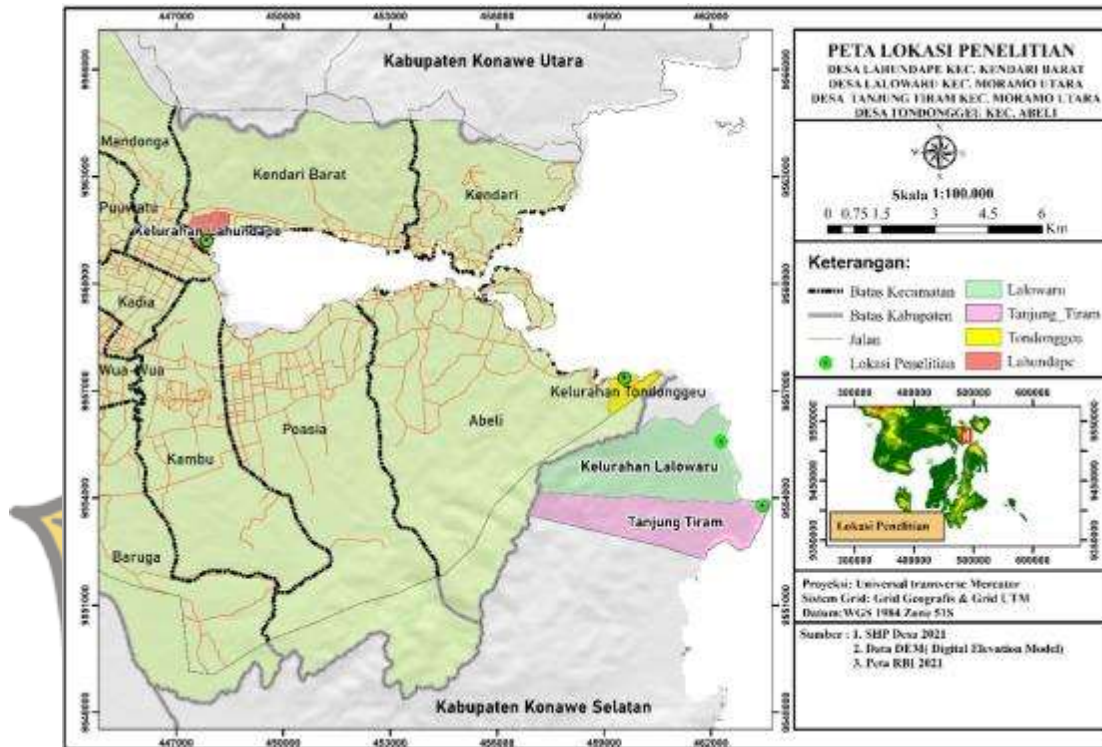
#### **3.2.1 Waktu**

Penelitian ini berlangsung selama 5 bulan, yakni April 2022 sampai dengan Agustus 2022.

#### **3.2.2 Tempat Penelitian**

Lokasi penelitian berada di wilayah Kabupaten Konawe Selatan dan Kota Kendari Provinsi Sulawesi Tenggara. Lokasi Pengambilan sampel mangrove di Wilayah Kabupaten Konawe Selatan berada di Kecamatan Moramo Utara terdiri atas tiga desa yakni Desa Tondonggeu, Desa Lalowaru, dan Desa Tanjung Tiram. Sedangkan pengambilan sampel mangrove di Wilayah Kota Kendari berada di

Kecamatan Kendari Barat Kelurahan Lahundape. Selanjutnya sampel penelitian dibawa ke Laboratorium Terpadu Institut Agama Islam Negeri (IAIN) Kendari.



Gambar 3.1 Peta Lokasi Pengambilan Sampel Tanaman Mangrove

### 3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian kemampuan antagonis terhadap patogen dilaksanakan dalam bentuk percobaan dengan menggunakan bakteri hasil seleksi. Isolat bakteri yang dicobakan yaitu: 1. LH5B1, 2. LH5B2, 3. LH6B2, 4. T4B2, 5. T5B1, 6. TG5B1, 7. T5B2, 8. TG6B1, 9. TG6B2, 10. TG6B3, 11. L4B1, 12. L6B2, dan 13. LW6B1. Setiap perlakuan diulang tiga kali sehingga terdapat 39 unit percobaan.

### 3.4 Prosedur Penelitian

#### 3.4.1 Isolasi Bakteri Rizosfer Dari Tanaman Mangrove

Sumber bakteri rizosfer diambil dari tanaman mangrove yang berada di wilayah Kabupaten Konawe Selatan dan Kota Kendari Provinsi Sulawesi

Tenggara. Bakteri rizosfer diisolasi dari jaringan tanaman pada bagian akar dan tanah disekitar perakaran. Sampel yang telah diperoleh kemudian dimasukkan kedalam plastik yang telah diberi label memuat data tentang lokasi pengambilan sampel, kemudian sampel diletakkan dalam box Styrofoam dan dibawa ke laboratorium untuk dilakukan proses isolasi.

Isolasi bakteri rizosfer diisolasi dari tanaman mangrove dengan tinggi 1-1,5 Meter yang tumbuh sehat dan tidak menunjukkan gejala sakit. Pemilihan sampel tanaman mangrove karena pertimbangan kemudahan pada perakarannya yang masih muda atau lunak sehingga mempermudah dalam penggerusan. Isolasi bakteri rizosfer dilakukan dengan mengikuti metode sterilisasi permukaan. Akar tanaman dicuci bersih dengan air mengalir kemudian dikeringkan. Selanjutnya akar tanaman yang sudah bersih dipotong berukuran 1-2 cm dengan ditimbang sebanyak 2 g selanjutnya dilakukan sterilisasi permukaan dengan merendam akar tanaman menggunakan alkohol 70% selama 1 menit dan direndam menggunakan aquades steril sebanyak 2 kali selama 1 menit. Bagian akar yang telah disterilisasi kemudian digerus menggunakan mortar sampai halus dan ditambahkan 18 ml aquades steril kemudian dilakukan pengenceran bertingkat. Hal yang sama dilakukan terhadap sampel tanah yang diambil dari perakaran mangrove dengan cara menimbang sampel tanah 2 g kemudian ditambahkan 18 ml aquades steril. Suspensi diencerkan sampai pada seri pengenceran  $10^{-7}$ .

Penentuan besar atau banyaknya tingkat pengenceran tergantung pada perkiraan jumlah mikroba dalam sampel. Pengenceran dilakukan dengan menggunakan perbandingan 1 : 9 untuk sampel dari pengenceran pertama dan

selanjutnya, sehingga pengenceran berikutnya mengandung 1/9 mikroba. Sampel yang mengandung bakteri dimasukkan kedalam *tube* pengenceran pertama secara aseptis sebanyak 0,1 ml dan ditambahkan aquades steril 0,9 ml kemudian dikocok sampai homogen sehingga didapatkan pengenceran awal  $10^{-1}$  dan ditambahkan aquades steril 0,9 ml kemudian di kocok sampai homogen sehingga didapatkan seri pengenceran  $10^{-2}$ , pemindahan dilakukan dengan cara yang sama sampai pada seri pengenceran  $10^{-7}$ . Hal yang perlu diingat bahwa tip pipet mikro yang digunakan harus selalu diganti.

Seri pengenceran  $10^{-7}$  kemudian ditanam pada media TSA dalam cawan petri dengan cara mengambil 0,1 ml suspensi menggunakan pipet mikro, kemudian diteteskan di atas permukaan media yang telah memadat. Suspensi kemudian disebar menggunakan batang L yang telah disteril. Media kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 24-48 jam (Firdaus, 2018). Media yang telah diinkubasi selama 2 hari selanjutnya dilakukan pengamatan terhadap koloni tumbuh. Koloni yang menunjukkan perbedaan morfologi selanjutnya diisolasi. Isolasi koloni bakteri dari media biakan dilakukan secara berulang-ulang (pemurnian isolat) sampai didapatkan koloni tunggal atau biakan murni untuk pengujian selanjutnya dan disimpan dalam *tube* berisi 0,9 ml larutan gliserol 15% dan disimpan dalam *freezer*.

### 3.4.2 Uji Kemampuan Antagonis Terhadap Patogen

Uji daya hambat bakteri rizosfer (uji antagonis) terhadap penyakit layu patogen *Fusarium oxysporum* secara *in vitro* dilakukan sebagai metode seleksi awal untuk mendapatkan isolat yang berpotensi sebagai agens penginduksi

terhadap patogen. Patogen *Fusarium oxysporum* diperoleh pada tanaman tomat yang terserang penyakit *layu fusarium*. Selanjutnya *Fusarium oxysporum* di isolasi pada media PDA padat. Selanjutnya hifa yang tumbuh dimurnikan dan diamati di mikroskop. Patogen diidentifikasi berdasarkan bentuk makroskopis dan mikroskopis. Menurut Soesanto (2013), Pathogen *Fusarium* memiliki koloni yang berwarna putih atau disertai warna ungu hingga merah muda pada setiap koloninya, koloni pathogen ini juga umumnya memiliki mikronidium (alat reproduksi aseksual) dengan jumlah yang sangat banyak dan bersel tunggal dan berbentuk oval, berdinding tebal dan halus dengan apikal sel yang runcing pada bagian bawahnya sedangkan konidiofor (hifa reproduktif yang berfungsi untuk menghasilkan konidiospora) pada *Fusarium oxysporum* merupakan tangkai yang pendek. Patogen yang menunjukkan ciri-ciri sebagai *Fusarium oxysporum* selanjutnya di perbanyak untuk dijadikan sebagai patogen uji.

Uji antagonis isolat bakteri rizosfer dilakukan menggunakan metode *dual kultur* pada medium PDA. Potongan medium PDA padat dengan diameter 1x1 cm yang ditumbuhi hifa dari masing-masing patogen digunakan sebagai inokulum dan inokulasi pada cawan petri berisi medium baru yang berupa campuran antara media PDA dan TSA. Potongan inokulum diletakkan dengan jarak 3 cm dari tepi cawan petri dan kultur diinkubasi dalam ruang bersuhu 26-28°C selama 48 jam. Masing-masing isolat bakteri rizosfer yang di uji digoreskan memanjang dengan jarak 3 cm dari tepi cawan berlawanan arah dengan letak patogen yang telah ditumbuhkan sebelumnya. Pengamatan dilakukan setiap hari terhadap pertumbuhan patogen dengan mengukur jari-jari pertumbuhan patogen ke arah

bakteri rizosfer ( $R_1$ ) dan jari-jari pertumbuhan patogen ke arah tepi fungi ( $R_2$ ). Selanjutnya daya hambat yang diperoleh digunakan untuk menghitung daya hambat (DH) isolat bakteri rizosfer terhadap patogen *Fusarium oxysporum* yang ditentukan dengan rumus (Malinda *et al.*, 2016; Suryanto *et al.*, 2012):

$$DH = \frac{(R_1 - R_2)}{R_1} \times 100 \%$$

Keterangan :

DH : Daya hambat

$R_1$  : Jari-jari pertumbuhan patogen ke arah bakteri rizosfer

$R_2$  : Jari-jari pertumbuhan patogen ke arah tepi fungi

### 3.4.3 Kemampuan Produksi Asam Sianida

Kemampuan produksi asam sianida (HCN) setiap isolat bakteri rizosfer diuji menggunakan prinsip pengujian yang dilakukan oleh Munif (2011). Isolat bakteri rizosfer yang di uji ditumbuhkan pada media TSA. Pada bagian tengah cawan petri di tempelkan potongan kertas saring yang telah direndam dalam larutan pendeteksi HCN dengan komposisi: 2 gram asam pikrat, 8 gram natrium karbonat dan 200 ml air steril. Kultur bakteri rizosfer selanjutnya di inkubasi selama 4 hari pada suhu 24°C. Selanjutnya dilakukan pengamatan terhadap perubahan warna kertas saring sebagai indikator terbentuknya senyawa HCN. Warna kertas saring yang tetap kuning mengindikasikan bahwa isolat uji tidak menghasilkan HCN, sedangkan warna coklat dan merah bata sebagai indikator isolat yang menghasilkan HCN.

### 3.5 Instrumen Penelitian

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

**Tabel 3.1 Alat dan Kegunaan**

No	Alat	Kegunaan
1.	Box <i>Styrofoam</i>	Untuk menyimpan sampel mangrove
2.	Botol <i>Schott</i>	Untuk menyimpan media TSA dan PDA
3.	Cawan petri	Untuk tempat biakan bakteri
4.	Mortar	Untuk menghaluskan sampel
5.	Erlenmeyer	Untuk menyimpan suspensi hasil pengenceran
6.	Batang penyebar	Untuk menyebarkan bakteri pada cawan petri
7.	Gelas kimia	Sebagai tempat menghomogenkan media TSA, PDA dan aquades
8.	<i>Laminar air flow</i>	Tempat steril untuk melakukan isolasi bakteri, isolasi jamur fusarium
9.	Kulkas	Untuk menyimpan suspensi
10.	Timbangan analitik	Untuk menimbang sampel dan TSA, PDA
11.	<i>Shaker</i>	Untuk menghomogenkan suspensi
12.	Spektrofotometer	Untuk membaca panjang gelombang cahaya
13.	<i>Autoclave</i>	Untuk mensterilkan alat dan bahan
14.	<i>Hot plate</i>	Untuk menghomogenkan larutan
15.	Jarum ose	Untuk menggoreskan bakteri pada cawan petri
16.	Pipet mikro	Untuk mengambil suspensi dengan takaran kecil
17.	Tip mikro	Untuk mengambil suspensi dengan bantuan pipet mikro
18.	<i>Tube</i>	Untuk menyimpan suspensi
19.	Gelas ukur	Untuk mengukur larutan
20.	Tabung reaksi	Untuk menyimpan suspensi
21.	Spatula	Untuk mengambil padatan
22.	Oven listrik	Untuk menjaga alat tetap steril
23.	Lampu Bunsen	Untuk pemijaran
24.	Plastic tahan panas	Untuk membungkus cawan petri
25.	Pisau	Untuk memotong sampel
26.	Alat tulis	Untuk mencatat proses dan hasil penelitian
27.	Kamera	Untuk dokumentasi

**Tabel 3.2 Bahan dan Kegunaan**

No.	Bahan	Kegunaan
1.	Alkohol (70%)	Sebagai cairan untuk mensterilkan alat dan mendukung kerja aseptik
2.	Bagian akar dan tanah mangrove	Sebagai sampel penelitian
3.	<i>Trypton Soya Agar</i> (TSA)	Sebagai tempat perbanyakan bakteri
4.	<i>Potato Dextrose Agar</i> (PDA)	Sebagai media tumbuh cendawan
5.	Aquades	Sebagai bahan pelarut
6.	NaOH	Digunakan untuk membersihkan alat
7.	Spritus	Sebagai bahan bakar Bunsen
8.	<i>Tryptic Soy Broth</i> (TSB)	Sebagai media
9.	Kertas Saring	Sebagai alasan pengering saat membersihkan benih, dan mengukur kadar HCN
10.	Plastik <i>Wrap</i>	Sebagai pembungkus petri
11.	<i>Tissue</i>	Digunakan untuk membersihkan dan mengeringkan alat
12.	Gliserol	Sebagai media penyimpanan bakteri
13.	<i>Poli Etilen Glikol</i> (PEG)	Untuk uji karakterisasi bakteri toleran kekeringan
14.	Kertas label	Untuk melabeli sampel
15.	Air	Untuk membersihkan alat
16.	Asam Pikrat	Sebagai bahan untuk uji HCN
17.	<i>Natrium Carbonat</i>	Sebagai bahan untuk uji HCN
18.	Jamur <i>Fusarium oxysporum</i>	Sebagai sampel penelitian

### 3.6 Teknik Analisis Data

Hasil dari pengamatan uji efektivitas bakteri rizosfer tumbuhan mangrove terhadap penyakit layu secara *in vitro* menggunakan analisis data kuantitatif varian anava, jika F dihitung menunjukkan pengaruh nyata pada taraf kepercayaan 95% dan dilanjutkan dengan Uji Jarak Berganda (UJBD) pada taraf alfa ( $\alpha$ ) 0.05.

Teknik analisis data yang digunakan untuk mengelola data yang diperoleh dalam pengembangan *leaflet* materi bakter adalah menggunakan teknik analisis



data kualitatif. Data yang berupa skor tanggapan para ahli yang diperoleh melalui lembar validasi diubah menjadi data interval. Dalam validasi *leaflet* digunakan skala likert. Skor yang diperoleh kemudian dikonversikan menjadi data kualitatif skala lima, dengan rumus yang dikutip dari Widoyoko (2011: 238) sebagai berikut:

**Tabel 3.3 Konversi Data Kuantitatif ke Data Kualitatif dengan Skala Likert (Adaptasi Widoyoko, 2011: 238).**

Data Kuantitatif	Interval Skor	Data Kualitatif
5	$X > + 1,80 Sbi$	Sangat Baik
4	$Xi + 0,60 Sbi < X \leq Xi +$	Baik
3	$Xi - 0,60 Sbi < X \leq Xi +$	Cukup
2	$Xi - 1,80 Sbi < X \leq Xi - 0,60$	Kurang
1	$X \leq Xi - 1,80 Sbi$	Sangat Kurang

Keterangan:

$$Xi \text{ (Rerata skor ideal)} = \frac{1}{2} (\text{skor maks ideal} + \text{skor min ideal})$$

$$Sbi \text{ (Simpangan baku ideal)} = \frac{1}{6} (\text{skor maks} - \text{skor min})$$

$$X = \text{Skor empiris}$$

Berdasarkan rumus konversi data di atas, maka setelah didapatkan data-data kuantitatif, untuk mengubahnya ke dalam data kualitatif pada penelitian ini diterapkan konversi sebagai berikut:

$$Xi = \frac{1}{2} (5+1) = 3$$

$$Sbi = \frac{1}{6} (5-1) = 0,6$$

$$\begin{aligned} \text{Skala 5} &= X > 3 + (1,8 \times 0,6) \\ &= X > 3 + 1,08 \\ &= X > 4,08 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Skala 4} &= 3 + (0,6 \times 0,6) < X \leq 4,08 \\ &= 3 + 0,36 < X \leq 4,08 \end{aligned}$$

$$= 3,36 < X \leq 4,08$$

**Skala 3**  $= 3 - 0,36 < X \leq 3,36$

$$= 2,64 < X \leq 3,36$$

**Skala 2**  $= 3 - (1,8 \times 0,6) < X \leq 2,64$

$$= 3 - 1,08 < X \leq 2,64$$

$$= 1,92 < X \leq 2,64$$

**Skala 1**  $= X \leq 1,92$

**Skor Mak = 5**

**Skor Min = 1**

Dari dasar perhitungan di atas maka konversi data kuantitatif ke data kualitatif skala 1-5 tersebut dapat disederhanakan pada tabel pada tabel berikut:

**Tabel 3.4 Pedoman Hasil Konversi Data kuantitatif ke Data Kualitatif**

Data Kuantitatif	Rentang	Nilai	Data Kualitatif	Keterangan
5	$X > 4,08$	A	Sangat Baik	Layak
4	$3,36 < X \leq 4,08$	B	Baik	
3	$2,64 < X \leq 3,36$	C	Cukup	Tidak Layak
2	$1,92 < X \leq 2,64$	D	Kurang	
1	$X \leq 1,92$	E	Sangat Kurang	

Rumus menghitung kelayakan bahan ajar berbasis *leaflet*.

$$X = \frac{\sum X}{n}$$

Keterangan:

X : Skor rata-rata

$\sum X$  : Jumlah skor

n : Jumlah