

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan tempat percobaan

Percobaan ini dilaksanakan pada bulan Februari sampai April 2023 di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Pertanian Universitas Siliwangi.

3.2 Alat dan bahan

Alat yang digunakan dalam percobaan ini yaitu *hemocytometer*, mikroskop elektrik, cawan petri, *laminar air flow* (LAF), wadah plastik, alat gelas, pipet ukur, pipet mikro, neraca digital, *magnetic stirrer*, tempat pengeringan, pisau, spatula, autoklaf, kompor, pinset, bunsen, jarum ose, *object glass*, *cover glass*, gelas ukur, botol spray, gelas ukur, *wood moisture meter*, alat pirolisis, dan alat distilasi.

Bahan yang digunakan dalam percobaan ini adalah buah tomat varietas servo dari pertanaman agribisnis di Kecamatan Ciawi, cangkang kelapa muda, *potato dextrose agar* (PDA), biakan patogen murni *Alternaria solani*, aqua-dm, tisu, alkohol (70% dan 96%), *plastic wrap*, dan *aluminium foil*.

3.3 Rancangan percobaan

3.3.1 Percobaan *in vitro*

Metode yang digunakan dalam percobaan *in vitro* adalah metode eksperimental dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL), terdiri dari 6 taraf konsentrasi asap cair cangkang kelapa muda dalam media PDA. Asap cair ditambahkan ke dalam media agar sebagai perlakuan. Konsentrasi (v/v) yang diaplikasikan yaitu sebagai berikut:

A = tanpa penambahan asap cair (kontrol)

B = konsentrasi asap cair 2%

C = konsentrasi asap cair 4%

D = konsentrasi asap cair 6%

E = konsentrasi asap cair 8%

F = konsentrasi asap cair 10%

3.3.2 Percobaan *in vivo*

Percobaan *in vivo* merupakan lanjutan dari percobaan *in vitro*, di mana konsentrasi (v/v) asap cair yang dapat menghambat pertumbuhan miselium 100% dijadikan sebagai perlakuan konsentrasi terendah pada percobaan *in vivo*. Percobaan ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 6 taraf perlakuan konsentrasi asap cair cangkang kelapa muda dan diulang sebanyak 4 kali. Setiap perlakuan terdiri dari 10 buah tomat dengan demikian diperoleh 24 unit percobaan dengan 240 buah tomat. Konsentrasi asap cair yang diaplikasikan yaitu sebagai berikut:

A = tanpa penambahan asap cair (kontrol)

B = konsentrasi asap cair 20%

C = konsentrasi asap cair 40%

D = konsentrasi asap cair 60%

E = konsentrasi asap cair 80%

F = konsentrasi asap cair 100%

3.3.3 Analisis statistik

Data hasil pengamatan dianalisis untuk mengetahui pengaruh perlakuan yang diberikan terhadap variabel yang diamati menggunakan sidik ragam (Anova) dan kaidah pengambilan keputusan berdasarkan uji F dengan tingkat kepercayaan 95%. Model linier dari RAL non faktorial sebagai berikut:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

Dengan:

$i = 1, 2, 3, 4, 5, 6$

$j = 1, 2, 3, 4$

Keterangan:

Y_{ij} = pengamatan pada perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

μ = Rataan umum

τ_i = Pengaruh perlakuan ke-i

ε_{ij} = Pengaruh acak pada perlakuan ke-i ulangan ke-j

Tabel 1. Sidik ragam Rancangan Acak Lengkap

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F hitung	F tabel 5%
Perlakuan (P)	5	$\Sigma P^2 - FK$	JK_P / db_P	KT_P / KT_G	2,77
Galat (G)	18	$JK_T - JK_P$	JK_G / db_G		
Total (T)	23	$\Sigma T^2 / r - FK$			

Keterangan: db = derajat bebas; JK = jumlah kuadrat; KT = kuadrat tengah
Sumber: Gomez dan Gomez, 2015

Tabel 2. Kaidah pengambilan keputusan

Hasil Analisa	Kesimpulan Analisa	Keterangan
$F_{hit} \leq F_{tab 0,05}$	Berbeda tidak nyata	Tidak terdapat perbedaan pengaruh antar perlakuan
$F_{hit} > F_{tab 0,05}$	Berbeda nyata	Terdapat perbedaan pengaruh antar perlakuan

Sumber: Gomez dan Gomez, 2015

Jika dari uji F terdapat perbedaan yang nyata, maka dilakukan uji lanjutan dengan Uji Jarak Berganda Duncan pada tingkat kepercayaan 95% dengan rumus berikut:

$$LSR = S_x \times SSR$$

Nilai S_x dapat dicari menggunakan rumus sebagai berikut:

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

Keterangan:

$LSR = \text{Least Significant Ranges}$

$S_x = \text{galat baku rata-rata}$

$SSR = \text{Studentized Significant Ranges}$

$KT \text{ Galat} = \text{kuadrat tengah galat}$

$r = \text{jumlah ulangan}$

3.4 Prosedur penelitian

3.4.1 Pembuatan asap cair cangkang kelapa muda

a. Pengambilan dan persiapan sampel cangkang kelapa muda

Cangkang kelapa muda diambil dari tiga kedai es kelapa muda di sekitar kampus Universitas Siliwangi. Cangkang kelapa muda yang diambil dari masing-

masing kedai sebanyak 5 kg. Kemudian cangkang dicacah menggunakan golok hingga berukuran 3 sampai 4 cm. Pencacahan bertujuan untuk mempercepat pengeringan cangkang dan memudahkan cangkang masuk ke dalam alat pirolisis. Sebelum dilakukan pirolisis, dibutuhkan penjemuran cangkang yang telah dicacah hingga mencapai kadar air 15%. Pengujian kadar air menggunakan alat *wood moisture meter* secara berkala selama proses penjemuran.

b. Proses pirolisis dan distilasi

Prosedur pirolisis dan distilasi mengikuti metode yang dilakukan Albaki *et al.* (2021). Cangkang kelapa muda yang telah kering ditimbang sebanyak 500 gram dan dimasukkan ke dalam tungku pirolisis. Selanjutnya tungku dipasangkan pada rangkaian alat pirolisis dan pembakaran dilakukan pada suhu 250°C sampai 350°C. Hasil kondensasi berupa asap cair kasar, arang, dan ter. Selanjutnya asap cair kasar atau asap cair *grade 3* yang diperoleh dimurnikan melalui distilasi. Proses distilasi dilakukan dua kali pada suhu 100°C sampai 110°C menggunakan alat distilator kaca. Hasil distilasi pertama menghasilkan asap cair *grade 2* dan distilasi kedua menghasilkan asap cair *grade 1* yang berarti memiliki kemurnian yang lebih tinggi dibandingkan *grade* lainnya.

3.4.2 Peremajaan isolat *Alternaria solani*

a. Sterilisasi alat

Peralatan yang digunakan dalam peremajaan isolat seperti cawan petri, jarum ose, dan lainnya dicuci dengan sabun pada air mengalir kemudian dikeringanginkan. Peralatan tahan panas kemudian dibungkus dengan kertas dan plastik tahan panas. Alat yang sudah dibungkus dimasukkan ke dalam autoklaf untuk disterilisasi dengan suhu 121°C dan tekanan 1,5 Psi selama 20 menit.

b. Pembuatan media kultur

Media kultur untuk peremajaan *Alternaria solani* yaitu media *Potato Dextrose Agar (PDA)*. Cendawan *Alternaria solani* diketahui mampu tumbuh pada media PDA dengan melarutkan 39 gram media PDA ke dalam 1000 ml aqua-dm. Larutan dipanaskan hingga mendidih menggunakan *hot plate magnetic stirrer* dan

dilakukan sterilisasi dalam autoklaf dengan suhu 121°C selama 20 menit. Media steril dapat dituangkan ke dalam cawan petri sebanyak 10 ml per cawan petri.

c. Identifikasi cendawan *Alternaria solani*

Isolat cendawan *Alternaria solani* didapatkan dari koleksi Laboratorium Fitopatologi Universitas Padjadjaran. Cendawan dibiakan pada media PDA dan diinkubasi pada suhu 25°C. Identifikasi makroskopis isolat dilakukan menggunakan indra penglihatan, sedangkan identifikasi mikroskopis menggunakan mikroskop elektrik. Pengamatan mikroskopis dilakukan dengan mengambil sedikit bagian miselium yang tumbuh, letakkan pada kaca objek, kemudian ditetesi dengan aqua dm dan amati pada pembesaran 10x dan 40x.

d. Peremajaan dan pemanenan isolat *Alternaria solani*

Peremajaan dilakukan dengan memindahkan sepotong kecil koloni yang dari media kemudian dipindahkan ke dalam media kultur PDA steril. Kegiatan ini ditujukan untuk menghindari adanya pertumbuhan mikroba lain dalam media. Konidia dapat dipanen setelah berumur 7 hari. Pemanenan dilakukan dengan menambahkan air steril yang telah ditambahkan 0,05% Tween-20, lalu disebar secara halus menggunakan *loop* steril dan dikondisikan pada konsentrasi 10^4 konidia/ml. Pengukuran konsentrasi 10^4 konidia/ml menggunakan *hemocytometer*.

e. Uji patogenisitas

Uji patogenisitas mengacu pada penelitian Istifadah, Putri, dan Hartati (2022) dengan cara menempelkan potongan biakan pada buah tomat yang telah dilukai. Buah tomat yang akan digunakan dicuci dengan air mengalir, kemudian permukaannya didesinfeksi dengan alkohol 70%. Pelukaan dilakukan pada buah menggunakan ujung jarum steril dengan diameter 0,5 cm. Potongan biakan cendawan *Alternaria solani* dilekatkan pada jaringan buah tomat yang telah dilukai dengan bantuan selotip. Buah tomat yang telah diberi perlakuan ditempatkan pada kotak plastik. Untuk menjaga kelembaban, di setiap pojok kotak diberi kapas basah. Potongan biakan patogen dan selotip dibuka lima hari setelah inokulasi setelah buah tomat mulai bergejala. Uji patogenisitas dilakukan secara duplo (dua kali ulangan).

3.4.3 Pengujian *in vitro*

a. Pembuatan media perlakuan

Media perlakuan berupa media PDA yang diberikan asap cair dengan konsentrasi 0%, 2%, 4%, 6%, 8%, 10%. Pengujian diawali dengan memasukkan asap cair sebanyak 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1 ml ke dalam cawan petri menggunakan mikro pipet, kemudian tambahkan media PDA steril sampai volume 10 ml dan dihomogenkan.

b. Inokulasi patogen ke media

Prosedur inokulasi patogen secara *in vitro* mengacu pada penelitian Suwignyo *et al.* (2022). Inokulasi patogen pada media perlakuan dilakukan di dalam *laminar air flow cabinet*. Inokulasi konidia *Alternaria solani* pada media perlakuan yang telah padat dilakukan dengan cara mengambil biakan *Alternaria solani* menggunakan *cork borer* (diameter 5 mm) dari biakan murni dan letakkan bagian tengah media. Media diinkubasi pada suhu 25°C. Pengamatan dilakukan setiap hari dengan menghitung diameter koloni yang terbentuk menggunakan alat ukur penggaris dan diproses dengan aplikasi *Image J*.

3.4.4 Pengujian *in vivo*

a. Persiapan buah tomat

Buah tomat diperoleh dari petani Kecamatan Ciawi yang memiliki kriteria permukaan buah berwarna jingga dan ukuran buah seragam. Buah disortir berdasarkan ukuran dan kondisi fisik permukaan yang baik. Sebelum inokulasi patogen, permukaan buah dicuci menggunakan air mengalir, kemudian direndam pada alkohol 70% dan dikeringanginkan.

b. Inokulasi patogen ke buah tomat

Inokulasi patogen ke buah tomat segar mengacu pada penelitian Zhao *et al.* (2008) dengan modifikasi. Buah yang telah disterilisasi direndam ke dalam larutan asap cair sesuai perlakuan selama 60 detik menggunakan metode pencelupan kemudian dikeringanginkan. Setelah itu, buah diberi pelukaan sedalam 3 mm dengan lebar 3 mm pada bagian equator menggunakan jarum steril. Kemudian, suspensi konidia jamur diinokulasikan pada luka dengan konsentrasi 10^4 konida/ml

sebanyak 10 μL menggunakan mikropipet dan dikeringanginkan. Buah dimasukkan ke dalam ke dalam kotak plastik pada suhu 25°C dan kelembaban berkisar 80%.

3.5 Parameter pengamatan

3.5.1 Parameter penunjang

a. Karakteristik asap cair cangkang kelapa muda

Pengujian karakteristik asap cair dilakukan untuk mengetahui kualitas asap cair cangkang kelapa muda yang dihasilkan. Karakteristik yang diuji berupa warna, transparansi, pH, rendemen, berat jenis, kadar asam dan kandungan senyawa fenol. Tahapan pengujian karakteristik asap cair sebagai berikut:

- 1) Pengujian pH dilakukan menggunakan pH meter dengan cara mencelupkan alat ke dalam asap cair skala dibaca setelah jarum penunjuk konstan.
- 2) Pengujian rendemen dilakukan melalui perhitungan dengan rumus (Diatmika *et al.*, 2019):

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{volume asap cair yang dihasilkan (ml)}}{\text{berat cangkang kelapa muda sebelum diolah (g)}} \times 100\%$$

- 3) Pengujian berat jenis menggunakan alat piknometer yang dapat mengukur volume larutan dengan akurat. Hasil pengukuran piknometer kemudian dihitung dengan rumus:

$$\text{Berat jenis } (\rho) = \frac{\text{bobot bahan (g)}}{\text{volume piknometer (ml)}}$$

- 4) Pengujian kadar asam menggunakan metode titrimetri. Pelaksanaan diawali dengan memasukkan larutan NaOH 0,1 N sampai menyentuh angka 1 pada buret titrasi. Larutan sampel 1 ml dilarutkan dengan menggunakan aqua-dm sampai volume 10 ml, kemudian indikator Phenolphthalein (pp) ditambahkan sebanyak 2 tetes. Kemudian dilakukan titrasi sampai warna larutan sampel berubah menjadi merah muda stabil, catat volume NaOH yang berkurang. Kadar asam dihitung dengan rumus (Diatmika *et al.*, 2019):

$$\text{Kadar asam} = \frac{V \times N \times \text{BM}}{\text{BC} \times 1000} \times 100\%$$

Keterangan: V = volume NaOH (ml); N = konsentrasi NaOH (N); BM = Berat molekul CH_3COOH ; BC = berat sampel (g)

5) Pengujian kandungan senyawa fenol dilakukan dengan metode kualitatif. Larutan asap cair distilasi dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 5 ml, kemudian tambahkan larutan FeCl₃ 1% sebanyak 5 tetes. Kocok beberapa saat, reaksi positif ditunjukkan dengan adanya perubahan warna larutan dari warna ungu sampai coklat.

b. Karakteristik morfologi *Alternaria solani*

Pengamatan karakteristik morfologi dilakukan untuk memastikan cendawan yang ditemukan merupakan *Alternaria solani*. Pengamatan ini berupa pengamatan makroskopis dan mikroskopis. Pengamatan makroskopis dilakukan dengan mengamati miselium yang tumbuh pada media berupa warna, margin, pola sebaran, dan tekstur permukaan miselium. Pengamatan mikroskopis pada hifa, konidiofor, dan konida menggunakan mikroskop elektrik. Morfologi *Alternaria solani* mengacu pada Marak, Ambesh, dan Das (2014); Ata, Papuangan, Bahtiar (2016); Dhaval *et al.* (2021), dan Mugao *et al.* (2021).

3.5.2 Parameter utama

a. Pengamatan *in vitro*

1) Pertumbuhan miselium

Pengamatan pertumbuhan miselium bertujuan untuk mengetahui pengaruh perlakuan asap cair pada pertumbuhan miselium. Pengamatan dilakukan dengan mengukur diameter miselium yang terbentuk pada PDA menggunakan aplikasi *Image J*. Pengamatan dilakukan pada 3 hari setelah inokulasi (HSI) sampai 7 HSI.

2) Daya hambat asap cair *in vitro*

Pengamatan daya hambat dilakukan untuk mengetahui konsentrasi minimal yang dapat menghambat pertumbuhan miselium cendawan pada media perlakuan. Perhitungan daya hambat dilakukan dengan rumus (Hizriantis, Natawijaya, dan Saepudin, 2021):

$$PP = \frac{dK - dP}{dK} \times 100\%$$

Keterangan: PP = persentase penghambatan (%); dK = diameter miselium kontrol (cm); dP = diameter miselium perlakuan (cm)

b. Pengamatan *in vivo*

1) Diameter lesi pada buah

Pengamatan diameter lesi pada buah dilakukan menggunakan aplikasi *Image J* yang diukur mulai 3 HSI, 5 HSI, dan 7 HSI. Diameter lesi ditentukan dari rerata diameter secara melintang dan membujur dari pusat infeksi setiap buahnya.

2) Daya hambat perkembangan penyakit pada buah tomat

Pengamatan daya hambat asap cair terhadap cendawan pada buah tomat dilakukan untuk melihat perbandingan infeksi yang terjadi pada perlakuan jika dibandingkan dengan kontrol. Perhitungan daya hambat dilakukan dengan rumus:

$$PP = \frac{dK - dP}{dK} \times 100\%$$

Keterangan: PP = persentase penghambatan (%); dK = diameter lesi kontrol (cm);
dP = diameter lesi perlakuan (cm).

3) Intensitas penyakit

Intensitas penyakit merupakan proporsi luas permukaan inang yang terinfeksi terhadap total luas permukaan inang yang diamati. Pengamatan dilakukan pada 7 HSI. Perhitungan intensitas penyakit dilakukan dengan rumus merujuk penelitian Refilya *et al.* (2020):

$$I = \frac{\Sigma(n \times v)}{N \times V} \times 100\%$$

Keterangan:

I = intensitas penyakit

n = jumlah buah terserang dalam setiap kategori serangan

v = nilai numerik untuk tiap kategori serangan

N = jumlah buah tomat yang diamati

V = nilai numerik kategori tertinggi.

Nilai kategori serangan sebagai berikut:

0 = tidak ada kerusakan

1 = bercak seluas 1% sampai 25%

2 = bercak seluas 26% sampai 50%

3 = bercak seluas 51% sampai 75%

4 = bercak seluas >75%