

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Metode Penelitian

Metode penelitian yang akan dilakukan adalah penelitian eksperimen kuantitatif dengan variabel hendak diteliti (variabel terikat) kehadirannya sengaja ditimbulkan melalui manipulasi menggunakan perlakuan sesuai kebutuhan serta adanya kontrol. Tujuan dari penelitian eksperimen ini adalah untuk menyelidiki ada tidaknya hubungan sebab akibat serta berapa besar hubungan sebab-akibat tersebut dengan cara memberikan perlakuan-perlakuan tertentu pada beberapa kelompok eksperimen dan menyediakan kontrol untuk perbandingan. (Nazir, 2011, hlm. 21).

B. Desain Penelitian

Desain penelitian ini menggunakan RAL (Rancangan Acak Lengkap), dimana semua sampel mendapat perlakuan yang sama untuk mengetahui pengaruh ekstrak bawang putih dalam menghambat pertumbuhan jamur *Fusarium oxysporum*. Penempatan perlakuan secara acak (*random*) dengan undian atau lort (Tabel 3.1) dengan 6 perlakuan ekstrak bawang putih dengan konsentrasi 30%, 40%, 50%, 60%, 70% dan kontrol dengan menggunakan aquades, dengan 4 pengulangan yang dilakukan secara *in vitro*.

Teknik penelitian yang digunakan untuk uji ekstrak bawang putih adalah teknik dilusi padat yaitu sejumlah antimikroba diencerkan hingga diperoleh beberapa konsentrasi. Pada dilusi padat tiap konsentrasi dicampur dalam media agar lalu ditanami jamur dan diinkubasi. Setelah masa inkubasi selesai, diperiksa konsentrasi berapa ekstrak dapat menghambat pertumbuhan atau mematikan (Pelczar dkk, 1988, hlm. 26). Untuk mengetahui uji ekstrak bawang putih (*Allium sativum*) sebagai fungisida alami dalam menghambat pertumbuhan jamur *Fusarium oxysporum*.

Banyaknya pengulangan yang dilakukan (replikasi) untuk setiap perlakuan diperoleh dari perhitungan dengan rumus Ferdered nersumber dari Suhaerah (2016, hlm. 42) dibawah ini:

$$\begin{aligned}
 (t-1)(r-1) &\geq 15 \\
 (6-1)(r-1) &\geq 15 \\
 5(r-1) &\geq 15 \\
 5r-5 &\geq 15 \\
 5r &\geq 20 \\
 r &= 4
 \end{aligned}$$

Keterangan:

t = *Treatment* (jumlah perlakuan)

r = *Replication* (jumlah pengulangan)

15 = Faktor derajat kebebasan umum

Berdasarkan perhitungan diatas diperoleh jumlah pengulangan sebanyak 4 kali untuk setiap perlakuan, sehingga keseluruhan jumlah sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah 24 sampel.

Desain penempatan plot sampel *Fusarium oxysporum* yang di beri perlakuan perbedaan konsentrasi ekstrak bawang putih dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) sebagai berikut:

Tabel 3.1 Tata Letak Perlakuan Jamur *Fusarium oxysporum*

¹ F	² C	³ A	⁴ B
² D	³ F	⁴ C	¹ A
⁴ E	¹ D	² F	³ C
³ B	² E	⁴ D	¹ F
² A	¹ B	³ E	³ D
¹ C	⁴ A	² B	¹ E

Keterangan:

A: *Fusarium oxysporum* yang di beri perlakuan ekstrak bawang putih dengan konsentrasi 30%.

- B: *Fusarium oxysporum* yang di beri perlakuan ekstrak bawang putih dengan konsentrasi 40%.
- C: *Fusarium oxysporum* yang di beri perlakuan ekstrak bawang putih dengan konsentrasi 50%.
- D: *Fusarium oxysporum* yang di beri perlakuan ekstrak bawang putih dengan konsentrasi 60%.
- E: *Fusarium oxysporum* yang di beri perlakuan ekstrak bawang putih dengan konsentrasi 70%.
- F: *Fusarium oxysporum* yang di beri perlakuan ekstrak bawang putih dengan menggunakan kontrol aquades sebagai pembanding.

C. Subjek dan Objek Penelitian

Subjek dalam penelitian ini yaitu pertumbuhan jamur *Fusarium oxysporum* yang diperoleh dari Fakultas Pertanian, Departemen Proteksi Tanaman, Institut Pertanian Bogor. Sedangkan untuk objek yang diteliti yaitu ekstrak bawang putih (*Allium sativum*) sebagai fungisida yang telah diekstraksi dengan konsentrasi 30%, 40%, 50%, 60%, 70%.

D. Populasi dan Sampel

Populasi pada penelitian ini adalah jamur *Fusarium oxysporum*, dengan sampel 24 perlakuan, yang ditetapkan berdasarkan perhitungan dengan rumus pengulangan Suhaerah (2016, hlm. 42) yaitu 6 perlakuan dan 4 pengulangan.

E. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biologi, Program Studi Pendidikan Biologi, Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan, Universitas Pasundan.

2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan selama 5 hari pada bulan Mei 2017.

F. Operasionaliasi Variabel

Dalam penelitian ini peneliti mengambil judul yang memuat dua variabel yaitu variabel terikat dan variabel bebas. Variabel terikat dalam penelitian ini yaitu jamur yang diukur sebagai diameter pertumbuhan koloni yang terbentuk di sekitar media uji terhadap pertumbuhan jamur *Fusarium oxysporum* pada media PDA. Sedangkan variabel bebasnya ekstrak bawang putih (*Allium sativum*) yang telah di ekstraksi dan sebagai fungisida alami dengan konsentrasi 30%, 40%, 50%, 60%, 70% dan kontrol menggunakan aquades.

G. Pengumpulan Data dan Instrumen Penelitian

1. Rancangan Pengumpulan Data

Adapun teknik pengumpulan data yang digunakan dalam penelitian ini adalah observasi, yaitu suatu teknik pengumpulan data dengan mengamati secara langsung objek yang diteliti. Dengan cara mengukur pertumbuhan koloni jamur disekitar PDA ekstrak bawang putih menggunakan penggaris secara *In vitro*.

Tabel 3.2 Pengamatan Diameter Koloni Jamur *Fusarium oxysporum*

Pengulangan	Perlakuan dengan beberapa konsentrasi					
	30%	40%	50%	60%	70%	Kontrol
1						
2						
3						
4						
Rata-rata						

2. Instrumen Penelitian

Perlakuan dan perawatan adalah segala sesuatu yang diberikan kepada objek penelitian dalam penelitian ini. Perlakuan dan perawatan dilakukan dengan tujuan untuk mendapatkan data tentang diameter koloni pertumbuhan jamur *Fusarium oxysporum*. Instrumen yang digunakan pada penelitian ini adalah penggaris yang berfungsi untuk mengukur diameter koloni pertumbuhan jamur.

H. Rancangan Analisis Data

Data yang diperoleh kemudian dianalisis dengan ANOVA *one-way*. Analisis data awal yang dilakukan yaitu uji normalitas dengan melakukan uji Saphiro-wilk yang bertujuan untuk mengetahui distribusi data dari diameter pertumbuhan jamur. Selanjutnya dilakukan uji homogenitas yang bertujuan untuk mengetahui variansi data diameter pertumbuhan jamur pada masing-masing konsentrasi ekstrak bawang putih. Dan uji lanjutan menggunakan *Tukey* dengan tingkat kesalahan yang digunakan adalah 5% untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh perlakuan yang diujikan pada bahan. Analisis data untuk menguji statistika dengan menggunakan aplikasi SPSS.

I. Prosedur Penelitian

Penelitian ini dibagi menjadi tiga tahap yaitu tahap persiapan, tahap pelaksanaan, dan tahap perlakuan.

1. Tahap Persiapan

a. Pengumpulan alat dan bahan yang akan digunakan dalam penelitian

Tabel 3.3 Daftar Alat Penelitian

No	Nama Alat	Spesifikasi	Fungsi	Jumlah
1	Becker glass	1800 ml	Untuk menyimpan ekstrak yang sudah di saring	1 Buah
2	Cawan petri	Diameter 9 & 10	Untuk menyimpan PDA dan tempat pertumbuhan jamur	24 Buah
3	Pipet	Kaca dan karet	Untuk memindahkan bahan dari alat satu ke alat lainnya dengan skala kecil	1 Buah
4	Gelas ukur	250 ml	Untuk mengukur ekstrak, etanol dan aquades	1 Buah
5	Kertas saring	Kertas	Untuk menyaring ekstrak yang telah direndam	3 Lembar
6	Timbangan digital	Plastik	Untuk mengukur berat PDA, dan serbuk bawang putih	1 Buah
7	Inkubator	Suhu 28°C	Untuk menyimpan cawan petri yang	1 Buah

			terdapat PDA dan jamur dengan suhu yang telah ditentukan	
8	Autoclave		Untuk sterilisasi alat dan bahan yang akan dipakai	1 Buah
9	Lampu Spirtus	Kaca dan spirtus	Untuk memanaskan cawan petri agar tetap steril	3 Buah
10	Korek api	Kayu	Untuk menyalakan lampu spirtus	1 Buah
11	Blender	Philips	Untuk menghaluskan bawang putih menjadi bubuk	1 Buah
12	Jas laboratorium	Kain	Untuk menjaga kebersihan alat dan bahan	1 Buah
13	Sarung tangan	Karet	Untuk menjaga kebersihan alat dan bahan	1 Pasang
14	Kamera Digital	Optik	Untuk dokumentasi alat, bahan, dan pertumbuhan koloni jamur	1 Buah
15	Labu elemeyer	1000 ml	Untuk tempat pembuatan PDA	2 Buah
16	Pengebor gabus	Stenlis 7mm	Untuk mencetak jamur	1 Buah
17	<i>Magnetic heated stirer</i>	Magnet	Untuk mengaduk PDA agar tercampur merata	1 Buah
18	Penggaris	Plastik	Untuk mengukur diameter koloni jamur	1 Buah
19	Masker	Kain	Untuk menjaga kebersihan alat dan bahan	1 Buah
20	<i>Rotary evaporator</i>		Untuk menguapkan ekstrak bawang putih yang telah direndam selama 24 jam. Dan untuk memisahkan bahan aami yang terkandung dalam ekstrak bawang putih	1 Buah

Tabel 3.4 Daftar Bahan Penelitian

No	Nama Bahan	Spesifikasi	Fungsi	Jumlah
1	Bawang Putih	Umbi	Sebagai subjek bahan penelitian	2 kg
2	<i>Fusarium oxysporum</i>	Jamur	Sebagai objek yang diamati	Secukupnya
3	Etanol 70%	Cair	Sebagai campuran ekstrak bawang putih dan untuk memisahkan zat yang terkandung di dalam ekstrak bawang putih	5 Liter
4	PDA (<i>Potato Dextrose Agar</i>)	Serbuk	Sebagai media untuk pertumbuhan jamur <i>Fusarium oxysporum</i>	40 gram
5	Spiritus	Cair	Sebagai bahan untuk menyalakan api	Secukupnya
6	Aquades	Cair	Sebagai campuran PDA dan ekstrak bawang putih untuk pembuatan PDA	1500 ml

2. Tahap Perlakuan

a. Pembuatan Simplisia Bawang Putih

Pembuatan simplisia meliputi persiapan bahan, di mana bawang putih segar di cuci, dibersihkan dan ditiriskan. Kemudian melakukan pengeringan. pengeringan ini terdiri dari tiga cara yaitu pengeringan dengan sinar matahari, dengan alat pengering (*oven*) dan pengeringan dengan aliran udara atau kering angin (Suhirman dkk, 2006, hlm. 317). Pada penelitian ini pengeringan dilakukan dengan alat pengering (*oven*).

Sebelum melakukan pengeringan bawang putih yang sudah yang sudah dibersihkan, bawang putih diiris dengan tebal 1-2 mm lalu ditimbang sebanyak 2

kg. Pengeringan bawang putih ini dilakukan selama 1 jam sampai bahan tersebut berwarna coklat dan kadar airnya berkurang. Kemudian bawang putih yang sudah dikeringkan tersebut diblender, ditimbang dan di simpan didalam plastik yang kedap udara.

b. Pembuatan Ekstrak Bawang Putih

Ekstraksi adalah kegiatan penarikan kandungan kimia yang dapat larut sehingga terpisah dari bahan yang tidak larut dengan pelarut cair (Ditjen POM, 2000, hlm. 10). Metode yang digunakan dalam ekstraksi ini adalah maserasi, yaitu cara penyarian yang sederhana, karena cairan penyaring akan menembus dinding sel dan masuk kedalam rongga sel yang mengandung zat aktif. Zat aktif ini akan larut dan adanya perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif didalam dengan diluar sel menyebabkan larutan yang terpekat keluar hingga terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan didalam dengan diluar sel (Susetya, 2012, hlm. 25). Cairan penyaring yang digunakan dalam proses maserasi adalah etanol 70%. Etanol dipertimbangkan sebagai cairan penyaring karena lebih selektif, tidak beracun, netral, dan memerlukan panas yang sedikit untuk proses pemekatan.

Simplisia bawang putih yang sudah dihaluskan di timbang sebanyak 500 gram. Kemudian simplisia tersebut dimasukkan kedalam toples dan ditambahkan etanol 70% dengan perbandingan 1:5 yaitu sebanyak 2500 ml. Setelah itu larutan diaduk dengan menggunakan alat pengaduk sampai larutan tersebut homogen. Larutan tersebut didiamkan selama satu malam kemudian disaring dengan menggunakan kertas saring dan ampas yang diperoleh dimaserasi kembali dengan pelarut yang sama. Tahap ini dilakukan sebanyak 2 kali pengulangan sampai filtratnya berwarna bening. Hasil dari saringan tersebut dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40°C sampai didapatkan ekstrak pekat. Proses pemekatan ekstrak ini dilaksanakan di Laboratorium Teknologi Pangan, Universitas Pasundan.

c. Pembuatan Konsentrasi Bawang Putih

Konsentrasi ekstrak bawang putih yang divariasikan dengan menggunakan pelarut aquades steril yaitu 30%, 40%, 50%, 60%, dan 70%. Kontrol yang digunakan adalah aquades steril. Semua konsentrasi ekstrak bawang putih dibuat dalam 160 ml. Pembuatan konsentrasi ekstrak bawang putih yang diinginkan

diperoleh dengan cara menggunakan rumus presentase melalui pelarut aquades, yaitu dengan rumus:

$$V_p \cdot K_p = V_e \cdot K_e$$

Keterangan :

V_p = Volume larutan pekat

K_p = Konsentrasi larutan pekat

V_e = Volume larutan encer

K_e = konsentrasi larutan encer

(Suhara, 2013, hlm. 44).

1) Konsentrasi ekstrak bawang putih 30%

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

2) Konsentrasi ekstrak bawang putih 40%

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

3) Konsentrasi ekstrak bawang putih 50%

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

4) Konsentrasi ekstrak bawang putih 60%

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

5) Konsentrasi ekstrak bawang putih 70%

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

Penghitungan berbagai konsentrasi ekstrak bawang putih terdapat dalam Lampiran 10.

d. Pembuatan Medium PDA (*Potato Dextrose Agar*)

Pembuatan PDA (*Potato Dextrose Agar*) dalam kemasan yaitu 40 gram dan aquades sebanyak 1 liter. PDA (*Potato Dextrose Agar*) ini berbentuk serbuk kasar dan berwarna kuning dengan merek Merck. PDA (*Potato Dextrose Agar*)

dilarutkan dengan aquades dan dipanaskan dengan menggunakan stirer sampai serbuk PDA (*Potato Dextrose Agar*) larut dalam aquades hingga berwarna kuning bening.

e. Sterilisasi

Alat tahan panas yang sudah dicuci dan dikeringkan, bahan, serta media yang digunakan dalam penelitian dibungkus dengan plastik anti panas. Kemudian disterilkan dengan menggunakan *autoclave*, yaitu alat serupa tangki minyak yang dapat diisi dengan uap selama 15 sampai 20 menit, hal ini bergantung kepada banyak sedikitnya barang yang perlu di sterilkan. Setelah pintu *autoclave* di tutup rapat, barulah kran pada pipa uap dibuka, dan temperatur akan terus-menerus naik hingga sampai pada suhu 121°C, tekanan 1 atm. Penghitungan waktu 15 atau 20 menit itu dimulai semenjak termometer pada *autoclave* menunjuk 121°C. Setelah cukup waktu, maka kran uap di tutup dan suhu mulai turun sedikit demi sedikit, demikian pula dengan monometer hingga menunjukkan 0 barulah *autoclave* di buka. Untuk alat-alat yang tidak tahan panas di sterilkan dengan cara disemprot alkohol 70% (Dwidjoseputro, 2001, hlm. 44).

f. Penyediaan dan pemeliharaan jamur

Jamur *Fusarium oxysporum* diperoleh dari Fakultas Pertanian, Departemen Proteksi Tanaman, Institut Pertanian Bogor yang telah di isolat dan dibiakkan. Isolat yang tumbuh pada medium tersebut dimurnikan dan diremajakan pada medium *Potato Dextrose Agar* (PDA).

J. Uji ekstrak bawang putih dalam menghambat pertumbuhan jamur *Fusarium oxysporum* secara uji *In vitro*

Uji ekstrak bawang putih sebagai fungisida alami dengan menggunakan teknik dilusi padat. Miselium *Fusarium oxysporum* diambil dengan cara memotong PDA yang telah ditumbuhi biakan murni *Fusarium oxysporum* dengan pemotong gabus media berdiameter 7 mm. Miselium tersebut diinokulasikan pada PDA yang telah dicampur dengan larutan ekstrak di bagian tengah cawan petri, kemudian diinkubasi pada suhu 28°C selama 5x24 jam. Parameter yang diamati adalah diameter koloni jamur *Fusarium oxysporum* dengan menggunakan penggaris.