

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimen karena dalam penelitian ini 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 perkecambahan spora jamur *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. pada medium *Potato Sucrose* (PS) yang ditambah ekstrak rimpang kunyit dengan berbagai konsentrasi. Kontrol negatif penelitian berupa perkecambahan jamur pada medium PS ditambah akuades steril dan DMSO 1 %, sedangkan kontrol positif berupa perkecambahan jamur pada medium PS 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 PS, sedangkan yang menjadi variabel terikat yaitu jumlah spora yang berkecambah (spora/ml) dan persentase (%) penghambatan perkecambahan spora jamur.

B. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret 2009 sampai dengan bulan Juni 2009 di laboratorium Mikrobiologi Jurusan Pendidikan Biologi Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FPMIPA) Universitas Pendidikan Indonesia (UPI). Penelitian yang dilakukan meliputi uji hayati ekstrak

rimpang *Curcuma domestica* Val. terhadap perkecambahan spora jamur *C. gloeosporioides* Penz. secara *in vitro*.

C. Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan adalah desain Rancangan Acak Lengkap (RAL), karena dilakukan di laboratorium dan kondisi relatif homogen. Jumlah perlakuan yang digunakan adalah sembilan perlakuan terdiri dari enam konsentrasi ekstrak yang berbeda, dua kontrol negatif, dan satu kontrol positif. 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 diperoleh dari rumus pengulangan Rancangan Acak Lengkap, yaitu $(t)(r) - 1 \geq 20$, dimana t adalah perlakuan (treatment) dan r adalah pengulangan (replikasi) (Gomez, 1995).

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

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

$$9r - 1 \geq 20$$

$$9r \geq 21$$

$$r \geq 2,3$$

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 adalah sebagai berikut:

Tabel 3.1 Desain Rancangan Acak Lengkap

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

Keterangan:

A : kontrol negatif aquades steril
(konsentrasi larutan 0,00 %)

B : kontrol negatif DMSO 1%
(konsentrasi larutan 0,00 %)

C : kontrol positif 0,2% Dithane M-45
(mengandung 80% mancozeb)

D : konsentrasi larutan 0,11 % (b/v)

E : konsentrasi larutan 0,13 % (b/v)

F : konsentrasi larutan 0,15 % (b/v)

G : konsentrasi larutan 0,17 % (b/v)

H : konsentrasi larutan 0,19 % (b/v)

I : konsentrasi larutan 0,21 % (b/v)

D. Populasi dan Sampel

Populasi dan sampel dalam penelitian ini yaitu:

1. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah seluruh spora yang diambil dari biakan murni *C. gloeosporioides* Penz. yang ditumbuhkan dalam medium PSA miring.
2. Sampel dalam penelitian ini adalah spora *C. gloeosporioides* Penz. yang diberi perlakuan dengan ekstrak rimpang kunyit (*C. domestica* Val.).

E. Alat dan Bahan

Alat-alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini dapat dilihat pada

Tabel 3.2 dan 3.3 berikut ini:

Tabel 3.2 Alat-alat yang Digunakan Dalam Penelitian

No.	Nama Alat	Jumlah	Spesifikasi
1.	Alumunium foil	1 pak	25 sq.ft (7,6 m x 30 cm)
2.	Autoklaf	1 buah	Merk EYELE model HL36AE
3.	Beaker Glass	3 buah	Gelas pyrex ukuran 1 liter
4.	Cawan Petri	10 buah	Gelas pyrex, Ø 95 mm
5.	Batang pengaduk	1 buah	Berbahan gelas
6.	Blender	1 buah	Merk National
7.	Botol kecil	3 buah	Kapasitas 100 ml
8.	Gelas ukur	2 buah	Pyrex kapasitas 10 ml
9.	Jarum inokulasi	1 buah	Panjang 15 cm
10.	Kain kasa	secukupnya	Steril
11.	Kapas	secukupnya	Kapas pembalut
12.	Kertas saring	secukupnya	Whatman No. 1
13.	Labu Erlenmeyer	3 buah	Pyrex kapasitas 500 ml
14.	Labu Erlenmeyer	27 buah	Pyrex kapasitas 50 ml
15.	Lampu spirtus	1 buah	Kapasitas 200 ml
16.	Magnetik stirer	1 buah	Model RCH-3
17.	Gelas objek dan gelas penutup	10 buah	25,4 x 76,2 mm (1 ¹ x 1 ³) dan 1 mm -1,2 mm
18.	Makropipet	1 buah	Kapasitas 1 ml
19.	Mikroskop	1 buah	1000 x perbesaran
20.	Neraca digital	1 unit	Merk AND ketelitian 0,001 mg
21.	Pisau	1 buah	Tajam
22.	Tabung reaksi	40 buah	Gelas pyrex
23.	Waterbath Shaker	1 unit	50 x 30 cm, suhu 70°C
24.	Haemocytometer	1 buah	0,100 mm; 0,0025 m ²
25.	Vorteks	1 unit	Sibata Test Tube Mixer-1
26.	Incubator Shaker	2 unit	Merk EYELA Multi Shaker MMS

Tabel 3.3 Bahan-bahan yang Digunakan Dalam Penelitian

No.	Nama Bahan	Jumlah	Spesifikasi
1.	Agar-agar	15 gram	Difco agar
2.	Akuades steril	50 ml	-
3.	Etanol	secukupnya	Konsentrasi 70 %
4.	DMSO	25 ml	Konsentrasi 1 %
5.	Etanol	1000 ml	Konsentrasi 96 %
6.	Kunyit	2 kg	Dari Padalarang
7.	Kentang	200 gram	Dari pasar lokal
9.	Jamur <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	1 stok kultur	Koleksi BALITSA, Lembang
10.	Sukrosa	20 gram	Teknis
11.	Dithane M-45	10 gram	Bahan aktif mancozeb 80%

F. 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 PSA

Medium yang digunakan untuk pertumbuhan jamur *C. gloeosporioides* 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. Selanjutnya dipanaskan selama 20 menit. Medium yang telah dipanaskan diukur pHnya hingga mencapai pH 5,6. Medium yang sudah diukur pHnya

dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 9 ml (agar diri) dan 5 ml (agar miring) kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf (Nurhayati, 2008: 28).

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 *C. gloeosporioides* Penz menggunakan metode *slide culture* secara aseptik. Cawan Petri untuk *slide culture* steril berisi kain kasa, sumpit kayu yang dibentuk segitiga, satu buah kaca objek dan dua buah kaca penutup. Kemudian 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* Penz ditanamkan di atas kotak agar menggunakan lup inokulasi dan ditutup dengan kaca penutup. Jamur ditumbuhkan selama 1 minggu dengan kondisi lembab, kemudian diamati bentuknya di bawah mikroskop (Heritage *et al.*, 1996: 145).

d. Pemeliharaan dan Penyediaan Jamur

Sebelum dilakukan pengujian, jamur yang akan digunakan dimudakan terlebih dahulu di dalam medium PSA. Proses dari pemudaan jamur adalah

sebagai berikut: biakan jamur diinokulasikan pada medium PSA dalam cawan Petri dan agar miring kemudian diinkubasikan pada suhu kamar sampai umur tertentu untuk perlakuan.

e. Pembuatan Kurva Produksi Spora *Colletotrichum gloeosporioides*

Pembuatan kurva produksi spora bertujuan untuk menentukan umur inokulum (jumlah spora optimum) *C. gloeosporioides* 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 NaCl dimasukkan ke dalam isolat *C. gloeosporioides* 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. Pembuatan suspensi dan perhitungan jumlah spora ini dilakukan 24 jam sekali selama 10 hari.

f. Pembuatan Suspensi Spora *Colletotrichum gloeosporioides*

Suspensi spora diperoleh dari jamur *C. gloeosporioides* Penz yang ditumbuhkan dalam agar miring selama tiga hari (hasil kurva produksi spora). Setelah mendapatkan jamur berumur tiga hari, dimasukkan sebanyak 10 ml medium *Potato Sucrose* (PS) kemudian digosok perlahan menggunakan jarum inokulasi untuk memisahkan spora dengan miselium. Suspensi spora yang sudah

didapatkan kemudian dipindahkan ke dalam tabung reaksi steril untuk dihomogenkan menggunakan vorteks. Jumlah spora dihitung dengan menggunakan Haemocytometer hingga mencapai konsentrasi 4×10^6 spora /ml (Harish *et al.*, 2004).



Gambar 3.1 Kultur Jamur *C. gloeosporioides* Penz Umur Tiga Hari dalam PSA miring.

g. Sampling Waktu Perkecambahan Spora *Colletotrichum gloeosporioides*

Sampling ini dilakukan pada spora *C. gloeosporioides* selama periode waktu 24 jam untuk menentukan kapan perkecambahan spora mencapai puncaknya. Sebanyak 10 ml suspensi spora (4×10^6 spora /ml) dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer 50 ml kemudian diinkubasi dalam *incubator shaker* dengan kecepatan 200 rpm selama 24 jam. Perhitungan perkecambahan dilakukan setiap dua jam menggunakan Haemocytometer dengan perbesaran mikroskop 400x (Modifikasi Yulia, 2006; Rukayadi dan Hwang, 2007).

h. Identifikasi Rimpang Kunyit (*Curcuma domestica*)

Sebelum dilakukan ekstraksi, terlebih dahulu dilakukan identifikasi rimpang kunyit. Rimpang kunyit diamati bentuk morfologi dan warnanya.

i. Ekstraksi Rimpang Kunyit (*Curcuma 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 ethanol 96% dengan perbandingan 200g/1000ml (Balbi-Pena *et al.*, 2006: 311), kemudian diaduk dan di*shaker* minimal 24 jam. Simplisia yang telah direndam selanjutnya disaring dengan kertas saring Whatman no.1. Ekstrak ethanol rimpang kunyit selanjutnya dievaporasi dengan menggunakan evaporator pada suhu 50°C. Kemudian diuapkan dengan waterbath untuk menguapkan sisa pelarut ethanol. Ekstrak yang sudah diuapkan pelarutnya dan berbentuk pasta disimpan pada botol gelap pada suhu 4°C.

j. Analisis Ekstrak dengan GC-MS

Analisis GC-MS dilakukan untuk melihat komponen apa saja yang terkandung dalam ekstrak kunyit. Sebanyak 0,1 gram ekstrak dilarutkan dalam 2 ml ethanol. Ekstrak kunyit yang sudah dilarutkan di analisis dengan GC-MS (Shimadzu QP 5050 A) di Jurusan Pendidikan Kimia FPMIPA UPI. Kondisi analisis yang digunakan yaitu suhu awal 60°C, suhu detektor 230°C, suhu injektor 250°C, waktu analisa 30 menit dan volume injeksi 1 µl (Natta *et al.*, 2008).

k. Pembuatan Konsentrasi Ekstrak Kunyit (*Curcuma domestica*)

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 perkecambahan spora jamur *C. gloeosporioides*, maka terlebih dahulu dilakukan uji pendahuluan. Konsentrasi ekstrak yang digunakan adalah 0,1%, 0,15%, 0,2%, 0,25%, 0,3%. 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 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3% dengan 9 ml suspensi spora *C. gloeosporioides*

(4×10^6 spora/ml) ke dalam labu Erlenmeyer 50 ml, kemudian diinkubasi dalam *incubator shaker* kecepatan 200 rpm sampai perkecambahan spora mencapai puncaknya (dari hasil sampling perkecambahan spora). Setelah perkecambahan spora mencapai puncaknya, ditetaskan *lactophenol cotton blue* untuk menghentikan perkecambahan spora secara serentak. Selanjutnya, diamati jumlah spora berkecambah menggunakan Haemocytometer dengan perbesaran mikroskop 400x (Modifikasi Rukayadi dan Hwang, 2007).

b. Uji Hayati Pokok

Berdasarkan hasil uji pendahuluan, konsentrasi 0,15 % sudah dapat menghambat perkecambahan spora *C. gloeosporioides* lebih dari 50% dibandingkan dengan kontrol. Oleh karena itu, konsentrasi untuk uji pokok adalah dengan menaikkan dan menurunkan konsentrasi dari 0,15 %. Konsentrasi yang digunakan untuk uji hayati pokok yaitu 0,11 %, 0,13 %, 0,15 %, 0,17 %, 0,19 %, 0,21 %. Untuk kontrol digunakan larutan DMSO 1% dan aquades sebagai kontrol negatif dan Dithane M-45 0,2% sebagai kontrol positif. Untuk mengetahui daya hambat ekstrak kunyit terhadap perkecambahan spora jamur *C. gloeosporioides* maka dihitung jumlah spora yang berkecambah menggunakan Haemocytometer setelah diinkubasi dalam *incubator shaker* kecepatan 200 rpm selama 16 jam. Persentase penghambatan diperoleh dengan menggunakan rumus Jin *et al.* (2004 dalam Rukayadi dan Hwang, 2007:436) yaitu:

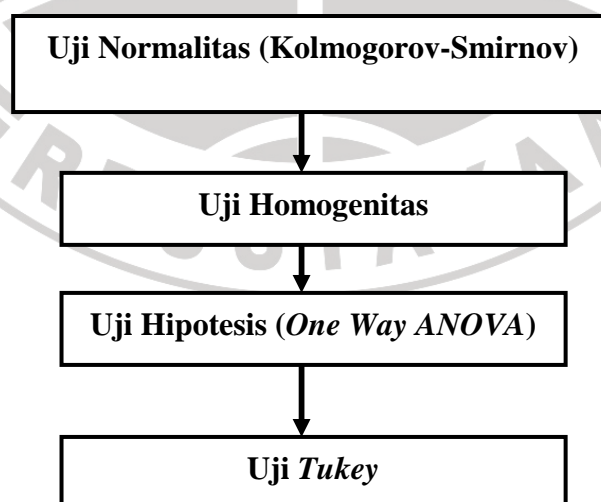
$$(a - b) / a \times 100\%$$

Ket : a = jumlah spora yang berkecambah pada kontrol

b = jumlah spora berkecambah pada perlakuan

3. Tahap Analisis Data

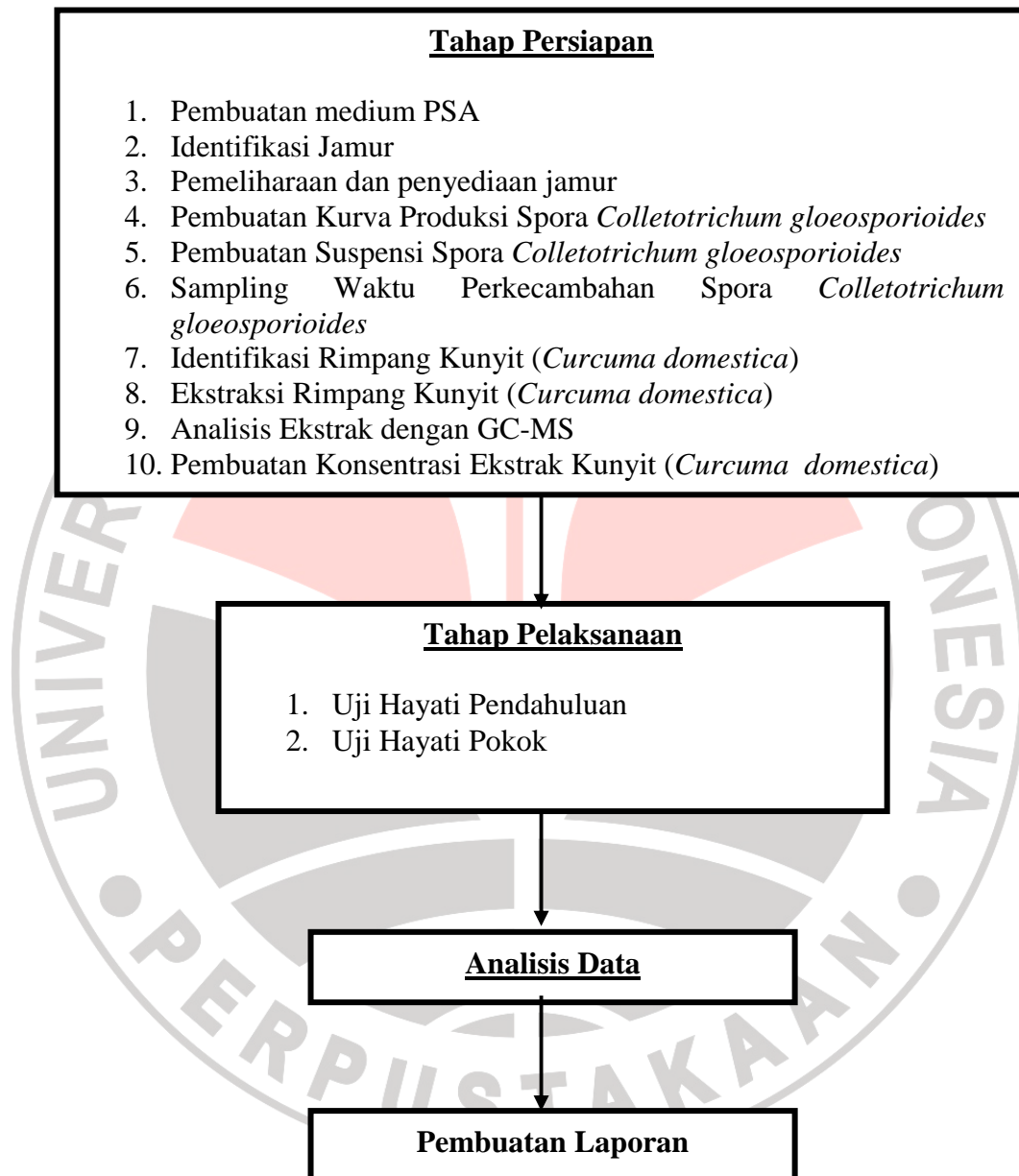
Data yang diperoleh dari penelitian ini yaitu berupa jumlah spora *C. gloeosporioides* yang berkecambah. Data dari hasil uji hayati pokok dianalisis dengan menggunakan program SPSS versi 13.0 *for window*. Data yang diperoleh di uji normalitas (*Kolmogorof-Smirnov*) dan homogenitas terlebih dahulu. Hasil uji homogenitas menunjukkan bahwa data memiliki signifikansi ≥ 0.05 dan data berdistribusi homogen, maka selanjutnya dilakukan uji hipotesis dengan menggunakan *One Way ANOVA*. Selanjutnya untuk membandingkan perbedaan yang signifikan antara data kelompok satu dengan lainnya dilakukan uji *Tukey*. Diagram alir analisis data dapat dilihat pada Gambar 3.3 berikut ini:



Gambar 3.2 Diagram alir analisis data.

4. Alur Penelitian

Alur penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.2 berikut ini:



Gambar 3.3 Bagan Alur Penelitian