

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Tempat dan waktu penelitian**

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Pertanian Universitas Siliwangi Kota Tasikmalaya, pada bulan Desember 2023 sampai Januari 2024.

#### **3.2 Alat dan bahan penelitian**

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu *disposable petri dish* (cawan petri sekali pakai), haemocytometer, bunsen, tabung reaksi, timbangan digital, gelas ukur, pipet tetes, mikrometer, mikropipet, tabung suntikan, pinset, korek api, *laminar air flow*, mikroskop, autoklaf, rotamixer, labu erlenmeyer, nampan, alat tulis, jarum ose, blender, kaca preparat penggaris, alumunium foil, plastik *cling wrap*, label, alat penyaring, dan kompor.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu buah cabai merah varietas pilar, biakan *Colletotrichum* sp., ekstrak teki, dan babadotan, fungisida berbahan aktif mankozeb, alkohol, aquades, media PDA, antibiotik, dan NaOCL 0,5%.

#### **3.3 Metode penelitian**

Penelitian dilakukan dalam dua tahap yaitu percobaan secara *in vitro* dan percobaan secara *in vivo*, sebagai berikut:

##### **3.3.1. Percobaan *in vitro***

Metode yang digunakan dalam percobaan *in vitro* adalah metode eksperimental dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL), terdiri dari 7 taraf perlakuan yaitu, kontrol negatif, serta perlakuan konsentrasi kombinasi ekstrak teki dan babadotan dalam media PDA. Semua perlakuan diulang sebanyak 4 kali ulangan. Konsentrasi (v/v) yang diaplikasikan yaitu sebagai berikut:

P0 = tanpa aplikasi ekstrak teki dan babadotan (kontrol)

P1= ekstrak teki 100 ml/l + ekstrak babadotan 50ml/l

P2= ekstrak teki 50ml/l + ekstrak babadotan 100ml/l

P3= ekstrak teki 150ml/l + ekstrak babadotan 100ml/l

P4= ekstrak teki 100ml/l + ekstrak babadotan 150ml/l

P5= ekstrak teki 200ml/l + ekstrak babadotan 150ml/l

P6= ekstrak teki 150ml/l + ekstrak babadotan 200ml/l

### 3.3.2. Percobaan *in vivo*

Percobaan *in vivo* merupakan lanjutan dari percobaan *in vitro*. Percobaan ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 7 taraf perlakuan konsentrasi ekstrak kombinasi daun teki dan babadotan terbaik dari hasil *in vitro* yang diulang sebanyak 4 ulangan. Konsentrasi (v/v) yang diaplikasikan yaitu sebagai berikut:

P0 = tanpa aplikasi ekstrak teki dan babadotan (kontrol)

P1= fungisida berbahan aktif mankozeb

P2= ekstrak teki 200ml/l + ekstrak babadotan 150ml/l

P3= ekstrak teki 175ml/l+ ekstrak babadotan 175ml/l

P4= ekstrak teki 150ml/l + ekstrak babadotan 200ml/l

P5= ekstrak teki 250ml/l + ekstrak babadotan 200ml/l

P6= ekstrak teki 200ml/l + ekstrak babadotan 250ml/l

Model linier dari Rancangan Acak Lengkap adalah 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

$\mu$  = Rataan umum

$\tau_i$  = Pengaruh perlakuan ke-i

$\varepsilon_{ij}$  = Pengaruh acak pada perlakuan ke-i ulangan ke-j

Tabel 1. Sidik ragam Rancangan Acak Lengkap

Sumber Keragaman	db	JK	KT	Fhitung	F tabel 5%
Perlakuan (P)	6	$\Sigma P^2 - FK$	$JK_P / db_P$	$KT_P / KT_G$	2,57
Galat (G)	21	$JK_T - JK_P$	$JK_G / db_G$		
Total (T)	27	$\Sigma T^2 / r - FK$			

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 dari hasil uji *in vitro* 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 = *Least Significant Ranges*

$S_x$  = galat baku rata-rata

SSR = *Studentized Significant Ranges*

KT Galat = kuadrat tengah galat

r = jumlah ulangan

Sedangkan jika dari uji F dari hasil uji *in vivo* terdapat perbedaan yang nyata, maka dilakukan uji lanjutan dengan Uji Berbeda Nyata Terkecil pada tingkat kepercayaan 95% dengan rumus berikut:

$$Sd = \sqrt{\frac{2 \text{ KT galat}}{r}}$$

Uji BNT 5% = (t.0.5 db. galat). sd

Keterangan:

Sd = galat baku beda rataaan

KT Galat = kuadrat tengah galat

r = jumlah ulangan

### 3.4 Prosedur penelitian

#### 3.4.1. Sterilisasi alat

Alat yang digunakan dalam uji *in vitro* disterilisasi dengan cara mencuci dengan sabun terlebih dahulu untuk membersihkan dari kontaminan yang menempel pada permukaan alat. Alat kemudian dikeringkan dan dibungkus dengan kertas dan plastik anti panas. Alat dimasukkan ke dalam autoklaf, kemudian disterilisasi pada suhu 121°C selama 20 menit. Peralatan yang tidak bisa diautoklaf disterilisasi dengan alkohol 70% seperti tabung suntikan, dan mikropipet.

#### 3.4.2. Pembuatan ekstrak teki dan babadotan

Pembuatan ekstrak teki dan daun babadotan dibuat dengan metode maserasi. Pertama-tama, bahan teki dan babadotan dibersihkan. Kemudian, bahan diblender hingga menjadi bubuk halus. Bahan dimaserasi dalam etanol 70 % dengan perbandingan 1:1 (v/v) selama 48 jam. Ekstrak diperoleh dengan cara menyaring hasil maserasi dengan empat lapis kain kasa steril (Darmadi dkk, 2022).

#### 3.4.3. Peremajaan isolat *Colletotrichum* sp.

Isolat *Colletotrichum* sp. diperoleh dari cabai yang terkena penyakit antraknosa koleksi Laboratorium Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, Universitas Siliwangi. Isolat koleksi diremajakan dengan cara mengkultur ulang pada cawan petri yang mengandung 10 ml media PDA. Isolat hasil peremajaan digunakan untuk pengujian *in vitro* dan *in vivo*.

#### 3.4.4. Pengujian *in vitro*

Pengujian *in vitro* dilakukan untuk mengetahui daya hambat kombinasi ekstrak teki dan daun babadotan terhadap isolat jamur *Colletotrichum* sp. Pengujian daya hambat menggunakan metode sumur difusi dilakukan menggunakan Rancangan Acak lengkap (RAL) dengan 6 perlakuan yaitu kontrol negatif (P0) dan lima perlakuan kombinasi konsentrasi ekstrak teki dan ekstrak daun babadotan. Sebagai kontrol digunakan aquades steril tanpa penambahan ekstrak (kontrol negatif). Sebanyak 100 $\mu$ L suspensi jamur ke dalam cawan petri steril menggunakan mikropipet, kemudian ditambahkan 10 mL PDA steril yang masih encer dan diputar secara simultan sampai media merata dan dibiarkan memadat. Media PDA dilubangi dengan *cork borer* sebanyak 5 lubang dan diangkat dengan menggunakan jarum ose. Setiap lubang diisi dengan setiap perlakuan masing-masing sebanyak 20 $\mu$ L. Media diinkubasi pada suhu kamar selama 7 hari. Setiap perlakuan dibuat 4 ulangan (Agung dkk, 2022). Menurut Darmadi dkk (2022), pelat diinkubasi dalam kondisi gelap pada suhu kamar dan pembentukan zona hambat di sekitar sumur difusi diamati selama lima hari.

#### 3.4.5. Pengujian *in vivo*

Pengujian *in vivo* mengacu pada penelitian Arie dkk (2015) dan penelitian Ratri (2019) dengan modifikasi, cabai merah yang sehat disterilkan menggunakan alkohol 95% lalu dibilas dengan aquades steril. Buah dilukai dengan menggunakan jarum steril sebanyak 5 tusukan di bagian atas dan bawah buah cabai merah dengan kedalaman 2mm, setelah itu ekstrak tanaman uji diaplikasikan dengan perendaman selama 5 menit sesuai perlakuan pada buah cabai merah. Kemudian buah cabai diinfeksi dengan suspensi *Colletotrichum* sp sebanyak 10 $\mu$ L hasil dari pengenceran larutan induk. Pengenceran dilakukan hingga  $10^{-6}$ . Kerapatan spora dalam suspensi inokulum yang didapat adalah  $3 \times 10^{12}$  konidia/ml yang dihitung dengan haemasitometer. Buah cabai merah yang telah diberi perlakuan diinkubasi selama 7 hari pada kondisi gelap dan terang masing-masing 12 jam, serta pada suhu kamar.

### 3.5. Parameter pengamatan

#### 3.5.1. Parameter penunjang

##### a. Karakteristik ekstrak teki dan daun babadotan

Pengujian karakteristik ekstrak dilakukan untuk mengetahui kualitas ekstrak daun teki dan babadotan yang dihasilkan. Karakteristik yang diuji berupa warna, pH, dan GC-MS. Tahapan pengujian karakteristik ekstrak sebagai berikut:

- 1) Pengujian warna dilakukan secara kualitatif dengan melihat secara visual.
- 2) Pengujian pH dilakukan dengan menggunakan alat indikator pH universal. Ujung indikator yang terdapat beberapa lapis warna dicelupkan pada ekstrak teki dan ekstrak daun babadotan hingga warna pada indikator berubah. Kemudian warna pada indikator dibandingkan dengan baris warna yang terdapat pada kemasan alat untuk mendapatkan data angka pH.
- 3) Analisis komposisi senyawa ekstraknya dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT), Universitas Gajah Mada dengan menggunakan metode *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* (GC-MS). Analisis senyawa GC-MS dilakukan dengan menggunakan GC-QP2010 (Shimadzu) yang dilengkapi dengan kolom kapiler silika fusi Omega Wax TM250 ID (30 m x 0,25 mm, ketebalan film 0,25  $\mu\text{m}$ ). Instrumen diatur ke suhu awal 100°C dan suhu injeksi 270°C dengan laju aliran kolom adalah 1,21 ml/menit. Gas pembawa adalah helium dengan laju aliran satu ml/menit dan kecepatan linier 35 cm/detik. Semua senyawa diidentifikasi dengan perbandingan spektra massa dan data indeks retensi komponen yang diketahui ditemukan dalam literatur dan database spektrum yang disimpan di perpustakaan GC-MS. Data komposisi senyawa yang terdeteksi dengan GC-MS ditampilkan secara deskriptif dengan menggunakan Tabel (Putri dkk, 2022).

##### b. Uji Patogenitas *Colletotrichum* sp.

Prosedur uji patogenitas diadaptasi dari Syukur dkk (2009) dengan modifikasi buah dicuci dengan akuades dan disterilkan permukaannya dengan merendam pada larutan NaOCl 3% selama 60 detik kemudian dibilas dengan akuades steril. Bak plastik disiapkan dan agar terjaga kelembapannya bak dialasi tisu yang dibasahi dengan akuades steril. Setiap spesimen dilukai menggunakan

jarum steril, buah masing-masing diletakkan di dalam bak. Setiap buah diinokulasikan potongan jamur ukuran 0,5 cm x 0,5 cm. Perubahan morfologi diamati pada buah cabai merah pada hari ke-2, 4, 7, dan 9.

### 3.5.2 Parameter utama

#### a. Pengamatan *in vitro*

##### 1) Daya hambat

Pengukuran dilakukan dengan modifikasi sebanyak 2 kali dengan orientasi yang berbeda dan hasilnya dirata-ratakan dilakukan menggunakan aplikasi Image J yang diukur mulai 3 HSI, 5 HSI, dan 7 HSI. Diameter zona hambat spora *Colletotrichum* sp. pada media PDA dihitung dengan bantuan aplikasi Image J (Syabana, Saylendra, dan Ramdhani, 2015).

##### 2) Kerapatan spora

Pengujian dilakukan dengan memasukan 10 mL air steril pada masing-masing unit percobaan hasil uji daya hambat metode koloni pada hari terakhir kemudian, dihomogenkan menggunakan vortex dan dilakukan pengenceran. Isolat jamur diambil sebanyak 1 mL, kemudian diteteskan pada haemocytometer dan diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 40 kali untuk menghitung jumlah kerapatan spora. Menurut Agung (2019), perhitungan persentase daya hambat ekstrak terhadap kerapatan spora dilakukan dengan rumus:

$$\text{Kerapatan spora} = \frac{\text{Kerapatan spora kontrol} - \text{kerapatan spora perlakuan}}{\text{kerapatan spora kontrol}} \times 100\%$$

#### b. Pengamatan *in vivo*

##### 1) Masa inkubasi (hari)

Masa inkubasi merupakan waktu yang diperlukan patogen untuk melakukan infeksi dihitung berdasarkan waktu gejala pertama muncul pada buah cabai setelah inokulasi (Syabana dkk, 2015).

##### 2) Diameter lesi

Pengamatan diameter lesi pada buah dilakukan menggunakan jangka sorong digital 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 (Sari dan Kasiamdari, 2021).

### 3) Intensitas serangan

Cendawan dihitung berdasarkan skor luas bercak, kemudian diidentifikasi berdasarkan kriteria ketahanan tanaman penyakit (Sakerebau dan Soekarno, 2013).

Rumus yang digunakan yaitu:

$$IS = [ \sum(n \times V) / (Z \times N) ] \times 100 \%$$

Keterangan:

IS = Intensitas serangan

n = jumlah buah setiap kelas bercak

V = nilai skor setiap kelas bercak

N = 4 jumlah buah yang diamati

Z = nilai skor kelas luas bercak yang tertinggi.

Nilai kategori serangan sebagai berikut:

0 = tidak ada serangan

1 = < 10% luas permukaan buah yang terserang

2 = >10% - 20% luas permukaan buah yang terserang

3 = >20%-30% luas permukaan buah yang terserang

4 = >40%-50% luas permukaan buah yang terserang

5 = >50% luas permukaan buah yang terserang

### 4) Susut bobot buah cabai

Pengukuran susut bobot dilakukan dengan menimbang buah cabai sebelum dan sesudah pengamatan dengan rumus menurut Syabana dkk (2015):

$$\text{Susut bobot} = [(b1 - b2) / b1] \times 100 \%$$

Keterangan:

b1 = bobot awal

b2 = bobot akhir.