

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Jenis penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimen. Termasuk penelitian eksperimen karena penelitian ini dilakukan dibawah 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 produksi spora jamur *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. dan *Fusarium oxysporum* Schlecht. pada medium *Potato Sucrose Agar* (PSA) yang ditambah ekstrak rimpang kunyit dengan berbagai konsentrasi. Kontrol negatif penelitian berupa produksi spora jamur pada medium PSA ditambah aquades steril dan Dimetil sulfoksida (DMSO) 1 %, sedangkan kontrol positif berupa produksi spora 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. Variabel yang dikendalikan antara lain umur jamur yang digunakan, jenis medium, dan suhu inkubasi.

B. Desain Penelitian

Dalam penelitian ini digunakan desain penelitian Rancangan Acak Lengkap karena penelitian dilakukan dengan kondisi yang relatif homogen di

laboratorium. Penelitian ini menggunakan konsentrasi ekstrak kunyit berdasarkan penelitian sebelumnya pada uji pendahuluan yaitu 0,04%, 0,06%, 0,08%, 0,10%, 0,12%, dan 0,14% untuk jamur *F. oxysporum* (Wasilah, 2008). Pada jamur *C. gloeosporioides* digunakan konsentrasi sebesar 0,20%, 0,30%, 0,40%, 0,50%, dan 0,60% (Hamdiyati *et al.*, 2009).

Jumlah perlakuan yang digunakan pada uji pokok adalah enam konsentrasi ekstrak yang berbeda, dua kontrol negatif dan satu kontrol positif pada masing-masing jamur. Untuk kontrol negatif digunakan DMSO 1 % dan akuades steril, sedangkan untuk kontrol positif digunakan Dithane M-45 0,2%. Konsentrasi ekstrak yang digunakan sesuai dengan hasil uji pendahuluan.

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

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

$$(8)(r) - 1 \geq 20$$

$$8r - 1 \geq 20$$

$$8r \geq 21$$

$$r \geq 2,6$$

Dibulatkan menjadi 3

Berdasarkan perhitungan di atas, maka banyaknya pengulangan yang harus dilakukan adalah paling sedikit tiga kali pada masing-masing jamur. 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 di susun secara acak dari No. 1 sampai 24 adalah sebagai berikut:

Tabel 3.1 Desain Rancangan Acak Lengkap Jamur *C. gloeosporioides*

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

Keterangan :

- A : Kontrol atau aquades steril
 B : Kontrol atau DMSO 1 %
 C : Kontrol positif Dithane M-45 0,2%
 D : konsentrasi larutan 0,20% (b/v)
 E : konsentrasi larutan 0,30% (b/v)
 F : konsentrasi larutan 0,40% (b/v)
 G : konsentrasi larutan 0,50% (b/v)
 H : konsentrasi larutan 0,60% (b/v)

Tabel 3.2 Desain Rancangan Acak Lengkap Jamur *F. oxysporum*

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

Keterangan :

- A : Kontrol atau aquades steril
 B : Kontrol atau DMSO 1 %
 C : Kontrol positif Dithane M-45 0,2%
 D : konsentrasi larutan 0,02% (b/v)
 E : konsentrasi larutan 0,04% (b/v)
 F : konsentrasi larutan 0,06% (b/v)
 G : konsentrasi larutan 0,08% (b/v)
 H : konsentrasi larutan 0,10% (b/v)

C. Populasi dan Sampel

Populasi dan sampel pada penelitian ini adalah

1. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah seluruh spora jamur *C. gloeosporioides* dan *F. oxysporum* Schlecht. yang diambil

dari biakan murni jamur *C. gloeosporioides* dan *F. oxysporum* Schlecht.

2. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah spora jamur *C. gloeosporioides* dan *F. oxysporum* yang diberi perlakuan dengan ekstrak rimpang kunyit (*C. domestica*) pada konsentrasi tertentu.

D. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan April sampai dengan bulan Juli 2010 di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Pendidikan Biologi FPMIPA UPI. Jamur *F. oxysporum* dan *C. gloeosporioides* yang digunakan untuk penelitian diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman Sayuran (BALITSA) Lembang, Bandung.

E. Alat dan Bahan Penelitian

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

Tabel 3.3 Daftar alat yang digunakan

No.	Nama alat	Jumlah	Spesifikasi
1.	Alumunium foil	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	@ 2 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.	Gelas ukur	@1 buah	Pyrex kapasitas 10 ml dan 250 ml
9.	Gelas Objek dan gelas penutup	4 buah	25,4 x 76,2 mm (1' x 3 ') dan 1-1,2 mm
10	Haemocytometer	1 buah	
11	Jarum inokulasi	1 buah	Panjang 15 cm
12	Labu erlenmeyer	2 buah	Pyrex kapasitas 1000 ml
13	Lampu spirtus	2 buah	Kapasitas 200 ml

14	Magnetic stirer	1 buah	Model RCH-3
15	Makropipet	@ 1 buah	Kapasitas 1 ml, 5 ml, dan 9 ml
16	Mikroskop	1 buah	1000 x perbesaran
17	Neraca digital	1 unit	Merek AND ketelitian 0,001 mg
18	Pisau	1 buah	Tajam
19	Pelubang gabus	1 buah	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	Vortex	1 unit	Sibata Test Tube Mixe ¹

Tabel 3.4 Daftar bahan yang digunakan

No.	Nama bahan	Jumlah	Spesifikasi
1.	Agar-agar	15 gram	Difco agar
2.	Akudes steril	2000 ml	Disterilkan dengan autoklaf
3.	Dithane M-45	1 bungkus	mengandung 80% Mancozeb
4.	DMSO	2 gram	Konsentrasi 1%
5.	Ethanol	25 ml	Konsentrasi 70% dan 96 %
6.	Jamur <i>C. gloeosporioides</i>	1 stok kultur	Koleksi BALITSA
7.	Jamur <i>F. oxysporum</i> Schlecht	1 stok kultur	Koleksi BALITSA
8.	Kain kasa	Secukupnya	Steril
9.	Kapas	Secukupnya	Kapas pembalut
10.	Kentang	200 gram	Jenis Dieng
11.	Kertas saring	Secukupnya	Whatman No.1
12.	Kunyit	5 kg	Bagian rimpang
13.	NaCl	1 gram	Teknis
14.	Sukrosa	200 gram	Teknis

F. Langkah kerja

1. Tahap persiapan

a. Pembuatan Medium jamur

Medium yang digunakan dalam pertumbuhan jamur adalah medium PSA (*Potato Sukrose Agar*). Adapun cara pembuatan medium PSA adalah sebagai berikut; sebanyak 200 g kentang dipotong-potong kemudian direbus dalam 1000 ml akuades. Setelah kentang empuk

kemudian disaring untuk mendapatkan ekstrak kentang. Ekstrak selanjutnya dilarutkan dalam akuades hingga volumenya 1000 ml lalu ditambahkan 20 g sukrosa dan 15 g agar-agar. Kemudian dipanaskan dengan menggunakan *magnetic stirrer with hot plate* selama 20 menit. Medium yang telah dipanaskan pH nya diukur dengan menggunakan pH meter dan ditambahkan HCl 1M atau NaOH 1M sampai pH medium mencapai 5,6, kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi masing-masing 9 ml dan disterilisasi menggunakan autoklaf (Gandjar *et al.*, 1999).

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%.

2. Tahap pra-penelitian

a. Identifikasi jamur

Identifikasi jamur *C. gloeosporioides* dan *F. oxysporum* 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 jamur *F. oxysporum* dan *C. gloeosporioides* dengan menggunakan metode *slide culture* secara aseptik.

Cawan Petri untuk *slide culture* steril (yang berisi kertas saring, sumpit kayu yang dibentuk segitiga, satu buah kaca objek dan dua buah kaca penutup) disiapkan (Gambar 3.1). Kemudian medium 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 *C. gloeosporioides* dan *F. oxysporum* ditanamkan di atas kotak agar, menggunakan lup inokulasi dan ditutup dengan kaca penutup. Tetesi kertas saring dengan akuades steril untuk menjaga kelembaban *slide culture*. Kemudian diamati di bawah mikroskop.



Gambar 3.1. Slide culture
(Sumber : Dokumen pribadi)

b. Pemeliharaan dan Penyediaan jamur

Jamur yang berasal dari kultur awal ditumbuhkan dalam medium PSA pada cawan Petri steril selama delapan hari untuk jamur *C. gloeosporioides* (Arhandian, 2009) dan tujuh hari untuk jamur *F. oxysporum* (Wasilah, 2008) pada suhu kamar sampai diperkirakan biakan

jamur pada semua cawan Petri homogen pertumbuhannya. Adapun proses dari pemudaan jamur ialah sebagai berikut : dengan menggunakan pelubang gabus diameter 0,6 mm potongan miselium jamur dari koloni yang tumbuh pada cawan Petri diinokulasikan pada medium PSA yang baru.

c. Identifikasi Rimpang Kunyit

Sebelum digunakan, dilakukan terlebih dahulu identifikasi rimpang kunyit. Rimpang yang digunakan berasal dari daerah Padalarang, Bandung. Rimpang kunyit diamati bentuk morfologi, ukuran dan warnanya. Kunyit yang digunakan dalam penelitian ini adalah bagian rimpang yang berbentuk membulat dengan panjang 1-7 cm dan warna jingga kekuningan.

d. Ekstraksi Rimpang Kunyit

Rimpang kunyit yang akan digunakan sebagai simplisia dibersihkan dengan mencucinya menggunakan air keran. Rimpang yang telah dicuci, dipotong-potong, kemudian dikeringkan pada tempat yang tidak langsung terkena matahari, dikeringkan dengan cara diangin-anginkan supaya terdapat sirkulasi udara yang baik. Pengeringan ini secara tidak langsung bertujuan untuk memperoleh bahan tumbuhan yang berkualitas baik. Proses pengeringan selesai apabila rimpang telah kering. Kemudian potongan rimpang dihancurkan dengan menggunakan blender sehingga diperoleh serbuk yang siap untuk diekstraksi.

Serbuk rimpang kunyit kemudian dimaserasi (direndam) dengan etanol 96% (perbandingan serbuk dengan pelarut yaitu 200g/1000ml) (Balbi-Pena *et al.*, 2006). Kemudian diaduk dan disentrifugasi dengan kecepatan 120rpm selama 24 jam. Simplisia yang telah direndam selanjutnya disaring dengan menggunakan kertas saring Whatman No.1. Ekstrak etanol rimpang 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.

e. Pembuatan Konsentrasi Ekstrak

Ekstrak yang diperoleh dari proses ekstraksi kemudian dilarutkan dengan pelarut DMSO (*Dymethyl sulfoxide*) 1% untuk memperoleh konsentrasi ekstrak yang dikehendaki dalam perlakuan, misalnya untuk mendapatkan konsentrasi 4% sebanyak 1 ml maka diperlukan 0,04 g ekstrak yang diencerkan dengan menggunakan pelarut DMSO 1 % sampai volume 1 ml. Larutan yang telah diperoleh disimpan dalam botol kecil bertutup dan berwarna gelap.

3. Tahap Pelaksanaan

a. Uji Hayati Pendahuluan

Uji hayati pendahuluan dilakukan untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh ekstrak rimpang kunyit dalam menghambat sporulasi *C.*

gloeosporioides dan *F. oxysporum*. Konsentrasi ekstrak yang digunakan untuk jamur *C. gloeosporioides* adalah 0,20%, 0,30%, 0,40%, 0,50%, dan 0,60% (Hamdiyati *et al.*, 2009). Sedangkan untuk jamur *F. oxysporum* adalah 0,04%, 0,06%, 0,08%, 0,10%, 0,12%, dan 0,14% (Wasilah, 2008). Untuk kontrol digunakan larutan DMSO 1% dan aquades sebagai kontrol negatif dan Dithane M-45 0,2% sebagai kontrol positif. Penentuan konsentrasi ekstrak dalam medium jamur *C. gloeosporioides* dilakukan dengan cara melarutkan 0,5 ml larutan ekstrak 2%, 3%, 4%, 5%, dan 6% ke dalam 4,5 ml PSA pada tabung reaksi, sehingga didapat konsentrasi ekstrak dalam medium sebesar 0,20%, 0,30%, 0,40%, 0,50%, dan 0,60%. Sedangkan pada medium jamur *F. oxysporum* konsentrasi ekstrak yang digunakan ialah 0,4%, 0,6%, 0,8%, 1,0%, 1,2%, dan 1,4% sehingga didapat konsentrasi ekstrak dalam medium sebesar 0,04%, 0,06%, 0,08%, 0,10%, dan 0,12%. Kemudian homogenkan dan miringkan tabung agar didapat medium agar miring. Setelah medium membeku, diinokulasikan potongan miselium jamur *F. oxysporum* dan *C. gloeosporioides* menggunakan pelubang gabus diameter 0,6 mm dan diinkubasikan berdasarkan jumlah spora tertinggi dari kurva produksi spora selama empat hari untuk *F. oxysporum* (Astuti, 2009) dan tiga hari untuk *C. gloeosporioides* (Arhandhian, 2009). Selanjutnya hitung jumlah spora menggunakan *Haemocytometer* (Modifikasi Aberkane *et al.*, 2002).

Adapun cara yang dilakukan untuk menghitung spora jamur ialah sebagai berikut: ke dalam medium yang telah dibiakkan jamur

ditambahkan 10 ml larutan garam fisiologis (NaCl 0,85%). Kemudian dengan menggunakan jarum ose, spora dilepaskan dengan menggosoknya secara perlahan untuk mendapatkan suspensi spora. Setelah itu homogenkan suspensi dengan menggunakan vortex. Pindahkan ke dalam tabung reaksi kosong kemudian dipipet dan teteskan satu tetes pada *Haemocytometer* (Lampiran B). Kemudian hitung spora jamur *C. gloeosporioides* dan *F. oxysporum* (Modifikasi Aberkane *et al.*, 2002)

Konsentrasi efektif ekstrak kunyit untuk perlakuan ditentukan dengan mengencerkan ekstrak dengan pelarut DMSO (*Dymethyl sulfoxide*) 1%. Pengenceran awal dilakukan dengan rentang yang cukup jauh untuk mengetahui konsentrasi berapa yang dapat menghambat sporulasi jamur. Kemudian dilakukan pengenceran dengan jarak konsentrasi yang lebih kecil dan diamati aktivitas hambatan sporulasi dari tiap pengenceran terkecil yang masih menghambat sporulasi lebih dari 50 %. Persentase penghambatan sporulasi jamur dihitung dengan rumus berikut (Sharma dan Kumar, 2008) :

$$\% \text{ Penghambatan spora} = \frac{A - B}{A} \times 100\%$$

Keterangan :

A: Jumlah spora pada kontrol

B: Jumlah spora pada perlakuan

b. Uji hayati pokok

Uji hayati pokok dilakukan untuk menentukan konsentrasi yang paling efektif dalam menghambat sporulasi jamur *C. gloeosporioides* dan

F. oxysporum. Tahap pertama dari uji hayati pokok terhadap jamur *Colletotrichum gloeosporioides* dan *Fusarium oxysporum* adalah dengan membuat biakan jamur *C. gloeosporioides* dan *F. oxysporum* dalam medium *Potato Sucrose Agar* (PSA) ke dalam beberapa cawan Petri. Kultur murni *C. gloeosporioides* dibiakan selama delapan hari (Arhandian, 2009) dan kultur murni *F. oxysporum* dibiakkan selama tujuh hari (Wasilah, 2008). Kultur jamur yang telah siap kemudian diinokulasikan ke medium perlakuan.

Berdasarkan hasil uji pendahuluan konsentrasi 0,12% menunjukkan penghambatan terbesar pada pertumbuhan jamur *F. oxysporum* dibandingkan dengan kontrol. Maka konsentrasi untuk uji pokok adalah dengan menaikkan dan menurunkan konsentrasi dari konsentrasi 0,12%. Konsentrasi yang digunakan yaitu 0,10%, 0,11%, 0,12%, 0,13%, 0,14%, dan 0,15%. Sedangkan untuk jamur *C. gloeosporioides* adalah dengan menaikkan konsentrasi dari 0,30%. Konsentrasi yang digunakan yaitu 0,33%, 0,35%, 0,38%, 0,41%, 0,44%, dan 0,47%. Untuk kontrol dilakukan dengan menggunakan larutan DMSO 1 % dan aquades sebagai kontrol positif serta Dithane M-45 0,2% sebagai kontrol negatif. Selanjutnya hitung spora jamur menggunakan *Haemocytometer* (Lampiran B) setelah 3 hari untuk jamur *C. gloeosporioides* dan 4 hari untuk jamur *F. oxysporum* sesuai dengan kurva produksi spora menurut penelitian Arhandian (2009) dan Astuti (2009).

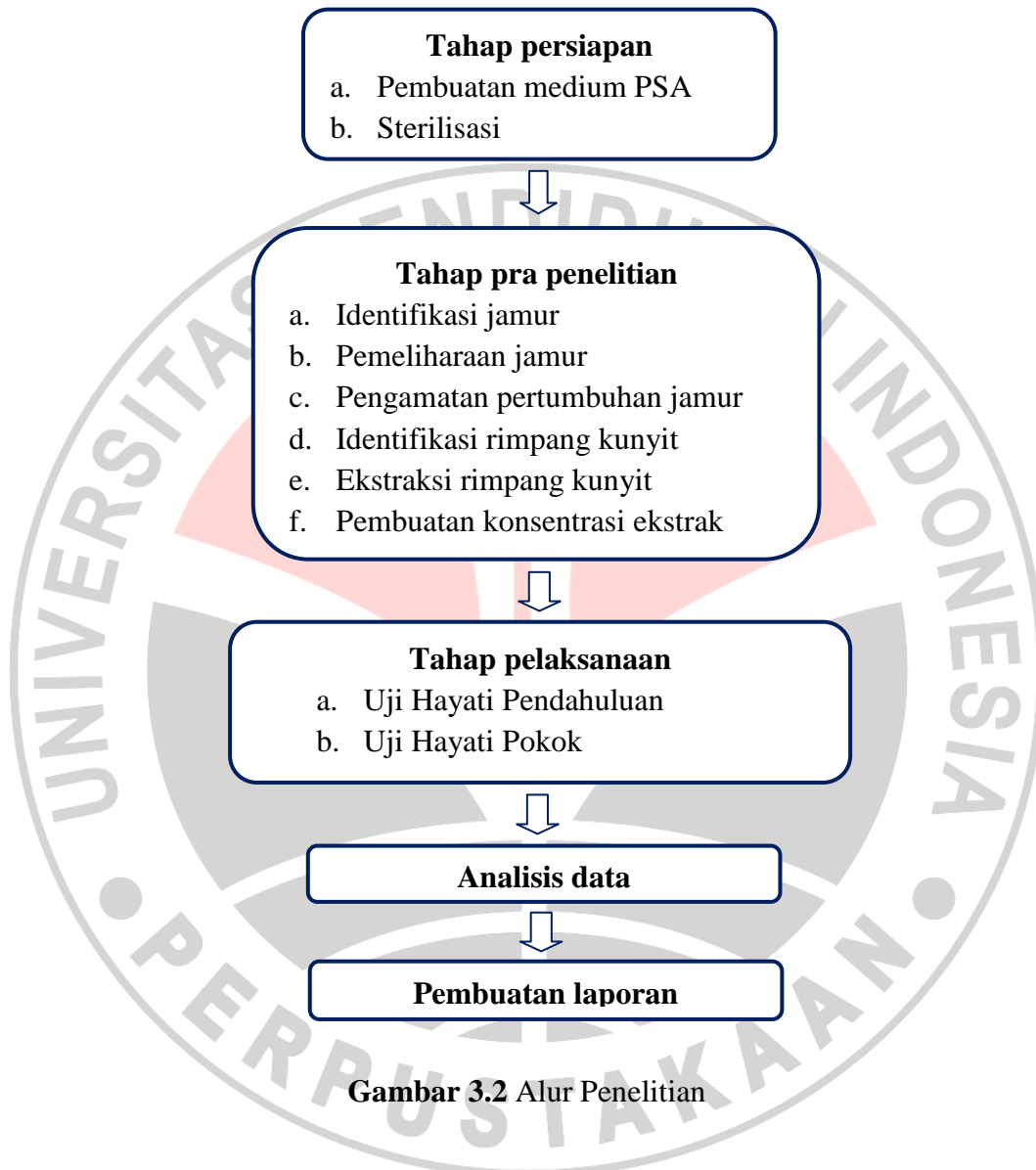
4. Analisis Data

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



G. Alur Penelitian

Alur penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.2 berikut.



Gambar 3.2 Alur Penelitian