

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan tempat

Penelitian dilaksanakan pada bulan Maret 2023 sampai dengan bulan Agustus 2023. Bertempat di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Produksi Tanaman Fakultas Pertanian Kampus II Universitas Siliwangi.

3.2 Alat dan bahan

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu hemositometer, mikroskop, *petridish disposable*, *Laminar Air Flow* (LAF), neraca analitik, erlenmeyer, gelas ukur, mikro pipet, piknometer, bunsen, kaca preparat, *scalpel*, *hot plate magnetic stirrer*, jarum ose, autoklaf, mini *photo studio*, perangkat distilasi, reaktor pirolisis, dan alat tulis menulis.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu *aluminium foil*, media PDA (*Potato Dextrosa Agar*), NaOH 0,1 N, FeCl₃ 1%, NaOCl 2%, aqua-dm, indikator phenolphthalein, *tween* 20 (polisorbat 20), alkohol 70%, *plastic wrap*, *chloramphenicol*, spirtus, cangkang kelapa muda, buah stroberi yang terinfeksi cendawan *Botrytis cinerea*, dan buah stroberi sehat yang diperoleh dari perkebunan stroberi di Kecamatan Malangbong Kabupaten Garut.

3.3 Metode percobaan

3.3.1 Uji *in vitro*

Uji *in vitro* merupakan kegiatan percobaan untuk menguji daya hambat asap cair terhadap pertumbuhan miselium *Botrytis cinerea* secara *in vitro* sehingga diketahui konsentrasi asap cair yang akan digunakan pada uji *in vivo*. Uji ini menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri dari 6 perlakuan konsentrasi asap cair cangkang kelapa muda yang diaplikasikan ke dalam media PDA. Adapun taraf konsentrasi asap cair yang diaplikasikan mengacu pada penelitian Aisyah *et al*, (2013) yaitu:

A = Konsentrasi asap cair 0% (kontrol)

B = Konsentrasi asap cair 1%

C = Konsentrasi asap cair 2%

D = Konsentrasi asap cair 3%

E = Konsentrasi asap cair 4%

F = Konsentrasi asap cair 5%

3.3.2 Uji *in vivo*

Uji *in vivo* merupakan uji lanjutan setelah uji *in vitro*, uji ini dilakukan untuk mengaplikasikan konsentrasi asap cair pada uji *in vitro* yang mampu menghambat pertumbuhan cendawan hingga 100% dikali 10 kemudian digunakan sebagai perlakuan konsentrasi paling rendah pada uji *in vivo*. Peningkatan konsentrasi asap cair pada uji *in vivo* ini dilakukan agar mendapatkan efek penghambatan yang lebih baik dari media sebelumnya dikarenakan pada uji *in vivo* terdapat faktor tempat hidup inang dan fisiologis buah yang mempengaruhi pertumbuhan patogen. Pada uji *in vivo* ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 6 perlakuan konsentrasi asap cair serta diulang sebanyak 4 kali sehingga diperoleh 24 unit percobaan. Setiap unit percobaan terdiri dari 10 buah stroberi, maka total buah yang diperlukan adalah 240 buah stroberi segar.

Taraf konsentrasi asap cair yang digunakan dalam uji *in vivo* yaitu:

A = Konsentrasi asap cair 0% (kontrol)

B = Konsentrasi asap cair 10%

C = Konsentrasi asap cair 20%

D = Konsentrasi asap cair 30%

E = Konsentrasi asap cair 40%

F = Konsentrasi asap cair 50%

3.4 Analisis data

Pengolahan data hasil penelitian dianalisis dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh perlakuan yang digunakan terhadap variabel yang diamati menggunakan sidik ragam dengan kaidah pengambilan keputusan berdasarkan uji F.

Tabel 1. Analisis sidik ragam

Sumber Ragam	Db	JK	KT	Fhit	Ftab 5%
Perlakuan	5	$\sum X^2 - FK$	JK_P/db_p	KT_P/KT_G	2,77
Galat	18	$JK_T - JK_P$	JK_G/db_G		
Total	23	$\sum T^2/r - FK$			

(Sumber: Gomez & Gomez, 2007)

Tabel 2. Kaidah pengambilan keputusan

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

(Sumber: Gomez & Gomez, 2007)

Apabila hasil uji F didapatkan adanya pengaruh maka perlu dilakukan uji lanjutan dengan uji lanjut berganda duncan pada taraf 5% dengan rumus sebagai berikut:

$$LSR = S_x \times SSR$$

Adapun nilai S_x dapat dihitung dengan rumus:

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

Keterangan:

$LSR = \text{Least Significant Ranges}$

$SSR = \text{Studentized Significant Ranges}$

$S_x = \text{Galat Baku Rata-rata}$

$KT \text{ Galat} = \text{Kuadrat Tengah Galat}$

$r = \text{Jumlah Ulangan}$

(Sumber: Gomez & Gomez 2007)

3.5 Pelaksanaan percobaan

3.5.1 Persiapan bahan asap cair cangkang kelapa muda

Asap cair cangkang kelapa muda berasal dari cangkang kelapa muda berukuran sedang yang dikumpulkan secara keseluruhan meliputi cangkang,

serabut, hingga tempurungnya. Cangkang kelapa muda yang terkumpul kemudian dipotong menggunakan golok atau pisau pencacah hingga berukuran ± 5 cm. Cangkang kelapa muda yang telah dipotong diukur kadar airnya sebelum penjemuran dan saat penjemuran yang dilakukan menggunakan alat *wood moisture meter* hingga kadar air berjumlah 15%, penjemuran dilakukan di bawah sinar matahari secara langsung.

3.5.2 Pembuatan asap cair cangkang kelapa muda

Cangkang kelapa muda yang telah kering kemudian dipirolisis dalam tungku pirolisis dengan memasukkan cangkang yang telah dipotong dan kering pada tahap sebelumnya sebanyak 1000 gram. Pirolisis dilakukan dengan memasang tungku pada alat pirolisis kemudian dilakukan pembakaran dengan suhu maksimal 350°C-400°C. Dalam 1 kali pembakaran dilakukan selama 1 jam untuk memperoleh asap cair *grade 3*, kemudian asap cair dibiarkan mengendap selama 1 minggu dengan tujuan agar tar hasil pirolisis mengendap. Asap cair yang telah diperoleh kemudian di distilasi dengan distilator kaca pada suhu 100 sampai 110°C hingga diperoleh asap cair *grade 2*. Asap cair hasil distilasi kemudian dimurnikan kembali (redistilasi) dengan tahapan distilasi yang sama hingga didapatkan asap cair dengan tingkat kemurnian yang tinggi (*grade 1*).

3.5.3 Karakterisasi kualitas asap cair

Karakterisasi asap cair cangkang kelapa muda dilakukan melalui uji sifat fisika dan kimia. Uji sifat fisika yang dilakukan pada penelitian ini yaitu dengan menghitung nilai rendemen, densitas, transparansi, dan warna asap cair. Dalam menghitung nilai densitas (bobot jenis) asap cair digunakan alat piknometer, piknometer disterilisasi terlebih dahulu dengan alkohol 96% kemudian di oven pada suhu 105°C dan didiamkan selama 15 menit hingga dingin kembali. Pengamatan dilakukan dengan menimbang bobot piknometer kosong pada neraca analitik kemudian piknometer diisi dengan 10 ml asap cair hingga volume asap cair melebihi tanda tera dan piknometer ditutup tanpa adanya gelembung udara di dalamnya kemudian piknometer ditimbang kembali pada neraca analitik.

Pengujian warna asap cair menggunakan metode kualitatif dengan bantuan aplikasi Kolorimeter sehingga dapat mengukur warna cahaya tampak, CIELAB, Kroma, RGB, dan Hue. Asap cair dimasukkan ke dalam gelas kaca kemudian diambil gambar dalam mini *photo studio* dengan tujuan pencahayaan yang cukup dan baik juga warna yang stabil. Gambar yang diperoleh kemudian diproses dalam aplikasi sehingga didapatkan data warna dan panjang gelombangnya.

Uji sifat kimia yang dilakukan yaitu dengan menghitung nilai pH, total asam tertitrasi (TAT), dan ada atau tidaknya senyawa fenol dalam asap cair. Nilai pH dihitung menggunakan pH indikator universal dengan menyiapkan 10 ml asap cair kemudian pengukuran dilakukan dengan mencelupkan ujung indikator yang berwarna dan tunggu sekitar 60 detik hingga asap cair terserap dalam indikator kemudian cocokkan warna yang muncul dengan warna yang ada dalam skala pH indikator universal. Nilai total asam tertitrasi (TAT) ditentukan menggunakan metode titrasi (titrimetri) yaitu dengan mencampurkan 10 ml asap cair dengan 100 ml akuades lalu dihomogenkan dan ditambah dengan 2 hingga 3 tetes indikator phenolphthalein dan dititrasi dengan larutan NaOH 0,1 N, titrasi dihentikan jika titik akhir titrasi menunjukkan adanya perubahan warna asap cair merah keunguan yang cenderung stabil.

Uji sifat kimia selanjutnya yaitu menguji adanya kandungan senyawa fenol dalam asap cair yang dilakukan dengan metode kualitatif. Asap cair *grade 1* dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 5 ml kemudian ditetesi reagen FeCl_3 sebanyak 5 tetes kemudian dihomogenkan. Reaksi positif adanya kandungan senyawa fenol ditunjukkan dengan adanya perubahan warna larutan asap cair *grade 1* menjadi berwarna coklat.

3.5.4 Sterilisasi alat

Sterilisasi yang dilakukan yaitu dengan mencuci alat-alat laboratorium seperti spatula, erlenmeyer, gelas kimia, dan gelas ukur menggunakan sabun dan air mengalir kemudian bilas keringkan lalu seluruh alat dibungkus menggunakan kertas dan kantong plastik anti panas. Kemudian dilakukan sterilisasi autoklaf pada

suhu 121°C dan tekanan 1,5 Psi (kg/cm²) selama 60 menit, alat yang tidak tahan terhadap panas hanya disterilkan menggunakan alkohol 70%.

3.5.5 Pembuatan media kultur

Media kultur cendawan yang digunakan yaitu *Potato Dextrose Agar* (PDA) instan sebanyak 12,48 gram dan akuades steril sebanyak 320 ml yang dihomogenkan dengan menggunakan *hot plate magnetic stirrer*. PDA yang telah homogen kemudian disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 1,5 Psi (kg/cm²) selama 20 menit. Kemudian PDA dituangkan dalam cawan petri dengan konsentrasi 10 ml/cawan.

3.5.6 Isolasi dan identifikasi *Botrytis cinerea*

Isolasi dan identifikasi yang dilakukan pada penelitian ini mengacu pada penelitian Komalaningrat, (2018). Isolasi cendawan *Botrytis cinera* dilakukan dengan mengambil bagian tanaman stroberi sakit yang memperlihatkan adanya gejala penyakit busuk kapang kelabu yaitu adanya koloni cendawan berwarna abu-abu. Isolasi dilakukan dengan metode tanam hifa atau bagian tanaman sakit ditanam di atas media PDA. Bagian tanaman sakit disterilkan menggunakan NaOCl 1% selama 1 menit dan dibilas dengan akuades steril lalu ditanam di atas media PDA.

Masa inkubasi dilakukan pada suhu kamar 25°C dengan kondisi gelap terang masing-masing 12 jam. Identifikasi dilakukan secara mikroskopis dan makroskopis. Identifikasi secara mikroskopis dilakukan melalui mikroskop elektrik yang dilakukan dengan mengambil bagian miselium yang telah tumbuh ke dalam kaca objek dan ditetesi aqua dm lalu diamati pada ukuran 10x dan 40x pembesaran. Sedangkan identifikasi makroskopis dilakukan dengan mengamati pola pertumbuhan miselium kapang.

3.5.7 Pemurnian dan pemanenan *Botrytis cinerea*

Pemurnian isolat murni cendawan *Botrytis cinerea* dilakukan dengan mengambil bagian kecil dari koloni hasil isolasi dan memindahkan koloni tersebut ke dalam PDA yang sudah disterilisasi. Alat perbanyak yang digunakan yaitu konidia yang dipanen pada umur 7-10 hari dan pemanenan dilakukan dengan

menambahkan air steril yang telah dicampurkan dengan *tween-20* sebanyak 0,05% dan disebarakan menggunakan *loop steril* dengan konsentrasi 10^5 konidia/ml air steril yang diukur menggunakan hemositometer.

3.5.9 Uji aktivitas cendawan dan daya hambat asap cair secara *in vitro*

Uji aktivitas cendawan dan daya hambat asap cair dilakukan melalui media kultur PDA steril yang diberi perlakuan asap cair *grade 1* hasil distilasi sesuai dengan konsentrasi yang ditentukan pada uji *in vitro* yaitu 0, 1, 2, 3, 4, dan 5% yang dimasukkan ke dalam cawan petri menggunakan pipet mikro hingga PDA dan asap cair bervolume 10 ml dalam cawan petri kemudian dihomogenkan. Dalam kedua larutan tersebut kemudian dilakukan inokulasi patogen dengan memasukkan 10 mikro liter suspensi konidia dengan kerapatan 10^5 /ml menggunakan mikro pipet di atas kertas cakram tepat di tengah cawan petri. Setelah diinokulasikan, media disimpan dan diinkubasi pada suhu 25°C. Pengamatan dilakukan dari 3, 5, dan 7 hari setelah inokulasi dilakukan dengan mengukur diameter koloni cendawan menggunakan penggaris.

3.5.10 Persiapan buah stroberi

Buah stroberi didapatkan dari perkebunan stroberi di daerah Kecamatan Malangbong Kabupaten Garut yang dipilih dengan kriteria matang, permukaan buah berwarna merah segar, kondisi fisik baik (tidak rusak, tidak ada goresan), dan berukuran seragam. Setiap plot percobaan memerlukan 10 buah stroberi sehingga untuk 24 unit percobaan memerlukan 240 buah stroberi. Buah stroberi disterilkan terlebih dahulu menggunakan air mengalir dan sabun kemudian direndam dalam NaOCl 2% selama 5 menit dan dibilas dengan akuades steril kemudian keringanginkan.

3.5.11 Uji daya hambat asap cair secara *in vivo*

Buah stroberi steril pada tahap sebelumnya kemudian diberi perlakuan asap cair sesuai dengan taraf konsentrasi yang telah ditentukan pada uji *in vivo*. Perlakuan asap cair dilakukan dengan mencelupkan seluruh bagian buah stroberi ke dalam larutan asap cair selama 1 menit/perlakuan, kemudian setelah buah stroberi

kering buah diberi pelukaan menggunakan jarum ose sedalam 2 mm dan lebar 2 mm. Hasil pelukaan kemudian diinokulasi dengan menambahkan konidia jamur sebanyak 10 mikro liter dan kerapatan 10^5 . Kemudian buah yang sudah diinokulasi disimpan dalam wadah bertutup steril pada suhu 25°C dan kelembaban 80%. Pengamatan buah stroberi pada uji *in vivo* dilakukan dari 1, 3, 5, dan 7 hari setelah inokulasi (HSI).

3.6 Parameter pengamatan

3.6.1 Parameter penunjang

a. Karakterisasi kualitas asap cair

Karakterisasi kualitas asap cair cangkang kelapa muda dilakukan dengan tujuan untuk membandingkan kualitas asap cair yang dibuat dengan kualitas asap cair berdasarkan standarisasi Jepang. Karakterisasi asap cair cangkang kelapa muda yang diamati pada penelitian ini yaitu nilai rendemen, densitas, transparansi, total asam tertitrasi, dan warna asap cair. Penentuan nilai rendemen yang diperoleh dihitung dengan rumus yang mengacu pada penelitian oleh Diatmika dkk, (2019):

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{\text{Volume asap cair (ml)}}{\text{Berat bahan baku sebelum diproses (kg)}} \times 100\%$$

Penentuan nilai densitas (bobot jenis) asap cair diperoleh menggunakan rumus yang mengacu pada penelitian Diatmika dkk, (2019) yaitu:

$$\text{Densitas (m/v)} = \frac{W_2 - W_1}{v}$$

Keterangan:

W_1 = Berat piknometer kosong (gr)

W_2 = Berat sampel + piknometer (gr)

V = Volume sampel (ml)

Nilai total asam tertitrasi (TAT) asap cair diperoleh menggunakan rumus yang mengacu pada penelitian Diatmika dkk, (2019) yaitu:

$$\text{Total asam (\%)} = \frac{V \text{ NaOH} \times N \text{ NaOH} \times \text{BM } \text{CH}_3\text{COOH}}{\text{BC} \times 1000} \times 100\%$$

Keterangan:

V NaOH = Volume NaOH (ml)

N NaOH = Normalitas NaOH (N)

BM = Berat Molekul

BC = Bobot sampel (gram)

b. Identifikasi morfologi cendawan *Botrytis cinerea*

Identifikasi cendawan *Botrytis cinerea* dilakukan secara makroskopis dan mikroskopis. Identifikasi secara makroskopis dilakukan dengan melihat miselium cendawan pada media PDA yang telah tumbuh dalam cawan petri. Identifikasi makroskopis tersebut terdiri dari pertumbuhan dan pola sebaran koloni. Sedangkan identifikasi secara mikroskopis dilakukan menggunakan mikroskop elektrik dengan mengambil sebagian kecil miselium cendawan menggunakan jarum ose dan diletakkan pada *object glass* serta ditetesi akuades 1 tetes lalu diamati bentuk konidia di bawah mikroskop.

3.6.2 Parameter utama

a. Uji *in vitro*

1) Diameter koloni cendawan

Pengamatan ukuran diameter koloni cendawan dilakukan dari 3, 5, dan 7 HSI yang diukur menggunakan penggaris. Ukuran diameter koloni cendawan dihitung dengan tujuan untuk melihat pengaruh pemberian asap cair pada media PDA dengan media PDA tanpa pemberian asap cair terhadap pertumbuhan koloni cendawan. Perhitungan diameter koloni cendawan ditentukan berdasarkan rumus berikut mengacu pada penelitian yang dilakukan oleh Zuanif dan Rika, (2019):

$$D = \frac{d_1 + d_2}{2}$$

Keterangan:

D = Ukuran diameter cendawan *Botrytis cinerea* (cm)

d_1 = Ukuran diameter vertikal cendawan *Botrytis cinerea* (cm)

d_2 = Ukuran diameter horizontal cendawan *Botrytis cinerea* (cm)

2) Indeks anti fungi

Kemampuan asap cair dalam menghambat pertumbuhan cendawan *Botrytis cinerea* dihitung dan dinyatakan dalam nilai indeks anti fungi, pengamatan indeks fungi dilakukan untuk mengetahui konsentrasi asap cair minimal dalam menghambat pertumbuhan cendawan. Parameter ini diukur dari 3, 5, dan 7 HSI menggunakan penggaris. Untuk menentukan nilai indeks anti fungi digunakan rumus yang mengacu pada penelitian Zuanif dan Rika, (2009) yaitu:

$$\text{Nilai IA (\%)} = \left(\frac{D_k - D_p}{D_k} \right) \times 100\%$$

Keterangan:

IA : Indeks anti fungi (%)

Dk : Diameter miselium kontrol (cm)

Dp : Diameter miselium perlakuan (cm)

b. Uji *in vivo*

1) Insidensi Penyakit

Persentase kejadian penyakit diketahui melalui tingkat insidensi penyakit yang diamati setelah inokulasi cendawan pada buah stroberi dilakukan. Nilai insidensi dihitung dengan melihat banyaknya buah stroberi yang terinfeksi gejala penyakit busuk kapang kelabu. Persentase insidensi penyakit dihitung dengan persamaan yang mengacu pada penelitian Marhani (2018) yaitu:

$$IP = \frac{X}{Y} \times 100\%$$

Keterangan:

IP = Insidensi penyakit (%)

X = Jumlah buah yang terinfeksi

Y = Jumlah buah yang diamati

Penilaian terhadap tingkat serangan cendawan yang dihitung dengan persentase kejadian penyakit dinilai berdasarkan kriteria yang mengacu pada penelitian Syahrawati dan Busniah, (2009):

Tabel 3. Penilaian persentase insidensi penyakit

Persentase	Klasifikasi Tingkat Serangan
< 10%	Sangat Rendah
10%-50%	Rendah
51%-75%	Sedang
>75%	Tinggi

Sumber: Marhani (2018)

2) Intensitas serangan

Tingkat kerusakan yang terjadi pada buah stroberi dihitung dengan menggunakan rumus intensitas serangan tidak mutlak. Pengamatan dilakukan pada 1, 3, 5, dan 7 HSI dengan menghitung jumlah buah terinfeksi kemudian dikelompokkan berdasarkan nilai skala kerusakan yang terjadi. Nilai intensitas serangan patogen *Botrytis cinerea* pada buah stroberi dihitung dengan rumus yang mengacu pada penelitian Pratiwi dkk, (2022) yaitu:

$$I = \frac{\sum(n \times v)}{Z \times N} \times 100\%$$

Keterangan:

I = Intensitas serangan (%)

n = Jumlah buah yang terinfeksi pada setiap kategori infeksi

v = Besar skala serangan

N = Jumlah buah yang diamati (sampel)

Z = Nilai skala kategori infeksi tertinggi

Nilai skala kerusakan pada buah stroberi untuk setiap kriteria serangan ditentukan berdasarkan nilai yang mengacu pada penelitian Marhani (2018):

Tabel 4. Nilai skala kategori infeksi tertinggi

Kriteria Serangan	Nilai Skala (Z)
0% (Tidak ada kerusakan)	0
≤ 25% (Rusak ringan)	1
> 25%-50% (Rusak sedang)	2
> 50%-75% (Rusak berat)	3
> 75% (Rusak sangat berat)	4

Sumber: Marhani (2018)

3) Daya hambat asap cair

Daya hambat asap cair terhadap cendawan *Botrytis cinerea* dihitung untuk melihat perbandingan infeksi yang terjadi pada kontrol dengan perlakuan. Daya hambat asap cair diamati dari 1, 3, 5, dan 7 HSI dengan mengukur pertambahan diameter luka cendawan pada buah stroberi menggunakan penggaris. Daya hambat asap cair dihitung dengan rumus yang mengacu pada penelitian Hartati *et al*, (2013):

$$PD (\%) = \frac{Dk - Dp}{Dk} \times 100\%$$

Keterangan:

PD = Persentase daya hambat (%)

Dk = Diameter kontrol (cm)

Dp = Diameter perlakuan (cm)