

BAB III METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah eksperimen. Penelitian eksperimen adalah penelitian yang dilakukan dengan mengadakan manipulasi terhadap objek penelitian serta adanya kontrol (Nazir, 1983: 74).

B. Desain Eksperimen

Penelitian dilaksanakan di laboratorium dengan kondisi yang relatif homogen, oleh karena itu digunakan desain penelitian Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 4 kali ulangan. Pada rancangan acak lengkap diusahakan agar derajat bebas galat minimal sama dengan 20 (Sugandi dan Sugiarto, 1995: 8) sehingga penentuan banyaknya pengulangan untuk setiap perlakuan pada uji hayati pokok diperoleh sebagai berikut:

$$t(r-1) \geq 20$$

$$7(r-1) \geq 20$$

$$(r-1) \geq 2,857$$

$$r \geq 3,857$$

Berdasarkan perhitungan di atas, maka pengulangan yang harus dilakukan paling sedikit empat kali, oleh karena itu dalam penelitian ini dilakukan pengulangan sebanyak empat kali. Pada penelitian ini terdapat dua variabel, yaitu konsentrasi ekstrak kunyit sebagai variabel bebas dan diameter koloni

jamur *Fusarium* sp. yang ditumbuhkan dalam medium *Potato Sucrose Agar* (PSA) yang telah diberi konsentrasi ekstrak tertentu sebagai variabel terikat.

Jumlah kelompok percobaan atau plot disusun secara berurutan dari nomor 1 sampai 28, kemudian secara random kita tentukan jenis perlakuan yang kita lakukan untuk masing-masing plot tersebut. Setelah dilakukan pengundian dihasilkan rancangan penelitian sebagai berikut:

Tabel 3.1 Rancangan penelitian

D1	B2	C2	A4	F2	G2	E4
F4	E3	E1	B3	C4	A2	G3
G1	A1	C1	C3	G4	D2	F1
B4	E2	D3	F3	B1	A3	D4

Keterangan :

A: kontrol pelarut (DMSO 1 %, konsentrasi ekstrak 0,00%)

B: konsentrasi ekstrak 0,12 % b/v

C: konsentrasi ekstrak 0,14 % b/v

D: konsentrasi ekstrak 0,16 % b/v

E: konsentrasi ekstrak 0,18 % b/v

F: konsentrasi ekstrak 0,20 % b/v

G: Aquades (konsentrasi ekstrak 0,00% b/v)

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi dalam penelitian ini adalah jamur kelas Deuteromycetes spesies *Fusarium* sp. yang diinkubasi pada suhu kamar selama 7 x 24 jam di laboratorium mikrobiologi UPI yang berasal dari BALITSA Lembang..
2. Sampel diambil dari isolasi biakan jamur *Fusarium* sp. pada medium PSA.

D. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei 2007 sampai dengan bulan Januari 2008 di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Pendidikan Biologi Fakultas MIPA UPI. Penelitian yang dilakukan meliputi uji hayati ekstrak kunyit terhadap pertumbuhan jamur *Fusarium* sp. secara *in vitro*.

E. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari alat-alat elektrik, alat-alat non elektrik dan alat-alat gelas. Alat – alat elektrik diantaranya adalah *blender*, *waterbath*, autoklaf, timbangan analitik, *magnetic stirrer with hot plate*, *vacum rotary evaporator* dan mikroskop, sedangkan alat-alat nonelektrik diantaranya pelubang gabus, penggaris, pH indikator, gunting, pisau, kertas saring, saringan, aluminium foil, plastik, solatip kertas dan karet. Alat-alat gelas diantaranya tabung reaksi, cawan Petri, gelas ukur, labu Erlenmeyer, gelas kimia, pipet tetes, pipet gondok,

batang penaduk, jarum inokulasi, lampu spirtus, botol kecil, gelas objek dan gelas penutup. Daftar alat selengkapnya dapat dilihat pada lampiran 3.1.

2. Bahan

Bahan-bahan utama yang diperlukan pada penelitian ini adalah rimpang kunyit (*Curcuma domestica* Val.) yang diperoleh dari pasar Geger Kalong Bandung, biakan murni jamur *Fusarium* sp. yang diperoleh dari BALITSA (Balai Penelitian Tanaman Sayuran) Lembang, medium PSA (*Potato Sucrose Agar*), HCl 1 M, NaOH 1 M, etanol 96 % (teknis), DMSO (*Dimethylsulfoksida*) 99,9% (teknis). Daftar bahan selengkapnya dapat dilihat pada lampiran A.

F. Prosedur Penelitian

1. Tahap Persiapan

a. Pembuatan Medium PSA (*Potato Sucrose Agar*)

Medium yang digunakan untuk pertumbuhan jamur *Fusarium* dalam penelitian ini adalah PSA. Cara membuat PSA adalah sebagai berikut: sebanyak 200 gram kentang dipotong kecil-kecil kemudian direbus dalam 1000 ml akuades, setelah kentangnya empuk lalu disaring sehingga diperoleh ekstrak kentang. Ekstrak tersebut dilarutkan dalam akuades sampai mencapai 1000 ml, dua puluh gram sukrosa dan 15 gram agar-agar dimasukkan ke dalam gelas kimia kemudian ditambahkan dengan 1000 mililiter ekstrak kentang, diaduk menggunakan batang pengaduk. Suspensi tersebut dipanaskan sampai mendidih selama 20

menit dengan menggunakan *magnetic stirrer with hotplate* agar diperoleh medium yang homogen, setelah mendidih medium diangkat dan diukur pHnya dengan pH indikator kemudian diatur dengan ditambahkan HCl 1 M atau NaOH 1 M sehingga diperoleh pH 5,6. Medium yang sudah jadi tersebut dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak sembilan mililiter.

b. Sterilisasi

Semua media, bahan dan alat tahan panas yang akan digunakan disterilkan dengan autoklaf menggunakan uap air jenuh bertekanan 1,5 kg/cm² dan pada suhu 121° C selama 15 menit, sedangkan untuk alat yang tidak tahan panas cukup dibilas dengan alkohol 70 %.

c. Pemeliharaan Jamur

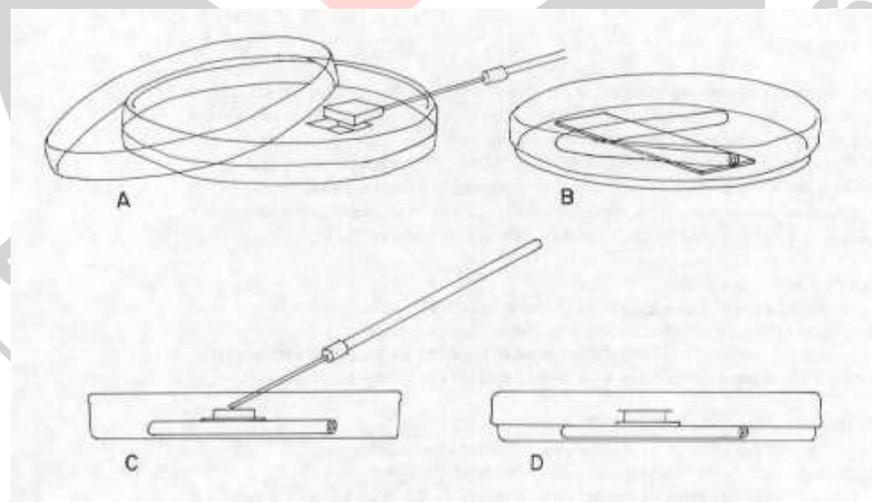
Jamur yang terdapat pada stok awal ditumbuhkan dalam medium PSA di cawan Petri selama 7 hari pada suhu kamar, selanjutnya disimpan pada suhu 5° C. Setiap bulan dimudakan kembali.

d. Penyediaan Jamur *Fusarium* sp.

Umur inokulum jamur *Fusarium* sp. yang digunakan adalah tujuh hari (Djatnika, 2003: 213). Jamur yang sudah dimudakan ditumbuhkan dalam medium PSA pada cawan Petri diameter sembilan sentimeter, diinkubasi pada suhu kamar selama 7 hari dan siap diberi perlakuan.

e. Pengamatan Mikroskopis Jamur *Fusarium* sp.

Pengamatan mikroskopis meliputi pengamatan morfologi dan pengukuran jamur melalui *slide culture*. *Slide culture* dibuat dengan meletakkan objek gelas pada cawan Petri berisi kertas saring yang diberi air untuk mendapatkan kelembaban. Penyangga objek gelas berbentuk V atau segitiga diletakkan di dasar cawan Petri. Kemudian medium agar steril yang telah beku berukuran $\pm 1 \text{ cm}^2$ diletakkan pada objek gelas. Selanjutnya jamur *Fusarium* sp. diinokulasikan di keempat sudut agar tadi lalu ditutup dengan *cover glass*. Setelah beberapa hari *slide culture* tadi dapat diamati dengan mikroskop. Tahapan pembuatan *slide culture* dapat dilihat pada gambar 3. 3.



Gambar 3.1 Tahapan pembuatan *slide culture* A. agar steril dipotong $\pm 1 \text{ cm}^2$, B. agar diletakkan pada gelas objek, C. agar diinokulasi dengan jamur, D. gelas objek ditutup dengan *cover glass*

(sumber:<http://www.botany.utoronto.ca/researchlabs/MallochLab/Malloch/Moulds/Examination.html>)

Pengukuran dilakukan dengan menggunakan mikrometer, meliputi pengukuran panjang, lebar mikrokonidia dan makrokonidia, diameter klamidospora. Sebelum pengukuran jamur dimulai, terlebih dahulu dilakukan kalibrasi mikrometer dengan melakukan penyesuaian skala mikrometer okular dan mikrometer pentas (Hadioetomo, 1993: 91). Setelah didapat faktor kalibrasi mikrometer okular pada kekuatan perbesaran 400 x, kemudian dilakukan pengukuran jamur *Fusarium* sp.

f. Ekstraksi Rimpang Kunyit (*C. domestica* Val.)

Ekstrak tanaman yang digunakan adalah ekstrak kasar dengan menggunakan pelarut etanol dalam ekstraksi. Metode ekstraksi yang digunakan adalah ekstraksi tahap awal prosedur ekstraksi dari Harborne (1987: 8) yaitu maserasi. Rimpang kunyit sebagai bahan simplisia yang diekstraksi dicuci terlebih dahulu dengan air sampai bersih. Bahan kemudian dipotong-potong setebal 0,5 cm. Selanjutnya bahan dikeringkan di udara terbuka yang tidak terdedah cahaya matahari langsung pada suhu kamar. Hal ini dilakukan agar senyawa-senyawa yang terkandung dalam rimpang kunyit tersebut tidak rusak. Bahan yang telah kering kemudian dihancurkan dengan blender sampai menjadi serbuk, tujuannya adalah untuk memudahkan penetrasi larutan yang digunakan dalam ekstraksi. Serbuk kunyit kemudian dimaserasi dengan etanol 96 % selama 24 jam, lalu diaduk dan disaring. Ampas yang diperoleh dimaserasi lagi dengan etanol 96 % selama 24 jam kemudian disaring kembali. Maserasi dilakukan 5 x 24 jam. Hasil penyaringan

kemudian digabungkan, selanjutnya diuapkan dengan *vacum rotary evaporator* sampai diperoleh volume agak pekat. Hasil ekstrak yang masih mengandung pelarut tadi diuapkan kembali dengan menggunakan *waterbath* pada suhu 50° C sampai berubah menjadi pasta. Pasta yang diperoleh merupakan ekstrak kasar yang digunakan selanjutnya dalam penelitian ini. Pembuatan konsentrasi dilakukan dengan mengencerkan ekstrak kunyit dengan pelarut DMSO 1 %.



Gambar 3.2 Serbuk kunyit



Gambar 3.3 Pasta hasil ekstraksi rimpang kunyit

2. Tahap Pelaksanaan

a. Uji Hayati pada Penelitian Pendahuluan

Uji hayati terhadap koloni jamur *Fusarium* sp. diawali dengan membuat biakan jamur tersebut dalam beberapa cawan Petri. Kultur murni dibiakkan selama tujuh hari, kemudian dibuat potongan-potongan miselium beserta agarnya dengan menggunakan pelubang gabus diameter enam millimeter. Potongan jamur telah siap diinokulasi ke dalam medium perlakuan. Satu milliliter ekstrak dengan konsentrasi 0,2 %, 0,4 %, 0,8 %, 1,6 % dimasukkan ke dalam cawan Petri, lalu ke dalam cawan Petri yang berisi ekstrak tersebut dituangkan PSA yang belum membeku (45° C) sebanyak sembilan milliliter. Hal ini dilakukan untuk memperoleh konsentrasi ekstrak 0,02 %, 0,04 %, 0,08 % dan 0,16 % kemudian cawan digoyang-goyangkan sampai larutan homogen dan dibiarkan membeku. Masing-masing cawan yang telah berisi medium PSA dan ekstrak diinokulasi dengan potongan miselium jamur *Fusarium* sp. yang telah disediakan. Cawan Petri yang telah berisi jamur *Fusarium* sp. kemudian diinkubasi selama lima hari, kemudian diukur diameter pertumbuhan koloni jamur yang terbentuk dengan penggaris.

Uji pendahuluan digunakan untuk memperoleh konsentrasi ekstrak rimpang kunyit yang mulai menghambat pertumbuhan jamur *Fusarium* sp. Ekstrak rimpang kunyit diencerkan dengan menggunakan pelarut DMSO 1 % karena terdapat fraksi yang tidak larut dalam air. Untuk mendapatkan konsentrasi ekstrak 0,2; 0,4; 0,8; 1,6 % (b/v)

sebanyak 1 ml dibutuhkan 0,1; 0,2; 0,4; dan 0,8 ml larutan ekstrak kunyit 2 % kemudian ditambahkan DMSO 10 % sampai 1 ml. Mula-mula dilakukan pengenceran dengan jarak cukup jauh, ditentukan hingga konsentrasi berapa ekstrak masih memiliki aktivitas untuk menghambat pertumbuhan jamur, kemudian dilakukan pengenceran dengan jarak yang lebih kecil. Untuk uji hayati pada penelitian pokok selanjutnya aktivitas hambatan pertumbuhan dari tiap-tiap pengenceran diamati dan ditentukan konsentrasi terkecil yang masih bisa menghambat pertumbuhan jamur lebih dari 50 %.

b. Uji Hayati pada Penelitian Pokok

Uji ini dilakukan seperti langkah – langkah pada uji hayati pendahuluan dengan menggunakan konsentrasi hasil dari uji penelitian pendahuluan. Konsentrasi yang dijadikan acuan pada penelitian pokok yaitu konsentrasi ekstrak kunyit 0,16 %, karena pada konsentrasi 0,16 % ekstrak kunyit memperlihatkan adanya hambatan paling besar terhadap jamur *Fusarium* sp., dari konsentrasi 0,16 % tersebut diperoleh konsentrasi ekstrak untuk uji penelitian pokok sebesar 0,12; 0,14; 0,16; 0,18; dan 0,20 %. Aktivitas daya hambat pertumbuhan jamur dari setiap konsentrasi perlakuan kemudian diamati dan diukur dengan menggunakan penggaris.

G. Analisa Data

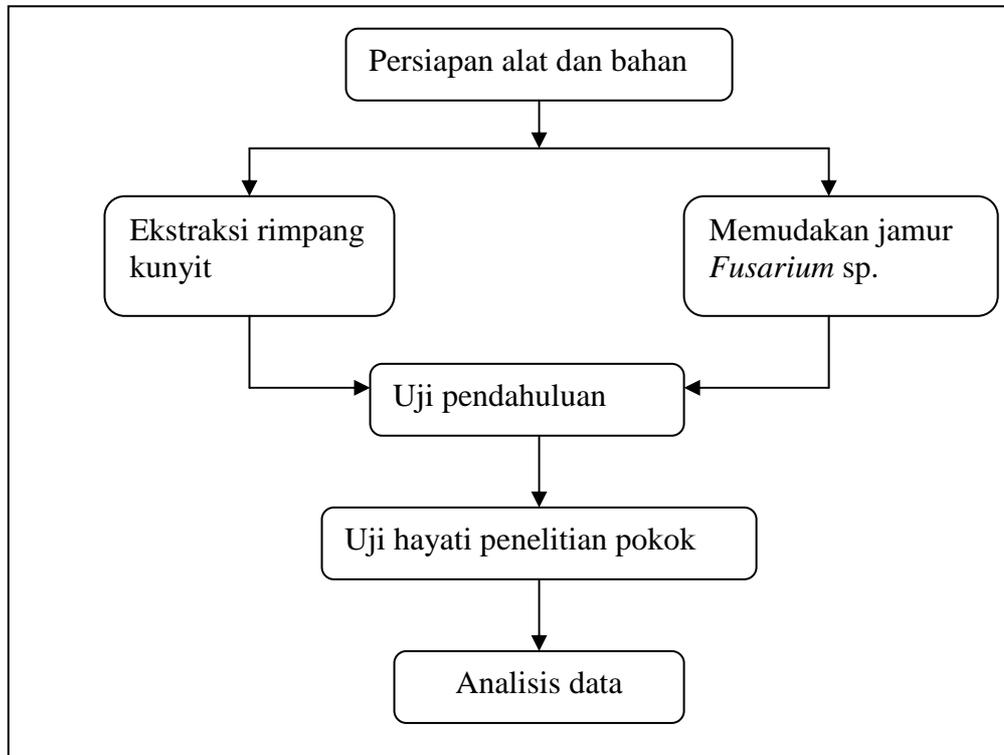
Data yang diperoleh dari penelitian ini yaitu berupa rata-rata diameter pertumbuhan koloni jamur *Fusarium* sp. Kemudian data hasil uji hayati pokok dianalisis dengan menggunakan program SPSS versi 12.0 for window, dianalisis menggunakan One Way ANOVA. Perbedaan rata-rata dibandingkan dengan menggunakan uji Tukey. Persentase penghambatan dihitung dengan rumus Pandey *et al.* (1982) dalam Zambonelli *et al.* (1996) dalam Noveriza dan Tombe (2003: 3):

$$\% \text{ penghambatan} = \frac{a - b}{a} \times 100 \%$$

keterangan: a = diameter koloni jamur kontrol

b = diameter koloni jamur perlakuan

H. Alur Penelitian



Gambar 3.4 Alur Penelitian