BAB III
METODE PENELITIAN

A. Metode Penelitian

Metode penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimen kuantitatif dengan uji daya hambat ekstrak bawang putih terhadap pertumbuhan jamur *Botryodiplodia theobromae.* Penelitian eksperimen adalah penelitian eksperimen atau percobaan (*experiment research*), yaitu kegiatan percobaan (*experiment*), yang bertujuan untuk mengetahui suatu gejala atau pengaruh yang timbul, sebagai akibat dari perlakuan tertentu. Percobaan ini berupa perlakuan atau intervensi terhadap suatu variable dan menyediakan kontrol sebagai perbandingan. Dari perlakuan tersebut diharapkan terjadi perubahan atau pengaruh terhadap variable yang lain (Notoatmodlo, 2010 *dalam* Dewi, 2015 hlm 21). Penelitian ini menggunakan teknik *Dilusi* yang bertujuan untuk mengetahui apakah penggunaan ekstrak bawang putih (*Allium sativum*) dapat dijadikan sebagai fungisida alami dalam mengendalikan pertumbuhan jamur *Botryodiplodia theobromae* penyebab penyakit busuk batang (*Diplodia*) pada tanaman jeruk.

B. Desain Penelitian

Desain penelitian ini menggunakan RAL (Rancangan Acak Lengkap) menggunakan teknik dilusi dengan 6 perlakuan dan 4 pengulangan. Prinsip teknik dilusi adalah larutan uji diencerkan hingga diperoleh beberapa konsentrasi. Pada dilusi padat, tiap konsentrasi larutan uji dicampurkan ke dalam media agar. Setelah padat kemudian ditanami jamur *Botryodiplodia theobromae* kemudian diinkubasi di dalam incubator pada suhu 28^{o}C dan diamati pertumbuhan diameter koloni jamur *Botryodiplodia theobromae* (mm). Untuk menentukan pengulangan menggunakan rumus *Fereder* yaitu sebagai berikut:

$(t-1)(r-1) \quad \geq 15$

$(6-1)(r-1) \quad \geq 15$

$5(r-1) \quad \geq 15$

5r-5 ≥ 15

5r ≥ 20

r = 4

keterangan:

t = *Treatment* (jumlah perlakuan)

r = *Replication* (jumlah pengulangan)

perlakuan yang digunakan yaitu dengan memberikan beberapa konsentrasi ekstrak bawang putih yaitu: 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, dan kontrol menggunakan aquades yang dilakukan secara *in vitro*.

Penelitian ini perlu adanya suatu desain penelitian, berikut ini adalah desain penempatan plot sampel *Botryodiplodia theobromae* yang diberi perlakuan dengan perbedaan konsentrasi ekstraksi bawang putih dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang digunakan dalam penelitian sebagai berikut:

Tabel 3.1 Desain Penelitian

Pengulangan	Perlakuan					
	PL1	PL2	PL3	PL4	PL5	PL6
1	60%	K	K	30%	40%	30%
2	50%	40%	50%	K	60%	40%
3	K	70%	70%	60%	70%	60%
4	50%	50%	30%	40%	30%	70%

Keterangan:

K : Aquades (kontrol)

PL : Perlakuan

Dalam % : Konsentrasi Ekstrak Bawang Putih

1 – 4 : Pengulangan

C. Subjek dan Objek Penelitian

1. Subjek pada penelitian ini yaitu ekstrak bawang putih (*Allium sativum*) sebagai fungisida yang telah diekstrasikan yang akan digunakan pada

konsenterasi 30%, 40%, 50%, 60%, dan 70% dan kontrol menggunakan aquades.

2. Objek penelitian yaitu jamur *Botryodiplodia theobromae*, dengan cara menginokulasikan jamur *Botryodiplodia theobromae* pada PDA yang telah di campur dengan ekstrak bawang putih dalam cawan pertri kemudian diinokulasi dalam incubator pada suhu 28^{o}C.

a. Waktu dan Tempat

Penelitian uji mikrobiologi (uji *in vitro* penghambatan pertumbuhan jamur *Botryodiplodia theobromae*) dilakukan pada bulan Mei 2017 hingga Juni 2017 di Laboratorium Biologi Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan, Univesitas Pasundan Bandung.

b. Alat dan bahan

Dibawah ini merupakan alat dan bahan yang digunakan dalam proses penelitian, yaitu sebagai berikut :

1) Alat

Tabel 3.2 Alat yang digunakan dalam penelitian

No	Nama Alat	Kegunaan	Spesifikasi	Jumlah
1	Cawan perti	Digunakan untuk menyimpan bahan kimia, mikrobiologi.	Diameter 10	25 buah
2	Kertas saring	Digunakan memisahkan partikel suspensi dengan cairan.	Ukuran 58x58 cm	1 buah
3	Toples	Digunakan untuk menyimpan ekstrak bawang putih dalam proses maserasi.	2000 ml, 3000 ml	3 buah
4	Beaker glass	wadah / tempat penampung untuk mengaduk, mencampur, dan	250 ml, 1000 ml, 2000 ml	3 buah

		memanaskan cairan yang digunakan dilaboratorium.		
5	Pipet tetes	Digunakan untuk mengambil cairan dalam skala tetesan kecil.	Kaca dan karet	3 buah
6	Gelas ukur	Digunakan untuk mengukur cairan.	10 ml, 250 ml, 500 ml	3 buah
7	Ose	Digunakan untuk memindahkan jamur kedalam cawan perti.	-	1 buah
8	Labu erlenmeyer	Digunakan untuk mengukur dan mencampur bahan – bahan analisa.	1000 ml	1 buah
9	Bunsen	Digunakan untuk proses sterilisasi.	Kaca dan spirtus	1 buah
10	Inkubator	Sebagai tempat inkubasi.	28°C	1 buah
11	Autoclave	Untuk mensterilisasi suatu benda atau media.	121°C	1 buah
12	Blender	Digunakan untuk menghaluskan spesimen / untuk pembuatan serbuk simplisia.	2 liter	1 buah
13	Korek api	Digunakan untuk menyalakan bunsen.	kayu	1 buah
14	Masker	Digunakan untuk menjaga kebersihan	Kain	1 buah

		dan alat pelindung.		
15	Jas lab	Digunakan untuk menjaga kebersihan dan alat pelindung	kain	1 buah
16	Sarung tangan	Digunakan untuk menjaga kebersihan/alat pelindung.	karet	1 pasang
17	Kamera	Digunakan untuk mengambil gambar sebagai dokumentasi.	Optik	1 bauh
18	Penggaris	Digunakan untuk mengukur panjang / luas	Panjang 30 cm	1 buah
19	Pisau	Digunakan untuk memotong	besi	1 buah
20	Baki plastik	Digunakan untuk menyimpan spesimen	plastik	1 buah
21	Kertas label	Digunakan untuk penamaan atau tanda	kertas	secukupnya
22	Rotatory evaporator	Alat untuk pemisahan dari bahan padat maupun cair	40°C	1 buah
23	Batang pengaduk	Digunakan untuk mencampur bahan kimia	Panjang 20 cm	1 buah
24	Alumunium foil	Untuk menutup / melindungi spesimen		1 gulung
25	Timbangan	Digunakan untuk menimbang bahan	Digital	1 buah
26	pembolong gabus	Digunakan untuk membuat bolongan	Diameter 5 mm	1 buah

		pada jamur *Botryodiplodia theobromae.*		
27	Stirrer	Digunakan untuk menghomogenkan suatu larutan dengan pengadukan	besi,tembaga	1 buah
28	Oven	Alat pemanas tertutup	besi	1 buah
29	Spatula	Alat untuk mengambil objek	Alumunium	1 buah
30	Corong	Alat untuk memindah / memasukkan larutan ke wadah	Diameter 75 mm	1 buah

2) Bahan

Tabel 3.3 Bahan yang digunakan

No	Nama Bahan	Spesifikasi	Jumlah
1	Bawang putih (*Allium sativum)*	Ekstrak	500 gram
2	Jamur *Botryodiplodia theobromae*	Jamur	Secukupnya
3	Etanol 70%	Cair	2500 ml
4	Aquades	Cair	2000 ml
5	PDA (*Potato Dextrose Agar*)	Serbuk	40 gram

c. Bahan yang di Uji

Bawang putih yang masih segar sebanyak 1 kg dilakukan pemisahan umbi dari kulit pembungkusnya. Selanjutnya bawang putih dipotong kecil-kecil untuk memperbesar luas permukaan sehingga mempercepat proses pengeringan dan mempermudah penggilingan. Bawang putih dikeringkan di bawah terik sinar

matahari secara tidak langsung agar kandungan senyawa kimia yang terpadat pada umbi bawang putih tidak mengalami kerusakan. Kemudian umbi bawang putih ditata dalam Loyang dengan ketebalan rata dan dimasukkan ke dalam oven pada suhu 38^{o}C untuk memaksimalkan proses pengeringan.

Bawang putih yang telah kering dihaluskan dengan menggunakan mesin penggeling (*Blender*) sehingga diperoleh serbuk yang kecil dan halus. Kemudian serbuk bawang putih diekstrakan dengan cara maserasi. Sebanyak 500 gram serbuk bawang putih (*Allium sativum*) dimasukkan kedalam toples besar dan ditambahkan 2500 ml etanol 70% kemudian di rendam selama 24 jam. Kemudian setalah 24 jam dalam perendaman simplisia bawang putih disaring dengan menggunakan kertas saring dan ampas yang diperoleh dimaserasi kembali dengan pelarut yang sama etanol 70%. Tahap dilakukan hanya 1 kali sesuai kebutuhan filtratnya dalam penelitian. Filtrat hasil maserasi *dievavoporasi* dengan *rotary evaporator* pada suhu 40^{0}C sampai didapatkan ekstrak pekatnya.

d. Sampel Penelitian

Sampel pada penelitian skripsi ini adalah jamur *Botryodiplodia theobromae* yang diinokulasikan pada media PDA (*Potato Dextrose Agar*) yang telah dicampurkan oleh ekstrak bawang putih (*Allium sativum*) berada pada cawan petri.

D. Pengumpulan Data dan Instrumen Penelitian

1. Teknik Pengumpulan Data

Adapun teknik pengumpulan data yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut. Observasi, yaitu suatu teknik pengumpulan data dengan mengamati secara langsung objek yang diteliti. Pengamatan dan pencatatan ini dilakukan terhadap objek di tempat terjadi/berlangsungnya peristiwa.

2. Instrumen Penelitian

Pada prinsipnya penelitian adalah melakukan sebuah pengukuran terhadap suatu fenomena sosial dan maupun alam. Karena pada prinsipnya meneliti adalah melakukan sebuah pengukuran, maka harus ada alat ukur yang baik. Menurut Nurhasan dan Hasanudin (Setiadi, 2013 hlm 39) menjelaskan bahwa “pengkuran

adalah proses pengumpulan data atau informasi dari suatu objek tertentu, dengan bantuan alat ukur.” Alat ukur dalam penelitian biasanya dinamakan instrumen penelitian. Jadi instrumen penelitian adalah suatu alat yang digunakan mengukur fenomena alam maupun sosial yang diamati. Untuk memperoleh data yang akurat seorang peneliti harus menggunakan alat atau instrumen yang dapat membantu untuk mempermudah jalannya penelitian. Instrumen pada penelitian ini adalah jangka sorong dan penggaris yang berfungsi untuk mengukur pertumbuhan jamur *Botryodiplodia theobromae.* Hasil pengukuran diameter kolini jamur *Botryodiplodia theobromae* seperti di Tabel berikut:

Tabel 3.4 Hasil Pengamatan Diameter Koloni Jamur *Botryodiplodia theobromae* (mm)

Perlakuan	Kontrol				30%				40%				50%				60%				70%			
Pengulangan	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Hari ke-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hari ke-2	25	31	35	40	5	6	8	5	3	4	5	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hari ke-3	40	45	50	55	10	13	15	15	5	8	10	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hari ke-4	55	60	65	70	15	20	23	24	10	12	14	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hari ke-5	70	75	80	80	20	25	30	30	14	16	20	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hari ke-6	83	84	85	85	26	30	36	35	20	22	25	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hari ke-7	85	85	85	85	32	35	34	35	25	28	30	28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabel 3.5 Hasil Pengamatan Rata-Rata Diameter Pertumbuhan Koloni Jamur *Botryodiplodia theobromae* (mm) perhari

Pengulangan	Diameter Pertumbuhan Koloni (mm)					
	Perlakuan dengan beberapa konsentrasi					
	kontrol	30%	40%	50%	60%	70%
1	51.14	15.42	10.71	0	0	0
2	54.28	18.42	12.85	0	0	0
3	57.14	20.85	14.85	0	0	0
4	59.28	20.57	14.85	0	0	0
Rata-rata	55.46	18.82	13.32	0	0	0

E. Teknik Analisis Data

Data yang diperoleh kemudian dianalisis dengan uji normalitas, uji homogenitas, jika hasilnya terdapat perbedaan yang signitifikan maka dilanjutkan uji ANOVA *one-way* dan uji lanjutan menggunakan *Tukey* tetapi bila hasilnya tidak signitifikan maka dilanjutkan dengan uji non parametric yaitu pengujian *Kruskal-Wallis* dan *Mann Whitney* untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh perlakuan yang diajukan pada bahan. Analisis data menggunakan uji statistik dengan menggunakan aplikasi *Statistical Package for the Social Science versi 24.0 for windows* (SPSS).

F. Prosedur Penelitian

1. Persiapan Sampel

Penelitian ini dimulai dengan persiapan sampel, mencari jamur *Botryodiplodia theobromae* serta membelinya pada salah satu Perguruan Tinggi Negeri di Kabupaten Bogor, Jawa Barat, dan bawang putih (*Allium sativum*) diperoleh dari Pasar Baru, Kota Bandung, Jawa Barat. Selain menyiapkan alat-alat yang akan digunakan dalam proses penelitian.

2. Pembuatan Ekstrak Bawang Putih

Metode yang digunakan pada penelitian ini untuk mengekstrak bawang putih (*Allium sativum*) adalah metode maserasi. Maserasi adalah suatu contoh

metode ekstraksi simplisia yang sederhana, yang dilakukan dengan membiarkan padatan terendam dalam suatu pelarut. Proses pengekstrakan simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur kamar (Ditjen POM, 2000 *dalam* Rahmadani, 2015 hlm. 8). Keuntungan ekstraksi dengan cara maserasi adalah pengerjaan dan peralatan yang digunakan sederhana, sedangkan kerugiannya yakni cara pengerjaannya lama, membutuhkan pelarut yang banyak dan penyaringan kurang sempurna Tiwira, dkk, 2011 *dalam* Rahmadani, 2015 hlm. 8).

Pada metode maserasi ini menggunakan pelarut etanol 70%. Sebanyak 500 gram serbuk umbi bawang putih (*Allium sativum*) yang sebelumnya sudah dihaluskan dimasukkan kedalam toples dan ditambahkan pelarut etanol sebanyak 2500 ml, kemudian di rendam selama 24 jam. Kemudian setalah 24 jam dalam perendaman simplisia bawang putih disaring dengan menggunakan kertas saring dan diperoleh filtrat bawang putih yang disaring sebanyak 2000 ml. Filtrat hasil maserasi *dievavoporasi* dengan *rotary evaporator* pada suhu 40^0C sampai didapatkan ekstrak pekatnya. Hasil proses evavoporasi dengan *rotary evaporator* sebanyak 400 ml ekstrak pekat bawang putih.

3. Pembuatan Konsentrasi Bawang Putih

Konsentrasi larutan bawang putih yang divariasikan dengan menggunakan pelarut aquades steril yaitu 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, dan kontrol dengan menggunakan larutan aquades. Dalam melakukan perhitungan konsentrasi ekstrak bawang putih digunakan rumus sebagai berikut:

$$M_1 . V_1 = M_2 . V_2$$

a. Konsentrasi ekstraksi bawang putih 30%

$M_1 . V_1 . = M_2 . V_2$

$100. V_1 = 30 . 160$

$$\mathbf{V1 = \frac{4800}{100}} = 48 \text{ ml}$$

Pembuatan konsentrasi ekstrak bawang putih 30% adalah dengan melarutkan 48 ml ekstrak bawang putih ke dalam 112 ml aquades steril.

b. Konsentrasi ekstraksi bawang putih 40%

$M_1 . V_1 . = M_2 . V_2$

$100. V_1 = 40 . 160$

$\mathbf{V1} = \frac{\mathbf{6400}}{\mathbf{100}} = 64$ ml

Pembuatan konsentrasi ekstrak bawang putih 40% adalah dengan melarutkan 64 ml ekstrak bawang putih ke dalam 96 ml aquades steril.

c. Konsentrasi ekstraksi bawang putih 50%

$M_1 . V_1 . = M_2 . V_2$

$100. V_1 = 50 . 160$

$\mathbf{V1} = \frac{\mathbf{8000}}{\mathbf{100}} = 80$ ml

Pembuatan konsentrasi ekstrak bawang putih 50% adalah dengan melarutkan 80 ml ekstrak bawang putih ke dalam 80 ml aquades steril.

d. Konsentrasi ekstraksi bawang putih 60%

$M_1 . V_1 . = M_2 . V_2$

$100. V_1 = 60 . 160$

$\mathbf{V1} = \frac{\mathbf{9600}}{\mathbf{100}} = 96$ ml

Pembuatan konsentrasi ekstrak bawang putih 60% adalah dengan melarutkan 96 ml ekstrak bawang putih ke dalam 64 ml aquades steril.

e. Konsentrasi ekstraksi bawang putih 70%

$M_1 . V_1 . = M_2 . V_2$

$100. V_1 = 70 . 160$

$\mathbf{V1} = \frac{\mathbf{11200}}{\mathbf{100}} = 112$ ml

Pembuatan konsentrasi ekstrak bawang putih 70% adalah dengan melarutkan 112 ml ekstrak bawang putih ke dalam 48 ml aquades steril.

4. Sterilisasi Alat

Alat – alat yang digunakan pada saat penelitian ini dilakukan proses sterilisasi terlebih dahulu dengan menggunakan *Autoclave* selama 15 – 20 menit.

5. Pembuatan PDA (*Potato Dextrose Agar*)

Pembuatan PDA (*Potato Dextrose Agar*) menggunakan PDA yang telah disediakan oleh Laboratorium. Menyiapkan PDA dan menimbangnya sebanyak 40

gram, kemudian dituangkan kedalam labu elemeyer. Setelah itu siapkan aquades sebanyak 1000 ml yang telah diukur dengan gelas ukur, kemudian aquades dicampurkan dengan PDA didalam labu elemeyer. Panaskan dan diaduk dengan menggunakan stirrer. Setalah proses pemanasan dan pengadukan selesai, PDA di sterilisasi menggunakan *Autoclave* dan setelah di sterilisasi PDA dituangkan pada setiap cawan petri.

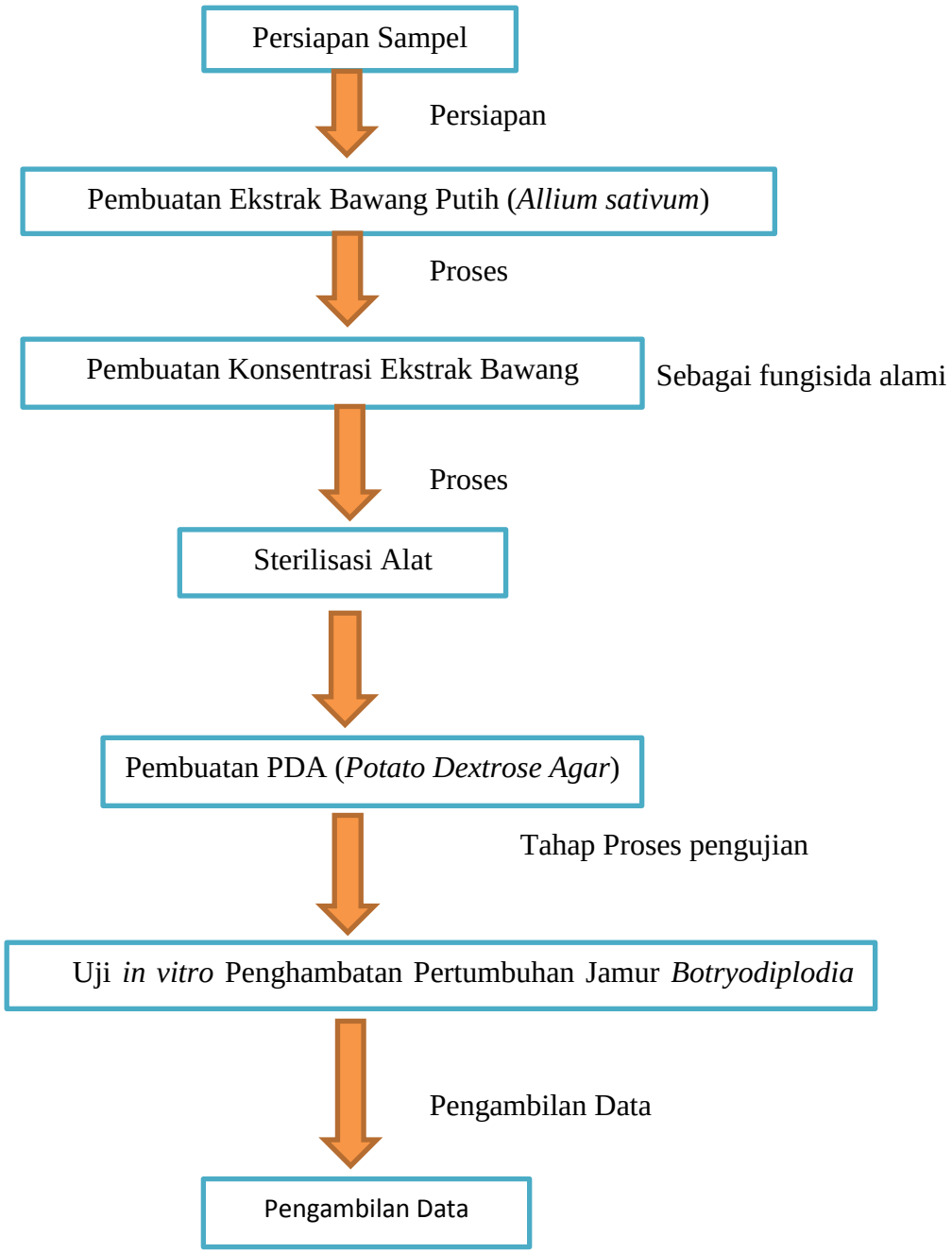
6. Uji *in vitro* Penghambatan Pertumbuhan Jamur *Botryodiplodia theobromae*

Pengujian dilakukan dengan menumbuhkan miselium jamur *Botryodiplodia theobromae* pada media PDA yang telah dicampur dengan larutan ekstrak bawang putih sesuai dengan konsentrasi. PDA cair dengan suhu 40^{o} C dituangkan ke dalam cawan petri. Kemudian larutan ekstrak dicampurkan ke dalam cawan petri hingga merata dan didiamkan hingga padat.

Miselium *Botryodiplodia theobromae* diambil dengan cara memotong PDA yang telah ditumbuhi biakan murni *Botryodiplodia theobromae* dengan pemotong media berdiameter 5 mm. Miselium tersebut diinokulasikan pada PDA yang telah dicampur dengan larutan ekstrak di bagian tengah cawan petri, kemudian diinkubasi inkubator pada suhu kamar dan diamati setiap hari. Parameter yang diamati adalah diameter koloni jamur *Botryodiplodia theobromae* dan persentase penghambatan jamur *Botryodiplodia theobromae.*

7. Pengambilan Data

Pengambilan data dilakukan selama 6 – 7 hari terhadap miselium jamur *Botryodiplodia theobromae* yang telah diinkubasi didalam inkubator dan dilakukan pengamatan setiap harinya dengan mengukur dan menghitung hambatan pertumbuhan jamur *Botryodiplodia theobromae.* Setelah selesai pengambilan data dihitung dan diolah menggunakan *one-way* ANOVA.


Persiapan Sampel
Persiapan
Pembuatan Ekstrak Bawang Putih (*Allium sativum*)
Proses
Pembuatan Konsentrasi Ekstrak Bawang
Sebagai fungisida alami
Proses
Sterilisasi Alat
Pembuatan PDA (*Potato Dextrose Agar*)
Tahap Proses pengujian
Uji *in vitro* Penghambatan Pertumbuhan Jamur *Botryodiplodia*
Pengambilan Data
Pengambilan Data