3. METODOLOGI

3.1 Waktu dan Tempat Pelaksanaan

Penelitian ini dilaksanakan mulai Agustus 2015 sampai Oktober 2015 di Laboratorium Mikologi, Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian, Universitas Brawijaya Malang.

3.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu cawan Petri, *beaker glass*, kompor listrik, spatula, autoclave, Laminar Air Flow Cabinet (LAFC), destilator, pinset, jarum ose, sprayer, jarum, bunsen, botol media, silet, preparat, *cover glass*, mikroskop, pena OHP, *cork borrer* (pelubang gabus), mikro pipet, suntikan 1ml, pipet, kamera, dan alat tulis.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu isolat jamur *Gloeosporium* sp. dari buah pepaya, minyak atsiri cengkeh, minyak atsiri kemangi, alkohol 70%, spirtus, aquades, Potato Dextrose Agar (PDA), lactophenol cotton blue, tween 80, tisu steril, kapas, *aluminium foil*, *plastic wrap*, dan kertas label.

3.3 Metode Penelitian

Rancangan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) sederhana dengan 9 perlakuan yang diulang sebanyak 4 kali. Tabel perlakuan dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Tabel perlakuan.

Jenis	Konsentrasi
Kontrol	0 ml/l
Minyak cengkeh	0,15 ml/l
Minyak cengkeh	0,25 ml/l
Minyak cengkeh	0,35 ml/l
Minyak cengkeh	0,45 ml/l
Minyak kemangi	0,15 ml/l
Minyak kemangi	0,25 ml/l
Minyak kemangi	0,35 ml/l
Minyak kemangi	0,45 ml/l

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

3.4 Persiapan Penelitian

1. Minyak atsiri cengkeh dan minyak kemangi

Minyak atsiri cengkeh dan kemangi diperoleh dari Laboratorium Hama dan Penyakit Tumbuhan Balai Besar Pelatihan Pertanian (BBPP) Ketindan. Minyak atsiri didapatkan dari metode penguapan dengan air dan menggunakan alat destilator.

2. Sterilisasi

Sterilisasi peralatan berbahan kaca seperti cawan Petri, *beaker glass*, dan botol media disterilisasi dengan menggunakan autoclave. Cawan Petri yang telah dicuci bersih dibungkus dengan kertas dan dimasukan dalam plastik anti panas. Peralatan disterilkan di dalam autoclave selama 30 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm. Peralatan dari logam seperti pinset disterilkan dengan alkohol 70% dan dibakar di api Bunsen hingga berwarna merah (Sastrahidayat, 2012).

3. Persiapan media

Media yang digunakan yaitu Potato Dextrose Agar (PDA). Standart operasional pembuatan media PDA dengan menyiapkan bahan berupa kentang 200 g, dextrose 20 g, agar 20 g, dan aquades 1 L. Kentang dikupas, dicuci bersih, dan dipotong dadu, kemudian dimasukan ke dalam *beker glass* lalu tambahkan aquades 1 L. Kentang dan aquades direbus hingga mendidih. Setelah mendidih kemudian disaring untuk memisahkan sari kentang dan ampas kentang. 20 g dextrose dan 20 g agar masing-masing dilarutkan dalam 100 ml aquades. Sari kentang yang telah didapatkan kemudian dicampurkan dengan larutan dextrose dan agar sampai mengental dan jika volume larutan kurang dari 1 L, tambahkan aquades pada larutan sampai volumenya 1 L. Setelah jadi media PDA cair kemudian dimasukan kedalam botol media steril dan ditutup menggunakan kapas serta aluminium foil. Sterilisasi PDA dilakukan di autoclave selama 15 menit dengan suhu 121°C dan tekanam 1 atm. PDA steril yang suhunya hangat kuku kemudian ditambahkan minyak atsiri cengkeh dan minyak atsiri kemangi dalam beberapa konsentrasi dengan tween 80 agar minyak dan media cair homogen. Teknik seperti ini sering disebut sebagai *Food Poison Technique*.

Setelah media PDA diracuni, selanjutnya dilakukan *platting*. *Platting* adalah kegiatan menuangkan media PDA cair kedalam cawan Petri. Cawan Petri

steril dan botol media PDA mula-mula dipanaskan tepinya dengan api Bunsen. Kemudian media PDA dituangkan pada cawan Petri dengan volume 10 ml. Setelah cawan Petri terisi dengan media PDA, cawan Petri dirapatkan menggunakan *plastic wrap.* Label diberikan pada cawan Petri sesuai konsentrasi pada setiap media PDA. Kegiatan ini dilakukan di LAFC.

4. Penyediaan isolat jamur *Gloeosporium* sp.

Buah pepaya yang bergejala didapatkan dari kebun pepaya milik petani setempat di daerah DAU, Malang. Bagian tanaman yang diisolasi adalah buah. Buah pepaya yang bergejala terlebih dahulu dicuci dengan air mengalir, kemudian dipotong 1 cm dengan pola $^{1}/_{4}$ bagian sehat dan $^{3}/_{4}$ bagian bergejala (Sastrahidayat, 2012). Potongan buah tersebut disterilisasi dengan merendam potongan buah ke dalan alkohol 70% selama 1 menit, dilanjutkan dengan merendam daun ke dalam aquades steril sebanyak 2 kali yang masing-masing selama 1 menit, selanjutnya dikering anginkan di atas tisu steril. Potongan buah yang telah disterilisasi kemudian ditanam di cawan Petri yang berisi PDA tidak beracun dan dirapatkan tepinya dengan menggunakan *plastic wrap*. Media PDA yang sudah ditanami dengan potongan bergejala kemudian diinkubasi selama 7 hari.

Setelah diinkubasi selama 7 hari, tahap selanjutnya adalah purifikasi atau pemurnian. Purifikasi adalah memisahkan dan menumbuhkan kembali jamur yang tumbuh pada media PDA awal dengan tujuan untuk mendapatkan biakan murni dari jamur-jamur tersebut agar mempermudah tahap identifikasi. Jamur yang tumbuh di media PDA awal dipotong menggunakan *cork borrer* 0,5 cm dan diambil dengan menggunakan jarum ose, kemudian subkultur ditanam kembali ke dalam media PDA baru. Selanjutnya diinkubasi kembali selama 7 hari sampai isolat jamur memenuhi cawan petri (*full plate*).

5. Identifikasi

Identifikasi dilakukan untuk mengetahui jamur yang ditemukan pada buah pepaya. Jamur yang telah dipurifikasi diambil sedikit dengan menggunakan jarum ose kemudian diletakan di preparat dan diberi sedikit aquades, selanjutnya ditutup dengan *cover glass,* dan diamati di bawah mikroskop. Jika badan buah, konidia,

dan konidiofor masih belum tampak jelas, preparat tersebut dapat diinkubasi selama 2-3 hari di atas tisu basah dan diletakan di kotak yang ditutup rapat.

Jamur yang telah didapat kemudian dilihat berdasarkan ciri morfologi jamur dan disesuaikan dengan buku identifikasi jamur *Illustrated Genera of Imperfect Fungi* yang disusun oleh H. L Barnett dan B. B Hunter (1972).

3.5 Pelaksanaan Penelitian

Teknik peracunan makanan

Media PDA yang sudah ditambahkan minyak atsiri cengkeh dan kemangi di *platting* ke dalam cawan Petri dan dipisahkan menurut konsentrasinya masing-masing. Setelah *platting* selesai media dibiarkan selama 3-4 hari untuk mengantisipasi adanya mikroba kontaminan pada cawan Petri. Penanaman isolat jamur *Gloeosporium* sp. yaitu tepat di tengah cawan Petri, kemudian ditutup dengan *plastic wrap* dan selanjutnya diberi label.

3.6 Pengamatan

Daya hambat minyak cengkeh dan minyak kemangi terhadap pertumbuhan jamur *Gloeosporium* sp. secara *in vitro* dihitung berdasarkan hasil pengukuran diameter koloni jamur *Gloeosporium* sp. Pengukuran diameter koloni jamur *Gloeosporium* sp. dilakukan pada saat koloni jamur pada perlakuan kontrol telah memenuhi cawan petri. Handiyanto (2012), menyatakan bahwa perhitungan diameter koloni jamur dilakukan dengan cara membuat garis vertikal dan horizontal berpotongan tepat pada titik tengah koloni jamur sesuai dengan rumus:

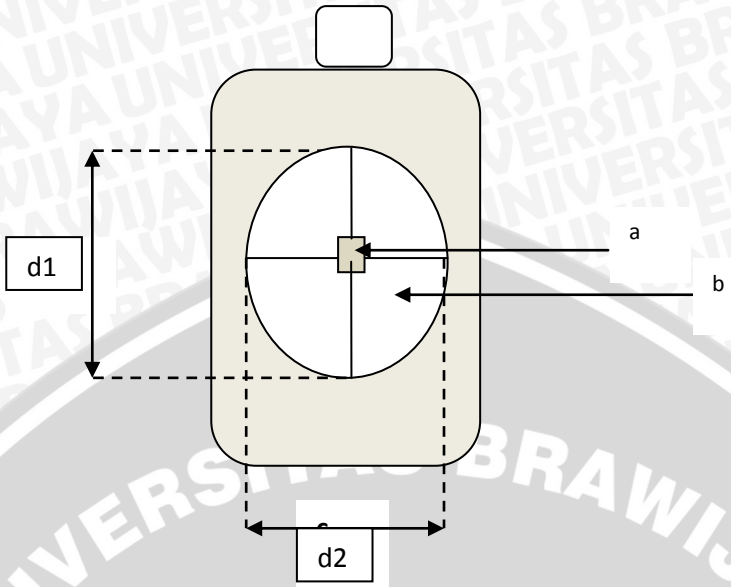
$$D = \frac{d1 + d2}{2}$$

Keterangan:

D = diameter koloni jamur

d1 = diameter vertikal koloni jamur yang diamati

d2 = diameter horizontal koloni jamur yang diamati



Gambar 4. Ilustrasi pengamatan diameter koloni jamur. a) Sub kultur jamur; b) Koloni jamur; d1) Diameter vertikal koloni jamur; d2) Diameter horizontal koloni jamur.

Setelah diketahui diameter koloni dan kecepatan pertumbuhan jamur *Gloeosporium* sp. pada setiap perlakuan dan ulangan, kemudian dihitung persentase penghambatan dari masing-masing konsentrasi dengan rumus menurut Handiyanto (2012):

$$P = \frac{D1 - D2}{D1}$$

Keterangan:

P = persentase penghambatan

D1 = diameter jamur *Gloeosporium* sp. pada kontrol

D2 = diameter jamur *Gloeosporium* sp. pada setiap perlakuan

3.7 Analisis Data

Data yang didapatkan setelah penelitian ini akan dianalisis menggunakan *Annalysis of Variance* (ANNOVA) dan jika hasilnya berbeda nyata akan di uji lanjut dengan menggunakan uji Duncan dengan taraf kepercayaan 95%.

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA