

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan tempat penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juni hingga September 2023 dan bertempat di Laboratorium Fakultas Pertanian Universitas Siliwangi Tasikmalaya.

3.2 Alat dan bahan penelitian

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu pirolisator, *wood moisture meter*, mikroskop, autoklaf, piknometer, erlenmeyer, cawan petri, gelas ukur, bunsen, pipet ukur, pipet makro, pinset, spatula, jarum ose, *aluminium foil*, destilator, *plastic wrap*, kertas cakram, *laminar air flow* (LAF), hemasitometer, timbangan analitik, *hot plate magnetic stirrer*, rak inkubasi, tempat pengeringan, alat gelas, alat tulis dan kamera ponsel.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini antara lain Buah pisang ambon, serbuk gergaji kayu jati, *Potato dextrose agar* (PDA) instan, alkohol 70%, Akuades steril, Larutan NaOCl, *tween-20*, NaOH, Larutan *Phenolphthalein* (PP), FeCl_3 .

3.3 Metode penelitian

3.3.1 Percobaan *in vitro*

Rancangan penelitian yang digunakan pada percobaan *in vitro* yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 5 perlakuan dan 5 ulangan, sehingga terdapat 25 unit percobaan. Adapun perlakuan yang diberikan pada media agar adalah konsentrasi asap cair sebagai berikut:

K_0 = Asap cair 0 % atau tanpa pemberian asap cair

K_1 = Asap cair 1%

k_2 = Asap cair 3%

K_3 = Asap cair 5%

K_4 = Asap cair 7%

Data hasil percobaan dianalisis untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap variabel yang diamati dengan sidik ragam dan kaidah pengambilan keputusan berdasarkan uji F.

Tabel 2. Analisis Sidik Ragam

Sumber Ragam	DB	JK	KT	F hitung	F Tab 5%
Perlakuan	5	$\sum x^2 - FK$	$\frac{JK_P}{db_p}$	$\frac{KT_P}{KT_G}$	2,77
Galat	18	$JK_T - JK_P$	$\frac{JK_G}{db_G}$		
Total	23	$\sum \frac{T^2}{r} - FK$			

Sumber: Gomez and Gomez (2007)

Tabel 3. Kaidah Pengambilan Keputusan

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

Sumber: Gomez and Gomez (2007)

Jika dari uji F terdapat perbedaan yang nyata, maka dilakukan uji lanjut jarak berganda Duncan pada taraf 5 % dengan rumus:

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

Nilai S_x dapat dicari dengan rumus sebagai berikut:

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

Keterangan: LSR = *Least Significant range*, SSR = *Studentized significant ranges*, α = Taraf nyata, dbg = Derajat bebas galat, p = *Range* (Perlakuan), S_x = Galat baku rata-rata (*Standard error*), KT galat = kuadrat tengah galat, r = jumlah ulangan pada nilai tengah perlakuan yang dibandingkan.

3.3.2 Percobaan *in vivo*

Percobaan *in vivo* merupakan kelanjutan dari *in vitro*, yaitu konsentrasi yang dapat menghambat pertumbuhan jamur 100% dijadikan sebagai perlakuan konsentrasi *in vivo*. Konsentrasi yang digunakan diambil berdasarkan hasil uji *in vitro* dengan penghambatan 100% kemudian dikalikan 10 karena pada pengujian *in vivo* kondisi lingkungannya tidak bisa terkendali. Ada dua taraf perlakuan yaitu perlakuan asap cair dan perlakuan kontrol/ tanpa asap cair, masing-masing 20 kali

ulangan sehingga diperoleh 40 unit percobaan. Pengujian *in vivo* dilakukan dengan Uji-t tidak berpasangan yaitu menguji buah pisang ambon dengan perlakuan asap cair dengan buah pisang ambon tanpa asap cair.

Tahap penelitian ini diaplikasikan dalam rancangan percobaan petak berpasangan terhadap dua perlakuan: (i) A: kontrol /tanpa perlakuan asap cair dan (ii) B: dengan perlakuan asap cair. Percobaan tersebut dilakukan 20 kali ulangan.

Tabel 4. Kaidah pengambilan keputusan uji-t tidak berpasangan

Hasil analisis	Hipotesis	Keterangan
$T_{hit} \leq T_{0,05}$	H_0	Tidak ada perbedaan hasil antara buah pisang kontrol dan perlakuan asap cair
$T_{hit} > T_{0,05}$	H_1	Ada perbedaan hasil antara buah pisang kontrol dan perlakuan asap cair

3.4. Prosedur penelitian

3.4.1 Persiapan bahan baku asap cair

Serbuk gergaji kayu jati didapatkan dari pengrajin meubeul di kawasan Cihideung Kota Tasikmalaya dan Cijulang Kabupaten Pangandaran. Adapun serbuk gergaji kayu jati yang digunakan merupakan serbuk kayu jati yang relatif baru dan dalam keadaan kering. Serbuk gergaji kayu jati dikumpulkan menggunakan karung berukuran 25 kg. Setelah terkumpul serbuk gergaji kayu jati kemudian dikeringkan dengan cara dijemur dibawah sinar matahari selama 1 hari untuk menurunkan kadar air.

3.4.2 Pembuatan asap cair

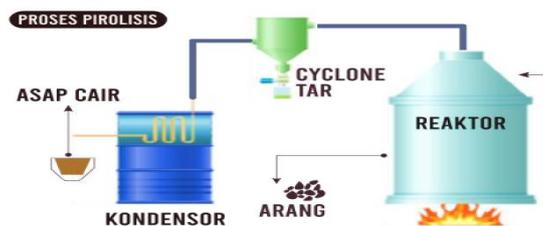
Serbuk Gergaji kayu jati yang telah kering dimasukkan ke dalam tungku pirolisator. Selanjutnya tungku di pasangkan pada rangkaian alat pirolisis dan dilakukan pembakaran hingga suhu maksimal 400 °C. Hasil kondensasi berupa asap cair yang masih mengandung tar dan *bio oil* kemudian ditampung dalam wadah dan diukur volumenya. Asap cair yang diperoleh selanjutnya didistilasi pada suhu 100 °C sampai 110 °C hingga volume yang tersisa sebanyak $\pm 10\%$. Distilat yang dihasilkan kemudian didistilasi kembali dengan suhu dan langkah yang sama



Serbuk Gergaji Kayu Jati



Pengeringan



Gambar 2. Rangkaian pirolisis

sehingga akhirnya diperoleh asap cair *grade 1* yang memiliki sifat: warna bening, rasa sedikit asam, aroma netral.

3.4.3 Uji sifat fisika kimia

Pengujian kualitas asap cair terdiri dari pengujian sifat asap cair secara fisik maupun kimia. Sifat fisik yang diamati adalah rendemen, berat jenis, warna dan transparansi. Pengukuran berat jenis dilakukan dengan menggunakan piknometer. Sedangkan sifat kimia yang diamati meliputi pH, kadar asam, dan kadar fenol.

3.4.4 Sterilisasi peralatan

Setiap alat yang digunakan dibersihkan terlebih dahulu dengan cara dicuci dengan sabun dalam air mengalir, kemudian dikering anginkan. Alat yang telah dibersihkan kemudian dilapisi kertas yang tahan panas lalu dimasukkan ke dalam autoklaf untuk disterilisasi dengan uap panas suhu 121 °C dan bertekanan 15 Psi selama 20 menit. Dan alat yang tidak tahan panas distrsilisasi dengan direndam dalam larutan Alkohol 70%.

3.4.5 Pembuatan stok media kultur

Media kultur yang digunakan adalah media *Potato Dextro Agar*. Media didapatkan dengan melarutkan media PDA dengan 1 liter aquades, kemudian dihomogenkan dan dipanaskan hingga mendidih. Media yang telah homogen dan mendidih kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C dan bertekanan 15 Psi selama 20 menit.

3.4.6 Isolasi, identifikasi dan pemanenan konidia *Colletotrichum musae*

1) Isolasi patogen penyebab antraknosa

Isolasi patogen diperoleh dengan cara mengisolasi dari bagian buah pisang yang terserang penyakit antraknosa. Isolasi dilakukan dengan mengambil kulit buah dengan memotong kulit yang terinfeksi berbentuk kotak berukuran 0,5 sampai 1 cm, setelah dicuci dengan air bersih dan bagian yang diambil disterilkan dengan NaOCl 0,5% 3 menit, kemudian alkohol 70% 2 menit dan aquades 1 menit. Potongan-potongan tersebut dipindahkan pada media PDA yang telah disiapkan dalam cawan petri dan diinkubasi. Setelah 7 hari miselium jamur sudah terlihat tumbuh.

2) Identifikasi patogen

Miselium sudah dapat diidentifikasi pada 7 hari setelah inokulasi, setelah itu dilakukan identifikasi patogen dengan mengacu pada karakteristik cendawan *Colletotrichum musae*. Identifikasi cendawan menggunakan mikroskop dengan mengambil sedikit miselium lalu disimpan pada kaca objek kemudian ditetesi aquades. Pengamatan ini diamati dengan perbesaran 40x. Setelah didapatkan cendawan *C. musae*, isolat dimurnikan dalam media PDA yang lain.

3) Pemanenan konidia *Colletotrichum musae*

Konidia isolat dapat dipanen setelah berumur 7 hari. Pemanenan konidia dilakukan dengan menambahkan aquades steril yang mengandung 0,05% Tween 20, dan disebar secara halus ke dalam cawan petri yang berisi isolat, lalu dikondisikan pada konsentrasi 10^5 konidia/ml. Pengukuran konsentrasi menggunakan alat hemasitometer.

3.4.7 Uji aktivitas antijamur asap cair secara *in vitro*

Pengujian aktivitas anti jamur asap cair terhadap pertumbuhan *Colletotrichum musae* dilakukan pada media PDA mengacu pada penelitian Wang dkk. (2020). Hasil pengamatan dari uji *in vitro* dijadikan penentuan taraf konsentrasi pada uji *in vivo*. Pengujian aktivitas antijamur asap cair dilakukan dengan cara menambahkan asap cair (*grade 1*) ke dalam media PDA sesuai dengan konsentrasi yang telah ditentukan. Konsentrasi yang digunakan dalam pengujian *in vitro* adalah 0%, 1%, 3%, 5% dan 7%.

Pengujian diawali dengan memasukkan asap cair sebanyak 0; 0,1; 0,3; 0,5 dan 0,7 ml ke dalam cawan petri, tambahkan media PDA yang masih cair sampai volume \pm 10 ml/petridis lalu dihomogenkan. Selanjutnya adalah memasukkan 10 μ l *suspense* konidia di bagian tengah media. Lalu media diinkubasi pada suhu 25 °C. Aktivitas pencampuran tersebut dilakukan di dalam *Laminar Air Flow Cabinet*.

Pengamatan dilakukan setiap hari dengan menghitung diameter koloni yang terbentuk. Pengukuran dilakukan dengan menggunakan alat ukur penggaris dengan titik tengah yang sudah ditentukan sebelumnya. Pengamatan dihentikan apabila miselium yang tumbuh sudah memenuhi cawan petri.

3.4.8 Persiapan buah pisang

Buah pisang diperoleh dari petani pisang yang ada sekitar daerah Tasikmalaya dalam kondisi matang yang ditandai dengan kulit buah berwarna hijau/ kuning dan daging buah berwarna putih. Selanjutnya buah pisang disortir terlebih dahulu berdasarkan ukuran dan kondisi fisik permukaan yang baik. Sebelum aplikasi patogen, permukaan buah direndam pada desinfektan NaOCl 2% selama 3 menit, kemudian dibilas menggunakan air mengalir dan dikering anginkan.

3.4.9 Uji aktivitas antijamur asap cair secara *in vivo*

Pengaplikasian asap cair ke buah pisang ambon ditentukan berdasarkan hasil dari uji *in vitro*, dimana konsentrasi yang dapat menghambat pertumbuhan jamur 100% dijadikan sebagai perlakuan konsentrasi kemudian dikali 10. Buah pisang yang telah dipreparasi dioleskan asap cair kemudian dikering anginkan. Lalu setiap buah diberi pelukaan menggunakan jarum steril (Ukuran 3 mm x 3 mm), kemudian larutan konidia jamur diinokulasi dengan konsentrasi 10^5 sebanyak 10 μ l ke area buah yang telah diberi pelukaan kemudian dikering anginkan. Buah yang sudah mendapat perlakuan disimpan dalam box plastik pada suhu 28 °C dengan kelembaban 60% sampai 70%, beserta kain kasa yang telah dibasahi oleh aquades steril untuk menjaga kelembaban. Setiap perlakuan terdiri dari 2 buah pisang ambon dengan dua puluh kali ulangan sehingga dibutuhkan 80 buah pisang ambon.

3.5 Parameter pengamatan

3.5.1 Pengamatan penunjang

Pengamatan penunjang adalah pengamatan yang dilakukan terhadap variabel yang datanya tidak diuji secara statistik untuk menunjang data penelitian. Adapun parameter penunjang antara lain:

a. Karakteristik kualitas asap cair serbuk gergaji kayu jati

Karakteristik asap cair yang diuji meliputi rendemen, warna, pH, transparansi, berat jenis, kadar asam dan kadar fenol. Rendemen asap cair dihitung dengan menggunakan rumus (Jaya dkk., 2019).

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Jumlah asap cair yang dihasilkan}}{\text{jumlah berat bahan baku sebelum diolah}} \times 100\%$$

Bobot jenis dapat dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\text{Bobot Jenis (g/cm}^3\text{)} = \frac{\text{BC} - \text{Bp}}{\text{Volume piknometer}}$$

Keterangan: Bc = Bobot Piknometer + contoh (g); Bp = Bobot piknometer kosong (g).

Nilai total asam tertitrasi dapat dihitung berdasarkan persamaan berikut (Setiawati & Yunianta, 2018):

$$\text{Total asam (\%)} = \frac{\text{Volume NaOH} \times \text{Normalitas NaOH} \times \text{BM Asam Asetat} \times 100\%}{\text{Berat sampel} \times 1000}$$

b. Identifikasi isolat *Colletotrichum musae*

Identifikasi dilakukan untuk memastikan bahwa cendawan yang tumbuh merupakan cendawan yang sesuai. Adapun karakterisasi patogen *C. musae* menurut Zakaria dkk. (2009).

Tabel 4. Karakterisasi patogen *C. musae*

Bagian yang diamati	Karakteristik
Bentuk Konidia	Silinder atau elips
Warna Koloni	Putih
Bentuk hifa	Tidak beraturan

Sumber: Zakaria dkk. (2009)

3.5.2 Pengamatan utama

Pengamatan utama adalah pengamatan yang dilakukan pada setiap variabel yang datanya diuji secara statistik dan bertujuan untuk mengetahui pengaruh dari setiap perlakuan yang diuji coba. Adapun parameter utama meliputi:

a. Daya hambat asap cair secara *in vitro*

Parameter ini dilakukan untuk melihat konsentrasi minimal yang dapat menghambat pertumbuhan miselium cendawan. Diameter pertumbuhan miselium jamur pada media PDA yang diberi perlakuan asap cair dan pada media kontrol diukur menggunakan jangka sorong. Pengujian daya hambat dihitung dengan rumus (Hartati dkk., 2013 dalam Suresh dkk., 2019):

$$DH = \frac{Dk - Dp}{Dk} \times 100\%$$

Keterangan: DH, Daya Hambat (%); Dk, diameter kontrol (Cm); Dp, diameter perlakuan (Cm).

b. Frekuensi Serangan

Pengamatan dilakukan selama 7 hari setelah inokulasi, dihitung sejak 2 hari setelah inokulasi. Dalam menghitung frekuensi serangan penyakit dihitung dengan membandingkan jumlah buah yang terserang dengan jumlah seluruh buah yang diamati menggunakan persamaan berikut (Marhani, 2018):

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

Keterangan: FS, Frekuensi serangan; X, Jumlah buah yang terinfeksi; Y, jumlah buah yang diamati.

Penilaian tingkat serangan berdasarkan persentase tanaman terserang mengacu pada Marhani (2018):

Tabel 5. Penilaian terhadap persentase kejadian penyakit.

Presentase	Klasifikasi tingkat serangan
< 10,00%	Sangat rendah
10,01%-50,00%	Rendah
50,01%-75,00%	Sedang
>75,01%	Tinggi

Sumber: Marhani (2018)

c. Susut Buah

Pengamatan parameter susut buah dilakukan untuk mengetahui kehilangan bobot buah akibat serangan penyakit *C. musae*. Pengamatan dilakukan dengan menimbang buah pisang pada hari ke-1 dan hari ke-7 menggunakan timbangan analitik, setelah itu dihitung selisih berat buahnya.

d. Intensitas serangan

Pengamatan intensitas serangan dilakukan untuk mengetahui tingkatan kerusakan yang terjadi pada buah. Data intensitas serangan dihitung menggunakan rumus intensitas serangan tidak mutlak (Marhani, 2018):

$$\text{Intensitas serangan (\%)} = \frac{\sum(nv)}{NZ} \times 100\%$$

Keterangan:

n : Jumlah buah yang terinfeksi

v : Besar skala serangan

N : Jumlah buah yang diamati

Z : Skala tertinggi dari kategori infeksi

Tabel 6. Nilai skala tingkat serangan

Skala	Persentase	Kriteria
0	0%	Normal
1	$0\% < x \leq 25\%$	Ringan
2	$25\% \leq x \leq 50\%$	Sedang
3	$50\% \leq x \leq 75\%$	Berat
4	$x \geq 75\%$	Sangat Berat