

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah jenis penelitian eksperimen. Termasuk penelitian eksperimen karena observasi di bawah kondisi buatan (*artificial condition*) dimana kondisi tersebut dibuat dan diatur. Penelitian ini dilakukan dengan mengadakan manipulasi objek penelitian serta adanya kontrol sebagai suatu perbandingan dalam eksperimen (Nazir, 2003:63). Objek dalam penelitian ini adalah perkecambahan makrokonidia *Fusarium oxysporum* pada medium cair *Potato Sukrosa* dengan penambahan ekstrak rimpang kunyit berbagai konsentrasi. Kontrol negatif dalam penelitian ini adalah perkecambahan makrokonidia *F. oxysporum* pada medium cair *Potato Sukrosa* tanpa penambahan ekstrak rimpang kunyit atau dengan penambahan akuades steril dan Dimetil Sulfoksida (DMSO) 1%. Sedangkan kontrol positif dalam penelitian ini adalah perkecambahan makrokonidia *F. oxysporum* pada medium cair *Potato Sukrosa* tanpa penambahan ekstrak rimpang kunyit atau dengan penambahan fungisida Dithane M-45 0,2% (mengandung 80% Mancozeb).

B. Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan adalah desain Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri dari 9 perlakuan dengan menggunakan berbagai konsentrasi ekstrak rimpang kunyit, DMSO 1% dan akuades steril sebagai kontrol negatif serta fungisida Dithane M-45 0,2 % sebagai kontrol positif (Harish *et al.*, 2004:367). Pada penelitian ini terdapat dua variabel penelitian yaitu, variabel bebas dan variabel terikat. Variabel bebasnya yaitu konsentrasi ekstrak rimpang kunyit pada medium cair *Potato Sukrosa*. Sedangkan variabel terikatnya yaitu jumlah perkecambahan makrokonidia *F. oxysporum*.

Setiap perlakuan dalam penelitian ini mendapatkan pengulangan yang diperoleh dari rumus pengulangan RAL sebagai berikut (Gomez, 1995) : $(t)(r) - 1 \geq 20$, dimana t adalah perlakuan dan r adalah banyaknya pengulangan

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

$$(9)(r) - 1 \geq 20$$

$$9r \geq 21, \text{ maka } r \geq 2,3$$

Dibulatkan menjadi 3

Berdasarkan penghitungan di atas, maka banyaknya pengulangan yang harus dilakukan adalah tiga kali. Jika A adalah konsentrasi perlakuan untuk ekstrak dengan konsentrasi 0% maka pengulangannya adalah A_n dimana n menunjukkan urutan pengulangan. Jumlah kelompok percobaan atau plot disusun secara acak dari no 1 sampai 27, sebagai berikut :

Tabel 3.1 Desain Rancangan Acak Lengkap

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

Keterangan :

- A : Kontrol negatif akuades steril F : Konsentrasi larutan 0,03 % (b/v)
 B : Kontrol negatif DMSO 1 % G : Konsentrasi larutan 0,04 % (b/v)
 C : Kontrol positif Dithane M-45 0,2% H : Konsentrasi larutan 0,05 % (b/v)
 D : Konsentrasi larutan 0,01 % (b/v) I : Konsentrasi larutan 0,06 % (b/v)
 E : Konsentrasi larutan 0,02 % (b/v)

C. Populasi dan Sampel

- Populasi : Seluruh spora jamur *F. oxysporum* yang diambil dari biakan murni jamur *F. oxysporum*.
- Sampel : Spora jamur *F. oxysporum* yang diberi perlakuan dengan ekstrak rimpang kunyit (*C. domestica* Val) pada konsentrasi tertentu.

D. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Februari sampai dengan bulan Juni 2009 di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Pendidikan Biologi FPMIPA UPI. Jamur *F. oxysporum* yang digunakan untuk penelitian diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman Sayuran (BALITSA).

E. Alat dan Bahan

Alat-alat dan bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini tercantum pada Tabel 3.2. dan 3.3.

Tabel 3.2 Daftar Alat

No	Nama alat	Jumlah	Spesifikasi
1	Alumunium voil	1 pak	25 sq.ft (7,6 m x 30 cm)
2	Autoklaf	1 buah	Merek EYELE model HL36 AE
3	Batang pengaduk	1 buah	Berbahan gelas
4	Beaker glass	@1 buah	Gelas pyrex ukuran 1000 ml dan 500 ml
5	Blender	1 buah	Merek National
6	Botol kecil	10 buah	Kapasitas 25 ml
7	Cawan Petri	5 buah	Gelas pyrex
8	GCMS	1 unit	GC-17A
9	Gelas ukur	@1 buah	Pyrex kapasitas 10 ml dan 250 ml
10	Gelas Objek dan gelas penutup	4 buah	25,4 x 76,2 mm ($1^1 \times 3^1$) dan 1-1,2 mm
11	Haemocytometer	1 buah	0,100 mm tiefe depth profondeur
12	Jarum inokulasi	1 buah	Panjang 15 cm
13	Kain kasa	secukupnya	Steril
14	Kapas	secukupnya	Kapas pembalut
15	Kertas saring	secukupnya	Whatman no 1
16	Labu Erlenmeyer	30 buah	Pyrex kapasitas 5 ml
17	Lampu spirtus	2 buah	Kapasitas 200 ml
18	Magnetik stirrer	1 buah	Model RCH-3
19	Makropipet	@1 buah	Kapasitas 1 ml, 5 ml, dan 9 ml
20	Mikroskop	1 buah	1000 x perbesaran
21	Neraca digital	1 unit	Merek AND ketelitian 0,001 mg
22	Pisau	1 buah	Tajam
23	Pelubang gabus	1 buah	6 mm

No	Nama alat	Jumlah	Spesifikasi
24	Rak tabung	4 buah	Berbahan kayu
25	Shaker	1 unit	Eyela Multi Shaker MMS
26	Tabung reaksi	50 buah	Gelas pyrex
27	Vortexs	1 unit	Sibata Test Tube Mixe ⁻¹

Tabel 3.3 Daftar Bahan

No	Nama Bahan	Jumlah	Spesifikasi
1	Agar-agar	15 gram	Difco Agar
2	Akuades steril	2000 ml	Disterilkan dengan autoklaf
3	Dithane M-45	2 gram	mengandung 80% Mancozeb
4	DMSO	25 ml	Konsentrasi 1 %
5	Etanol	1000 ml	Konsentrasi 70% dan 96 %
6	Jamur <i>F. oxysporum</i>	1 stok kultur	Koleksi BALITSA
7	Kunyit	2 kg	Diperoleh dari pertanian di daerah Padalarang
8	Kentang	200 gram	
9	NaCl	1 gram	Teknis
10	Sukrosa	200 gram	Teknis

F. Prosedur Kerja

1. Tahap Persiapan

a. Pembuatan Medium PSA

Medium yang digunakan untuk pertumbuhan jamur adalah medium PSA (*Potato Sukrosa Agar*). Pembuatan medium PSA adalah sebagai berikut : kentang sebanyak 200 g dipotong kecil-kecil kemudian direbus dalam 1000 ml akuades, setelah kentang empuk kemudian disaring sehingga didapatkan ekstrak kentang. Ekstrak kentang kemudian dilarutkan dalam akuades sampai volumenya 1000 ml, selanjutnya ditambahkan 20 g sukrosa dan 15 g agar-agar kemudian diaduk dan

dipanaskan dengan menggunakan *magnetic stirrer with hot plate* selama 20 menit. Setelah mendidih medium diangkat dan diukur pH nya dengan menggunakan pH meter dan ditambahkan HCl 1 M atau NaOH 1 M sampai pH medium mencapai 5,6, kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan disterilisasi dengan menggunakan autoklaf (Gandjar *et al.*, 1999:134).

b. Sterilisasi

Semua alat gelas tahan panas, bahan dan media yang tidak akan rusak jika terkena panas disterilkan dengan autoklaf. Sterilisasi dengan autoklaf menggunakan uap air bertekanan tinggi pada suhu 121 °C selama 15 menit. Alat-alat yang tidak tahan panas disterilkan dengan alkohol.

2. Tahap Pra Penelitian

a. Identifikasi Jamur

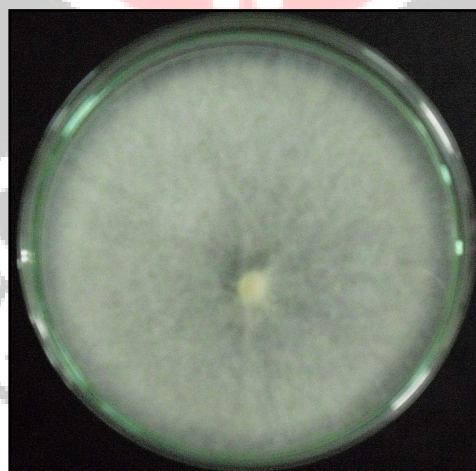
Identifikasi jamur *F. oxysporum* dilakukan melalui pengamatan morfologi secara makroskopis dan mikroskopis. Pengamatan makroskopis dilakukan dengan mengamati warna dan bentuk koloni jamur *F. oxysporum*. Sedangkan pengamatan mikroskopis dilakukan dengan mengamati struktur konidia, bentuk spora dan hifa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

Adapun prosedur dalam pembuatan slide culture yaitu, cawan Petri untuk *slide culture* steril berisi kain kasa, sumpit kayu yang dibentuk segitiga, satu buah kaca objek dan dua buah kaca penutup. Medium PSA steril sebanyak 5 ml dicairkan kemudian dituangkan ke dalam cawan Petri steril. Selanjutnya setelah medium PSA membeku, dibuat kotak agar dengan ukuran 3x3 mm untuk

kemudian disimpan di atas kaca objek. Setelah itu, miselium jamur *F. oxysporum* ditanamkan di atas kotak agar dengan menggunakan lup inokulasi dan ditutup dengan kaca penutup (Heritage, 1996:145). Jamur ditumbuhkan selama 1 minggu dengan kondisi lembab, kemudian diamati dengan menggunakan mikroskop.

b. Pemeliharaan Jamur

Jamur patogen yang digunakan dalam penelitian ini adalah kultur murni jamur *F. oxysporum* yang diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman Sayuran (BALITSA) Lembang dan ditumbuhkan pada media PSA. Apabila jamur akan digunakan dalam pengujian maka jamur terlebih dahulu dimudakan. Proses pemuasaan jamur adalah sebagai berikut : biakan jamur *F. oxysporum* diinokulasikan pada medium PSA dalam cawan Petri dan diinkubasi pada suhu ruangan selama 7 hari (Gambar 3.1). Selanjutnya disimpan pada suhu 4 °C.

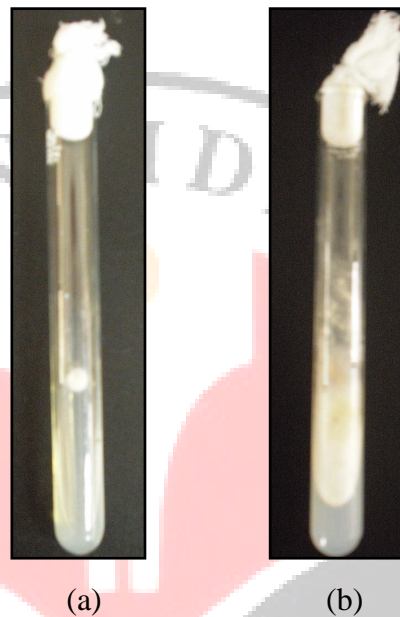


Gambar 3.1 Kultur jamur *Fusarium oxysporum*

c. Perbanyak Kultur

Proses perbanyak dilakukan untuk mendapatkan jamur umur empat hari yang akan digunakan dalam penelitian. Adapun cara yang dilakukan yaitu :

dengan menggunakan pelubang gabus diameter 0,6 mm potongan miselium jamur *F. oxysporum* dari koloni yang tumbuh pada cawan Petri diinokulasikan pada medium PSA miring dalam tabung reaksi (Gambar 3.2.a) dan diinkubasi pada suhu ruangan (Gambar 3.2.b).



Gambar 3.2 (a) Potongan miselium yang diinokulasikan pada PSA miring
(b) Kultur jamur *F. oxysporum* umur empat hari

d. Identifikasi Rimpang Kunyit

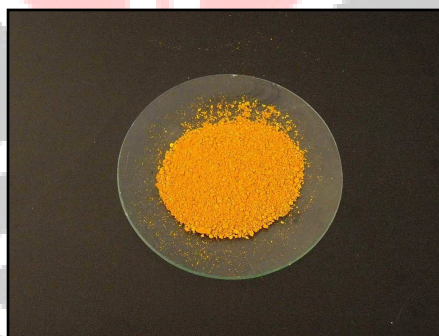
Untuk memastikan bahwa spesies yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Curcuma domestica* Val. maka terlebih dahulu dilakukan identifikasi rimpang kunyit. Rimpang kunyit diamati bentuk morfologi dan warnanya.

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

Rimpang kunyit yang akan digunakan sebagai simplisia dibersihkan dengan mencucinya menggunakan air keran, kemudian dipotong-potong dan dikeringkan pada tempat yang tidak langsung terkena matahari dengan cara diangin-anginkan

supaya terdapat sirkulasi udara yang baik. Pengeringan ini bertujuan untuk memperoleh bahan tumbuhan yang tidak mudah rusak. Proses pengeringan selesai apabila rimpang telah kering, selanjutnya rimpang dihancurkan dengan menggunakan blender sehingga diperoleh serbuk yang siap untuk diekstraksi.

Serbuk rimpang kunyit (Gambar 3.3) kemudian dimaserasi (direndam) dengan etanol 96% yaitu 200 g/1000 ml (Balbi-Pena *et al.*, 2006:311), kemudian diaduk dan dishaker minimal 24 jam. Simplisia yang telah direndam selanjutnya disaring dengan menggunakan kertas saring Whatman No 1. Ekstrak etanol rimpang kunyit selanjutnya dievaporasi dengan menggunakan *Rotary evaporator* (Lampiran 4) 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.



Gambar 3.3 Serbuk rimpang kunyit (*C. domestica* Val)

f. Pembuatan Konsentrasi Ekstrak

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

g. Analisis Ekstrak dengan GCMS

Pada sampel ekstrak rimpang kunyit dilakukan identifikasi dengan menggunakan alat GCMS (Lampiran 5.1) untuk mengetahui jenis senyawa-senyawa yang terkandung dalam ekstrak tersebut. Adapun sampel yang dianalisis disiapkan dengan cara : ekstrak rimpang kunyit sebanyak 0,1 gram dilarutkan dalam 2 ml etanol *Pro Analyst (PA)* kemudian dimasukkan ke dalam botol gelap. Selanjutnya dianalisis dengan GCMS di Jurusan Pendidikan Kimia FPMIPA UPI. Adapun kondisi analisis GCMS sebagai berikut : temperatur injector dan detector masing-masing 250 °C dan 230 °C, temperatur awal 60 °C, volume injeksi 1µl, dan waktu analisa selama 30 menit (Natta *et al.*, 2008:338).

3. Tahap Pelaksanaan

a. Pembuatan Kurva Produksi Makrokonidia *F. oxysporum*

Pembuatan kurva produksi makrokonidia bertujuan untuk menentukan umur optimum dari inokulum jamur berdasarkan produksi spora makrokonidia. Sebanyak 10 ml larutan garam fisiologis (NaCl 0,85%) dimasukkan ke dalam biakan jamur yang telah dikultur pada medium PSA miring. Dengan menggunakan jarum ose, spora dilepaskan dengan cara menggosoknya secara perlahan sehingga diperoleh suspensi spora. Setelah itu dihomogenkan dengan vorteks dan dipindahkan ke dalam tabung reaksi kosong kemudian dipipet dan ditetaskan satu tetes pada haemocytometer, selanjutnya dihitung jumlah makrokonidia *F. oxysporum*. Penghitungan jumlah makrokonidia ini dilakukan

setiap hari selama 10 hari dengan cara yang sama sehingga akan diperoleh kurva produksi makrokonidia *F. oxysporum*.

b. Sampling Waktu Perkecambahan Spora

Tes perkecambahan dilakukan pada makrokonidia *F. oxysporum* selama periode waktu 24 jam. Tes perkecambahan ini bertujuan untuk menentukan kapan waktu perkecambahan makrokonidia jamur *F. oxysporum* mencapai puncaknya. Disiapkan medium cair *Potato Sukrosa* sebanyak 10 ml. Spora jamur dipanen dari biakan yang dikultur pada medium PSA miring dengan menambahkan medium cair *Potato Sukrosa* ke dalam tabung biakan sehingga diperoleh konsentrasi suspensi 4×10^6 spora/ml. Setelah itu dimasukkan ke dalam Erlenmeyer steril, kemudian diinkubasi pada suhu ruangan dan dishaker dengan kecepatan 200 rpm. Penghitungan perkecambahan dilakukan setiap dua jam sekali selama 24 jam dimulai dari 4 jam setelah penyimpanan. Penghitungan dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan. Jumlah makrokonidia berkecambah ditentukan dengan pengamatan mikroskopis dengan menggunakan haemocytometer (modifikasi Yulia, 2006:219; Rukayadi dan Hwang, 2007:435).

c. Uji Hayati Pendahuluan

Untuk menentukan konsentrasi paling efektif yang dapat menghambat perkecambahan makrokonidia *F. oxysporum*, maka terlebih dahulu dilakukan uji pendahuluan. Konsentrasi ekstrak yang digunakan adalah 0,00%, 0,04%, 0,06%, 0,08%, 0,10%, dan 0,12% (Wasilah, 2008).

Uji aktivitas perkecambahan makrokonidia *F. oxysporum* dilakukan dengan cara pengenceran yaitu dengan melarutkan 1 ml ekstrak konsentrasi 0,0%, 0,4%,

0,6%, 0,8%, 1,0%, dan 1,2%. masing-masing dengan 9 ml medium cair *Potato Sukrosa* yang berisi konsentrasi 4×10^6 spora/ml ke dalam Erlenmeyer steril. Kultur dengan volume akhir 10 ml selanjutnya diinkubasi pada suhu ruangan dan dishaker dengan kecepatan 200 rpm selama 14 jam. Sebagai kontrol, digunakan DMSO 1%, akuades steril dan Dithane M-45 0,2%. Selanjutnya setelah 14 jam diinkubasi ditetaskan laktofenol *cotton blue* pada semua kultur uji. Hal ini dilakukan untuk menghentikan perkecambahan spora secara serentak. Penghitungan perkecambahan makrokonidia ditentukan dengan pengamatan mikroskopis dengan menggunakan haemocytometer (modifikasi Rukayadi dan Hwang, 2007:435).

Pada uji hayati pendahuluan, konsentrasi ekstrak yang digunakan mempunyai rentang yang cukup jauh. Konsentrasi ekstrak yang dapat menghambat perkecambahan makrokonidia pada uji hayati pendahuluan akan diperkecil lagi rentangnya untuk digunakan pada uji hayati pokok sehingga akan didapatkan konsentrasi paling efektif untuk menghambat perkecambahan makrokonidia jamur *F. oxysporum*.

d. Uji Hayati Pokok

Uji aktivitas antifungi dilakukan dengan modifikasi metode Rukayadi dan Hwang *et al.* (2007). Berdasarkan kurva produksi spora dan sampling waktu perkecambahan spora, maka kultur jamur *F. oxysporum* yang digunakan untuk pengujian adalah kultur berumur empat hari dan penghitungan perkecambahan makrokonidia dilakukan pada jam ke-14.

Data yang diperoleh dari penelitian uji hayati pendahuluan merupakan patokan untuk menentukan konsentrasi pada uji hayati pokok. Berdasarkan hasil uji hayati pendahuluan, maka konsentrasi ekstrak yang digunakan pada uji hayati pokok adalah 0,01%, 0,02%, 0,03%, 0,04%, 0,05%, dan 0,06%. Untuk kontrol negatif digunakan DMSO 1% dan akuades steril. Sedangkan untuk kontrol positif digunakan Dithane M-45 0,2%.

Untuk mengetahui aktivitas daya hambat ekstrak rimpang kunyit terhadap perkecambahan makrokonidia, maka dilakukan pengamatan dan penghitungan jumlah makrokonidia berkecambah setelah diinkubasi dan dishaker dengan kecepatan 200 rpm selama 14 jam. Dalam menentukan persentase penghambatan perkecambahan spora dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut (Mohana, 2007:123) :

$$\% \text{ Penghambatan} = \frac{C - T}{C} \times 100 \%$$

Keterangan :

C : jumlah spora berkecambah pada kontrol

T : jumlah spora berkecambah pada perlakuan

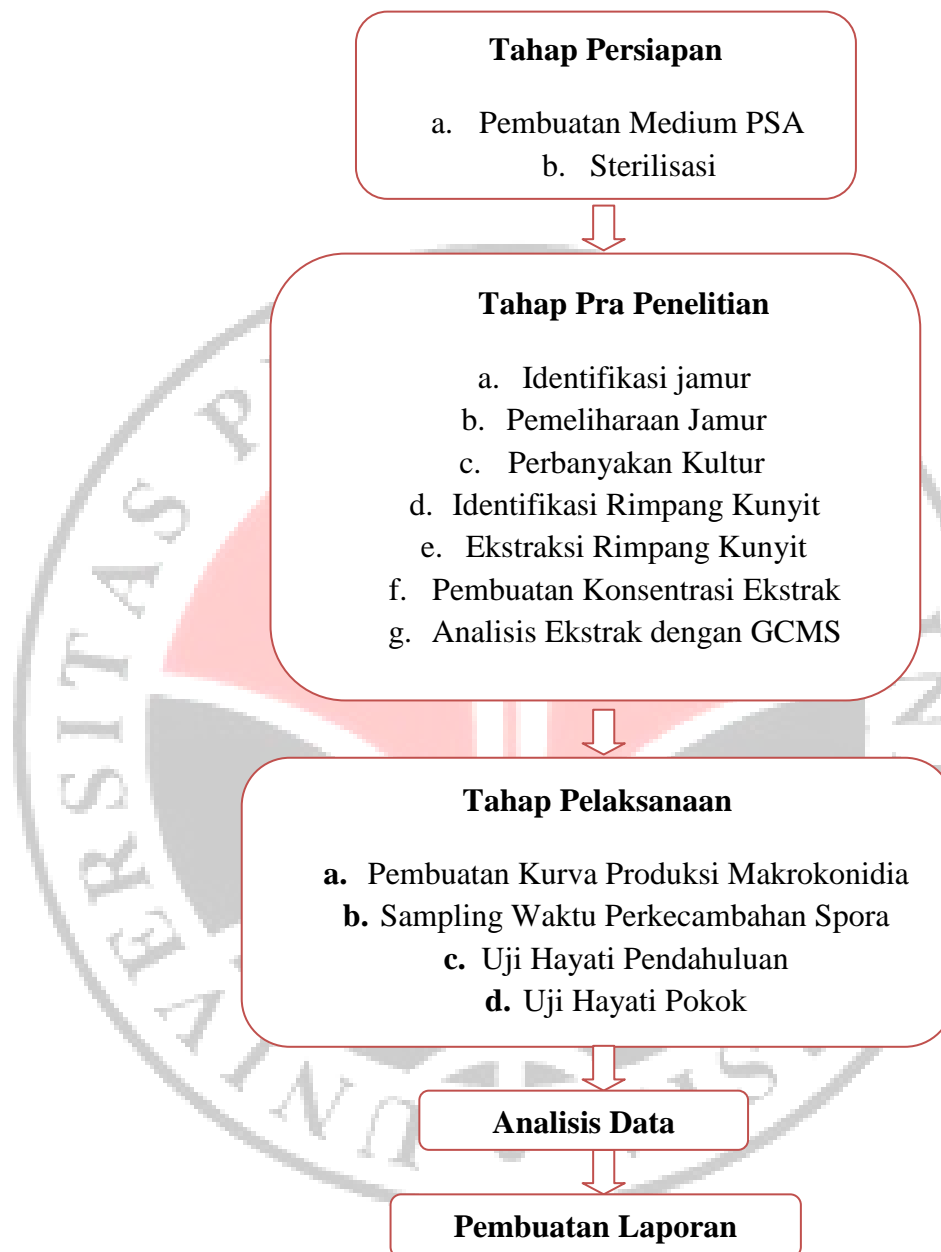
Dari data persentase penghambatan ini ditentukan konsentrasi efektif, yaitu konsentrasi minimal ekstrak yang dapat menghambat pertumbuhan jamur lebih dari 50% (Noveriza dan Tombe, 2003).

4. Analisis Data

Data yang diperoleh dari penelitian ini berupa rata-rata jumlah perkecambahan makrokonidia *F. oxysporum*. Data hasil uji hayati pokok dianalisis dengan menggunakan program SPSS versi 13.0 *for window*. Data yang diperoleh terlebih dahulu dilakukan uji Normalitas (*Kolmogorov smirnov*). Jika data hasil uji normal, maka selanjutnya dilakukan uji Homogenitas (*Levene Test*) untuk mengetahui variasi data hasil eksperimen dan kontrol. Data aktivitas ekstrak rimpang kunyit terhadap perkecambahan makrokonidia *F. oxysporum* berdistribusi normal dan tidak homogen, maka analisis dilanjutkan dengan uji non parametrik *Kruskal-Wallis* untuk menguji hipotesis. Selanjutnya untuk membandingkan data antara kelompok satu dengan kelompok lainnya berbeda signifikan maka dilakukan uji *Dunnnett's T3*.

G. Alur Penelitian

Adapun alur penelitian yang dilakukan yaitu :



Gambar 3.4 Bagan Alir Penelitian