

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimen. Penelitian ini dilaksanakan dengan kondisi yang dibuat dan diatur, terdapat kontrol sebagai acuan antara keadaan awal dengan sesudah diberi perlakuan, juga adanya replikasi dan randomisasi untuk meyakinkan hasil yang diperoleh (Nazir, 2003).

Objek penelitiannya berupa sporulasi jamur *Curvularia lunata* Boedijn pada medium Potato Sucrose Agar (PSA) yang ditambah ekstrak rimpang kunyit dengan berbagai konsentrasi. Kontrol negatif penelitian berupa sporulasi jamur pada medium PSA ditambah akuades steril dan Dimethyl sulfoxide (DMSO) 1%, sedangkan kontrol positif berupa sporulasi jamur pada medium PSA ditambah Dithane M-45 0,2% (mengandung Mancozeb 80%) (Harish *et al.*, 2004). Variabel bebas pada penelitian ini yaitu konsentrasi ekstrak rimpang kunyit pada medium PSA, sedangkan yang menjadi variabel terikat yaitu jumlah spora yang diproduksi (sporulasi). Variabel yang dikendalikan antara lain umur jamur yang digunakan, jenis medium, serta suhu dan lama inkubasi.

B. Desain Eksperimen

Desain eksperimen yang digunakan adalah desain Rancangan Acak Lengkap (RAL), karena dilakukan di laboratorium dan kondisinya relatif homogen. Jumlah perlakuan yang digunakan adalah sembilan perlakuan terdiri dari enam konsentrasi ekstrak yang berbeda, dua kontrol negatif, dan satu kontrol

positif. Baik pada uji hayati pendahuluan maupun pada uji hayati pokok, untuk kontrol negatif digunakan DMSO 1% dan akuades steril, sedangkan untuk kontrol positif digunakan Dithane M-45 0,2%. Konsentrasi ekstrak yang digunakan pada uji hayati pendahuluan yaitu 0,02%, 0,04%, 0,06%, 0,08%, 0,10%, dan 0,12% (Nurhayati *et al.*, 2008), sedangkan konsentrasi ekstrak pada uji hayati pokok, sesuai dengan hasil uji hayati pendahuluan.

Banyaknya pengulangan untuk setiap perlakuan diperoleh dari rumus pengulangan Rancangan Acak Lengkap, yaitu $(t)(r) - 1 > 20$, dimana t adalah perlakuan (treatment) dan r adalah pengulangan (replikasi) (Gomez dan Gomez, 1995). Jadi:

$$(t)(r) - 1 > 20$$

$$(9)(r) - 1 > 20$$

$$9r - 1 > 20$$

$$9r > 21$$

$$r > 2,3$$

(Dibulatkan menjadi 3)

Berdasarkan perhitungan di atas maka banyaknya pengulangan yang harus dilakukan paling sedikit tiga kali. Jika A adalah konsentrasi perlakuan untuk ekstrak dengan konsentrasi 0% maka pengulangannya adalah A_n , dimana n menunjukkan urutan pengulangan. Banyaknya galat adalah 27 buah. Jumlah kelompok percobaan atau plot di susun secara acak dari No. 1 sampai 27 dapat dilihat pada Tabel 3.1 sebagai berikut :

Tabel 3.1. Plot percobaan yang disusun secara acak

E ₃	F ₁	B ₃	D ₁	D ₃	B ₁	H ₁	F ₃	B ₂
E ₁	G ₁	C ₁	H ₃	A ₁	C ₂	A ₂	I ₃	I ₂
F ₂	D ₂	H ₂	E ₂	G ₂	A ₃	I ₁	C ₃	G ₃

Keterangan :

A : Kontrol negatif akuades steril

F : Konsentrasi larutan 0,06 % (b/v)

B : Kontrol negatif DMSO 1 %

G : Konsentrasi larutan 0,08 % (b/v)

C : Kontrol positif Dithane M-45 0,2%

H : Konsentrasi larutan 0,10 % (b/v)

D : Konsentrasi larutan 0,02 % (b/v)

I : Konsentrasi larutan 0,12 % (b/v)

E : Konsentrasi larutan 0,04 % (b/v)

C. Populasi dan Sampel

Populasi dan sampel pada penelitian ini adalah:

1. Populasi yang digunakan yaitu seluruh spora jamur *Curvularia lunata* yang diambil dari biakan murni jamur *Curvularia lunata*
2. Sampel yang digunakan yaitu spora jamur *Curvularia lunata* yang diberi perlakuan dengan ekstrak rimpang kunyit (*C. domestica* Val.) pada konsentrasi tertentu.

D. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Oktober 2010 sampai dengan bulan Februari 2011 di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Pendidikan Biologi FPMIPA UPI.

E. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian adalah (Tabel 3.2) :

Tabel 3.2. Alat yang Digunakan

No	Nama Alat	Jumlah	Spesifikasi
1	Aluminium foil	1 pak	25 sq.ft (7,6 m x 30 cm)
2	Autoclave	1 unit	Merk EYELE model HL36AE
3	Beaker glass	3 buah	Gelas pyrex ukuran 1 liter
4	Cawan Petri	30 buah	Gelas pyrex, diameter Ø 95 mm
5	Batang pengaduk	1 buah	Berbahan gelas
6	Blender	1 buah	Merk National
7	Botol kecil	3 buah	Kapasitas 100 ml, berwarna gelap
8	Gelas ukur	2 buah	Pyrex kapasitas 10 ml
9	Gelas objek dan gelas penutup	10 buah	25,4 x 76,2 mm (1 ¹ x 1 ³) dan 1 mm -1,2 mm
10	Haemocytometer	1 buah	Merk Neubauer
11	Jarum inokulasi	1 buah	Panjang 15 cm
12	Labu Erlenmeyer	2 buah	Kapasitas 1000 ml
13	Lampu spiritus	1 buah	Kapasitas 200 ml
14	Magnetik stirer	1 buah	Model RCH-3
15	Makropipet	1 buah	Kapasitas 1 ml
16	Mikroskop	1 buah	1000x perbesaran
17	Neraca digital	1 unit	Merk AND ketelitian 0,001 mg
18	Pisau	1 buah	Tajam
19	Pelubang gabus	1 buah	Ø 6 mm
20	Rak tabung	4 buah	Berbahan kayu
21	Shaker	1 unit	Eyela Multi Shaker MMS
22	Tabung reaksi	50 buah	Gelas Pyrex
23	UV box	1 unit	Ukuran 60 cm x 60 cm x 60 cm

24	Vortex	1 unit	Sibata Test Tube Mixer
25	Waterbath (with shaker)	1 unit	50 x 30 cm, suhu 50°C

F. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah (Tabel 3.3) :

Tabel 3.3. Bahan yang Digunakan

No	Nama Bahan	Jumlah	Spesifikasi
1	Agar-agar	30 gram	Difco agar
2	Akuades steril	2000 ml	Disterilkan dengan autoclave
3	Dithane M-45	1 bungkus	Mengandung 80% Mancozeb
4	DMSO	2 gram	Konsentrasi 1%
5	Ethanol	30 ml, 500 ml	Konsentrasi 70%, 96%
6	Jamur <i>Curvularia lunata</i>	1 stok kultur	Koleksi BALITSA
7	Kain kassa	Secukupnya	Steril
8	Kapas	Secukupnya	Kapas pembalut
9	Kentang	200 gram	Varietas Dieng
10	Kertas saring	Secukupnya	Merk Whatman No.1
11	Kunyit	5 kg	Bagian induk rimpang
12	NaCl	1 gram	Teknis
13	Sukrosa	20 gram	Teknis

G. Prosedur Kerja

Dalam penelitian ini prosedur kerja yang dilakukan terdiri dari tiga tahap, yaitu tahap persiapan, tahap pelaksanaan, dan tahap analisis data.

1. Tahap Persiapan

a. Pembuatan Medium Jamur (PSA)

Medium yang digunakan untuk pertumbuhan jamur *Curvularia lunata* adalah medium PSA (*Potato Sucrose Agar*). Pembuatan medium PSA adalah sebagai berikut : Sebanyak 200 gram kentang dipotong-potong kemudian direbus dalam 1000 ml akuades. Setelah kentang empuk kemudian disaring, sehingga didapat ekstrak kentang. Ekstrak selanjutnya dilarutkan dalam akuades hingga volumenya 1000 ml kemudian ditambahkan 20 gram sukrosa dan 15 gram agar-agar. Medium ekstrak tersebut kemudian dipanaskan selama 20 menit, setelah itu diukur pHnya hingga mencapai pH 5,6. Medium yang sudah diukur pH-nya dimasukkan ke dalam tabung reaksi masing-masing 9 ml dan disterilisasi menggunakan autoklaf (Nurhayati *et al.*, 2008).

b. Sterilisasi

Semua alat gelas tahan panas dan medium disterilkan dengan autoklaf selama 15-20 menit pada suhu 121°C. Alat-alat yang tidak tahan panas disterilkan dengan etanol 70%.

c. Identifikasi Jamur

Identifikasi jamur *Curvularia lunata* dilakukan melalui pengamatan morfologi jamur secara makroskopis dan mikroskopis. Pengamatan makroskopis dilakukan dengan mengamati warna dan bentuk koloninya. Sedangkan pengamatan mikroskopis dilakukan dengan mengamati struktur konidia, bentuk spora, dan hifa dengan menggunakan metode *slide culture* secara aseptik.

Cawan Petri untuk *slide culture* steril berisi kertas saring, sumpit kayu yang dibentuk segitiga, satu buah kaca objek dan dua buah kaca penutup. Langkah-langkah untuk *slide culture* adalah sebagai berikut: PSA steril 5 ml dicairkan dan dipindahkan ke dalam cawan Petri steril. Setelah medium PSA 5 ml membeku, dibuat kotak agar dengan ukuran 3 x 3 mm, kemudian disimpan di atas kaca objek. Setelah itu, jamur *Curvularia lunata* ditanamkan di atas kotak agar, menggunakan lup inokulasi dan ditutup dengan kaca penutup. Kemudian kertas saring ditetesi dengan akuades steril untuk menjaga kelembaban. Jamur ditumbuhkan selama 1 minggu dengan kondisi lembab, kemudian diamati bentuknya di bawah mikroskop dan dianalisis berdasarkan kunci determinasi jamur.

d. Pemeliharaan dan Penyediaan Jamur

Sebelum dilakukan pengujian, jamur yang akan digunakan dimudakan terlebih dahulu di dalam medium PSA. Proses dari pemudakan jamur adalah sebagai berikut: miselium dari biakan jamur dipotong dengan menggunakan pelubang gabus diameter 0,6 mm, kemudian diinokulasikan pada medium PSA yang baru dalam cawan Petri dan diinkubasikan pada suhu 25°C hingga berumur 5 hari (pembentukan miselium yang optimum). Untuk perlakuan pertama pada saat baru pertama kali diinokulasikan, biakan jamur disimpan pada ruangan gelap pada hari pertama inokulasi untuk inisiasi/penyesuaian inokulum yang baru ditanam. Kemudian diinkubasikan pada hari selanjutnya, dengan menyimpannya di bawah sinar UV dekat (NUV/near UV) yang bertujuan untuk menginduksi pembentukan spora, dengan kondisi 8 jam terang 16 jam gelap (tanpa UV) (Iqbal

et al., 1999; Mew & Gonzales, 1999). Suhu saat pemaparan NUV yaitu sekitar 28°C. Untuk stok kultur, biakkan jamur disimpan dengan perlakuan yang sama, yaitu diinduksi dengan NUV, dengan lama hari yang tidak ditentukan.

e. Pembuatan Kurva Produksi Spora *Curvularia lunata*

Pembuatan kurva produksi spora bertujuan untuk menentukan umur inokulum (jumlah spora optimum) *Curvularia lunata* terbaik sebelum digunakan dalam penelitian. Untuk mengetahui hari keberapa jumlah spora optimum maka jamur dikultur dalam beberapa PSA miring selama 10 hari. Perhitungan jumlah spora dilakukan tiap 24 jam sekali. Sebanyak 10 ml larutan fisiologis (NaCl 0,85%) dimasukkan ke dalam isolat *Curvularia lunata* yang telah dikultur dalam PSA miring. Kemudian digosok perlahan menggunakan jarum inokulasi untuk memisahkan spora dengan miselium. Suspensi spora dipindahkan ke dalam tabung reaksi steril lalu dihomogenkan dengan vorteks. Jumlah spora dihitung dengan menggunakan *Haemocytometer* (Lampiran B) (Modifikasi Aberkane *et al.*, 2002). Pembuatan suspensi dan perhitungan jumlah spora ini dilakukan 24 jam sekali selama 10 hari.

f. Ekstraksi rhizoma kunyit (*C. domestica*)

Rimpang kunyit (*C. domestica*) yang akan digunakan sebagai simplisia dibersihkan dengan mencucinya menggunakan air keran hingga bersih. Rimpang yang telah dicuci, dipotong-potong, kemudian dikeringkan pada tempat yang tidak terkena matahari langsung, dikeringkan dengan cara diangin-anginkan supaya terdapat sirkulasi udara yang baik. Proses pengeringan selesai apabila rimpang

telah kering. Rimpang yang telah kering dihancurkan dengan menggunakan blender sehingga diperoleh serbuk yang siap untuk diekstraksi.

Serbuk rimpang kunyit kemudian dimaserasi (direndam) dengan etanol 96% dengan perbandingan 200 g/1000 ml (Balbi-Pena *et al.*, 2006), kemudian diaduk dan *dishaker* selama 24 jam. Simplisia yang telah direndam selanjutnya disaring. Ekstrak etanol rhizoma kunyit selanjutnya dievaporasi dengan menggunakan evaporator pada suhu 50°C. Kemudian diuapkan dengan *waterbath* untuk menguapkan sisa pelarut etanol. Ekstrak yang sudah diuapkan pelarutnya dan berbentuk pasta disimpan pada botol gelap pada suhu 4°C.

g. Pembuatan konsentrasi ekstrak

Ekstrak yang diperoleh dari proses ekstraksi kemudian dilarutkan dengan pelarut DMSO (*Dimethyl sulfoxide*) 1% untuk memperoleh konsentrasi ekstrak yang dikehendaki dalam perlakuan. Larutan yang telah diperoleh disimpan dalam botol kecil bertutup dan berwarna gelap.

2. Tahap Pelaksanaan

a. Uji Hayati Pendahuluan

Untuk menentukan konsentrasi yang paling efektif menghambat pertumbuhan jamur *Curvularia lunata*, maka terlebih dahulu dilakukan uji pendahuluan. Konsentrasi ekstrak yang digunakan adalah 0,02%, 0,04%, 0,06%, 0,08%, 0,10% dan 0,12% (Nurhayati *et al.*, 2008). Untuk kontrol digunakan larutan DMSO 1% dan aquades sebagai kontrol negatif dan Dithane M-45 0,2% sebagai kontrol positif. Penentuan konsentrasi ekstrak dilakukan dengan cara pengenceran dengan melarutkan 1 ml ekstrak 0,02%, 0,04%, 0,06%, 0,08%,

0,10% dan 0,12% dengan 9 ml medium PSA, kemudian disuspensikan. Setelah itu, medium dimasukkan ke dalam cawan Petri secara aseptik kemudian dibiarkan hingga membeku. Setelah medium membeku, diinokulasikan potongan miselium jamur *Curvularia lunata* menggunakan pelubang gabus diameter 0,6 mm, kemudian diinkubasikan selama 4 hari (jumlah spora tertinggi berdasarkan hasil kurva produksi spora). Selanjutnya hitung jumlah spora menggunakan *Haemocytometer* (Aberkane *et al.*, 2002).

Persentase penghambatan diperoleh dengan menggunakan rumus sebagai berikut (Modifikasi Shukla *et al.*, 2011) :

$$FGI (\%) = \frac{Dc - Dt}{Dc} \times 100$$

Keterangan :

FGI : Persentase penghambatan jamur

Dc : Jumlah spora pada kontrol

Dt : Jumlah spora pada perlakuan

Dari data persentase penghambatan ini ditentukan konsentrasi efektif, yaitu konsentrasi minimal ekstrak yang dapat menghambat pertumbuhan jamur lebih dari 50% (Noveriza dan Tombe, 2003).

b. Uji Hayati Pokok

Berdasarkan hasil uji pendahuluan, konsentrasi 0,04% sudah menunjukkan penghambatan terhadap sporulasi jamur *Curvularia lunata* lebih dari 50% dibandingkan dengan kontrol. Maka konsentrasi ekstrak untuk uji hayati pokok

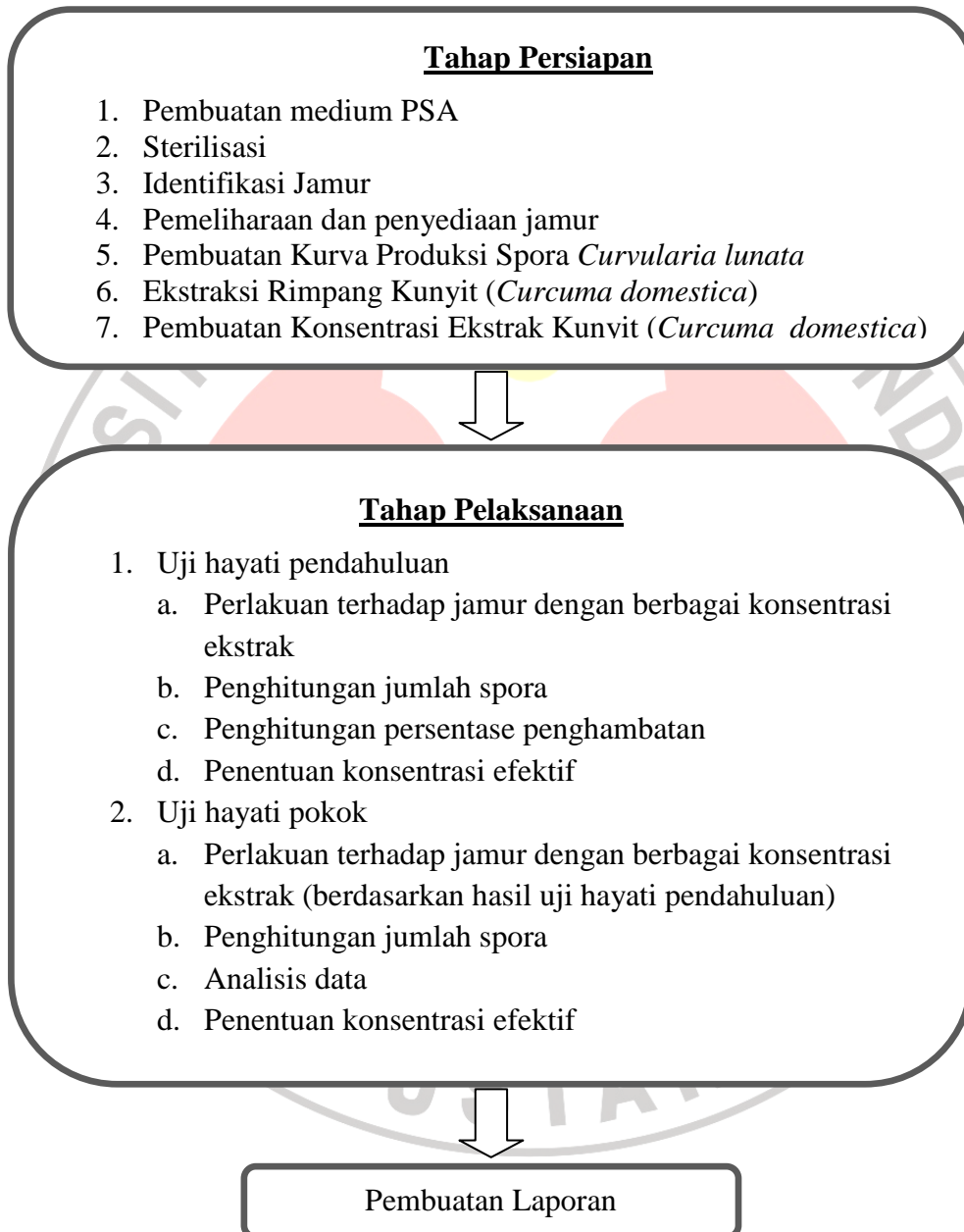
pada perkecambahan spora adalah dengan menaikkan dan menurunkan konsentrasi dari konsentrasi 0,04%. Konsentrasi yang digunakan yaitu 0,03%, 0,04%, 0,05%, 0,06%, 0,07%, dan 0,08%. Untuk kontrol digunakan akuades dan larutan DMSO 1% sebagai kontrol negatif dan fungisida Dithane M-45 0,2 % sebagai kontrol positif. Selanjutnya spora dihitung dengan menggunakan *Haemocytometer* setelah 4 hari, dan dihitung persentase penghambatannya.

3. Analisis Data

Data yang telah diperoleh selanjutnya diuji normalitas (Kolmogorov-Smirnov) dan homogenitas terlebih dahulu. Jika data berdistribusi normal dan homogen, dilanjutkan dengan uji hipotesis one-way ANOVA dan uji Tukey. Jika data berdistribusi normal, tetapi tidak homogen, maka dilanjutkan dengan uji Kruskal-Wallis dan uji Dunnet's.

H. Alur Penelitian

Penelitian yang dilaksanakan dapat dilihat pada Gambar 3.1 di bawah ini:



Gambar 3.1. Bagan Alir Penelitian

