

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan waktu penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Pertanian Universitas Siliwangi pada bulan Februari 2024.

3.2 Alat dan bahan penelitian

Alat-alat yang digunakan diantaranya, *autoclave*, *Laminar Air Flow Cabinet* (LAFC), mikroskop, neraca analitik, tabung reaksi, tabung ukur, gelas ukur, labu erlenmeyer, cawan petri, pipet tetes, mikropipet, jarum ose, gelas objek, cover gelas, plastik wrap, *cork borer*, lampu bunsen, korek, rak inkubasi, batang pengaduk, kertas saring, jangka sorong, penggaris, alat tulis, kamera *handphone*, dan *stopwatch*. Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah sampel hasil ekstraksi akar ginseng jawa yang diperoleh dari hasil penelitian sebelumnya, media *Potato Dextrose Agar* (PDA), aquades, alkohol 96%, spirtus, isolat patogen *Pythium* sp., *Botrytis* sp., *Fusarium* sp., dan isolat patogen *Rhizopus stolonifer*, tisu, masker, dan sarung tangan.

3.3 Metode penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode eksperimental. Penelitian eksperimen ini dilakukan dengan pengujian beberapa konsentrasi ekstrak ginseng jawa terhadap patogen *Pythium* sp., *Botrytis* sp., *Fusarium* sp., dan *Rhizopus stolonifer*. Adapun rancangan penelitian yang digunakan yaitu rancangan acak lengkap (RAL) faktorial dengan 2 faktor. Faktor pertama yaitu patogen tanaman yang terdiri dari 4 taraf dan faktor kedua yaitu konsentrasi ekstrak akar ginseng jawa yang terdiri dari 5 taraf.

- a. Faktor pertama yaitu patogen (P), terdiri dari 4 taraf

p1 = *Pythium* sp.

p2 = *Fusarium* sp.

p3 = *Rhizopus stolonifer*

p4 = *Botrytis* sp.

- b. Faktor kedua yaitu konsentrasi ekstrak akar ginseng jawa (K), terdiri dari 5 taraf

k1 = 0% (kontrol)

k2 = ekstrak ginseng jawa 5%

k3 = ekstrak ginseng jawa 10%

k4 = ekstrak ginseng jawa 20%

k5 = ekstrak ginseng jawa 40%

Diperoleh 20 unit percobaan dan masing-masing diulang sebanyak 3 kali ulangan.

Kombinasi perlakuan patogen (P) dan konsentrasi (K) disajikan pada tabel

1.

Tabel 1. Kombinasi perlakuan patogen dan konsentrasi ekstrak

Patogen (P)	Konsentrasi (K)				
	k1	k2	k3	k4	k5
p1	p1k1	p1k2	p1k3	p1k4	p1k5
p2	p2k1	p2k2	p2k3	p2k4	p2k5
p3	p3k1	p3k2	p3k3	p3k4	p3k5
p4	p4k1	p4k2	p4k3	p4k4	p4k5

Data hasil pengamatan dianalisis menggunakan model linier rancangan acak lengkap faktorial sebagai berikut:

$$Y_{ijk} = \mu + \tau_i + \alpha_j + \beta_k + (\alpha\beta)_{jk} + \epsilon_{ijk}$$

Keterangan:

Y_{ijk} = Hasil pengamatan dari plot percobaan yang mendapatkan perlakuan ke-I taraf ke-j dan faktor taraf ke-k serta ditempatkan di ulangan ke-i

μ = Pengaruh nilai tengah/rata-rata umum

τ_i = Pengaruh kelompok ke-j

α_j = Pengaruh faktor I taraf ke-j

β_k = Pengaruh faktor II taraf ke-k

$(\alpha\beta)_{jk}$ = Pengaruh kombinasi perlakuan antara faktor I taraf ke-j dan faktor II taraf ke-k

ϵ_{ijk} = Pengaruh galat akibat faktor I taraf ke-j dan faktor II taraf ke-k yang ditempatkan pada kelompok ke-i

Data hasil pengamatan dari masing-masing perlakuan diolah secara statistik dengan menggunakan daftar sidik ragam, seperti tabel berikut:

Tabel 2. Sidik ragam

Sumber keragaman	Db	JK	KT	F hit.	F 0, 05
Perlakuan	19	$\frac{\sum x^2}{r} - FK$	JK_P/db_P	KT_P/KT_g	
Patogen (P)	3	$\frac{\sum A^2}{rb} - FK$	JK_A/db_I	KT_A/KT_g	2, 85
Konsentrasi (K)	4	$\frac{\sum B^2}{ra} - FK$	JK_B/db_V	KT_B/KT_g	2, 62
Interaksi P x K	12	$JKP-JKI-JKV$	$Jkab/dbIV$	KT_{AB}/KT_g	2, 02
Galat	38	$Jk_{total} - JK(U) - Jk_{perlakuan}$	JKG/dbG		
Total	59	$\sum x. . . ij^2 - FK$			

Sumber: Gomez dan Gomez (2015)

Kaidah pengambilan keputusan berdasarkan pada nilai F_{hitung} dapat dilihat pada tabel berikut:

Tabel 3. Kaidah pengambilan keputusan

Hasil analisa	Kesimpulan analisa	Keterangan
$F_{hit} \leq F_{0,05}$	Berbeda tidak nyata	Tidak ada pengaruh
$F_{hit} > F_{0,05}$	Berbeda nyata	Ada pengaruh

Jika terjadi perbedaan antar perlakuan atau berpengaruh nyata, maka dilakukan uji lanjut dengan uji jarak berganda Duncan pada taraf nyata 5% dengan rumus sebagai berikut:

$$LSR (\alpha, dBg, p) = SSR (\alpha, dBg, p) \cdot S_x$$

Apabila terdapat interaksi, untuk membedakan pengaruh faktor ekstrak (e) pada setiap konsentrasi (k) dan sebaliknya untuk membedakan taraf konsentrasi (k) pada setiap perlakuan ekstrak (e), S_x diperoleh dengan rumus:

$$S_x = \sqrt{\frac{KT_{Galat}}{r}}$$

Apabila tidak terdapat interaksi:

1. Untuk membedakan pengaruh faktor patogen (p) pada seluruh perlakuan faktor konsentrasi (k), S_x dihitung dengan rumus:

$$S_x = \sqrt{\frac{KT \text{ Galat}}{rp}}$$

2. Untuk membedakan pengaruh faktor konsentrasi (k) pada seluruh taraf faktor patogen (p), S_x dihitung dengan rumus:

$$S_x = \sqrt{\frac{KT \text{ Galat}}{rk}}$$

Keterangan :

LSR = *Least Significant Range*

SSR = *Significant Stuenalized Range*

α = Taraf Nyata 5%

dBg = Derajat Bebas Galat

p = *Range* (Perlakuan)

S_x = Galat Baku Rata-Rata (*Standard Error*)

KTG = Kuadrat Tengah Galat

r = Jumlah ulangan pada tiap nilai tengah perlakuan yang dibandingkan

3.4 Pelaksanaan penelitian

3.4.1 Sterilisasi alat laboratorium

Semua alat yang digunakan dalam laboratorium dilakukan sterilisasi agar segala kontaminan yang ada di dalam peralatan yang digunakan dapat dieliminasi. Metode yang umum digunakan dalam sterilisasi alat laboratorium adalah metode panas lembab menggunakan autoklaf. Semua peralatan laboratorium yang akan digunakan dicuci terlebih dahulu dengan sabun dan air mengalir hingga bersih lalu dikeringanginkan, dibungkus dengan menggunakan kertas dan plastik tahan panas. Kemudian disterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm. Untuk alat yang tidak tahan panas disterilisasi dengan menggunakan alkohol 70%.

3.4.2 Pembuatan media PDA

Media PDA dibuat dengan cara melarutkan PDA dalam aquades sesuai dengan volume yang dibutuhkan (komposisi PDA dalam 1000 ml adalah 39 gram).

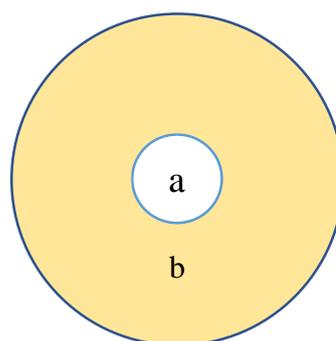
Media dipanaskan dan diaduk menggunakan *magnetic stirrer* hingga homogen. Tabung erlenmeyer disumbat menggunakan kapas dan kasa serta ditutup dengan aluminium foil dan plastic wrap, kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

3.4.3. Regenerasi isolat patogen

Salah satu langkah persiapan isolat cendawan yaitu dengan regenerasi. Menurut Machmud (2001) peremajaan dilakukan dengan cara memindahkan atau memperbaharui biakan mikroba dari biakan lama ke media tumbuh yang baru. Media PDA yang sudah dibuat dituangkan ke dalam cawan petri sebanyak 10 ml dalam *laminar air flow*. Media PDA dipadatkan dan dibiarkan selama satu hari untuk memastikan tidak terdapat kontaminan di dalam media. Patogen diambil dengan menggunakan bor gabus dan jarum ose lalu ditanam dalam media baru yang sudah memadat tersebut. Biakan diinkubasi selama 4 x 24 jam pada suhu kamar (modifikasi dari Hidayatullah, 2012 dalam Musta dan Nurliana, 2019).

3.4.4. Uji daya hambat ekstrak

Uji daya hambat ekstrak ginseng jawa dilakukan untuk dapat mengetahui kemampuan ekstrak ginseng jawa dalam menghambat pertumbuhan patogen. Daya hambat yang dihasilkan oleh ekstrak ginseng jawa disebabkan karena adanya kandungan antijamur yang dimiliki oleh ekstrak ginseng jawa.



Gambar 7. Uji daya hambat ekstrak
(sumber : dokumen pribadi, 2023)

Keterangan: a = patogen uji
b = media PDA

Media PDA yang sudah dingin dituang dalam cawan petri sebanyak 9 ml. Tambahkan 1 ml ekstrak akar ginseng jawa dengan konsentrasi 0% (kontrol), ekstrak akar ginseng jawa konsentrasi 5%, 10%, 20%, dan 40%. Kemudian beri

tanda pada bagian tengah *petridish* sebagai titik peletakan *Rhizopus stolonifer*, *Fusarium sp.*, *Pythium sp.*, dan *Botrytis sp.* Pengambilan patogen dapat dilakukan dengan metode *cork borer* dengan diameter 5 mm dan dipindahkan dengan menggunakan ose. Selanjutnya *Rhizopus stolonifer*, *Fusarium sp.*, *Pythium sp.*, dan *Botrytis sp.* diletakan pada bagian tengah media dalam petri yang telah ditandai serta aktifitas tersebut dilakukan dalam *laminar air flow*. Lalu media diinkubasi selama 7 hari pada suhu 37°C. Bagian cawan petri yang bening diukur dengan menggunakan jangka sorong untuk mengetahui diameter zona hambat yang terbentuk.

3.5 Parameter pengamatan

3.5.1 Parameter penunjang

Parameter penunjang yaitu faktor-faktor eksternal yang dapat mempengaruhi penelitian. Parameter penunjang merupakan data kandungan metabolit sekunder secara kualitatif yang diperoleh dari penelitian sebelumnya (Nurjanah, 2023).

3.5.2 Parameter utama

1) Diameter koloni patogen

Pengamatan daya hambat patogen *Pythium sp.*, *Botrytis sp.*, *Fusarium sp.*, dan *Rhizopus stolonifer* dilakukan setelah 1 hari masa inkubasi hingga hari ke 7. Pengamatan dilakukan dengan cara mengukur diameter koloni yang tumbuh dengan menggunakan sorong/mistar dan dihitung dengan rumus berikut.

$$D = \frac{D1 + D2}{2}$$

Keterangan:

D : Diameter koloni patogen;

D1, D2 : Panjang koloni patogen hasil pengukuran dari dua arah yang berbeda.

2) Daya hambat (*Inhibitory rate*)

Pengukuran parameter tersebut dilakukan pada waktu dan suhu yang sama setelah inkubasi. *Inhibitory rate* indeks antijamur diperoleh dari persamaan berikut (Hartati, 2013 dan Suresh dkk, 2019):

$$\text{DH (\%)} = \frac{\text{Diameter kontrol} - \text{diameter perlakuan}}{\text{Diameter Kontrol}} \times 100\%$$

Keterangan:

DH: Daya Hambat (%)

3) Analisis mikroskopis

Pengamatan ini dilakukan dibawah mikroskop yaitu pada hari ke-7 setelah inkubasi dengan mengamati perbedaan miselium patogen sesudah perlakuan. Pengamatan ini dilakukan dengan pewarnaan miselium menggunakan larutan *Lactophenol Cotton Blue* (LCB).