

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan waktu penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan di Laboratorium Agroteknologi Fakultas Pertanian Universitas Siliwangi Tasikmalaya, Laboratorium Pertanian Hama dan Penyakit (LPHP) Wilayah V Cilembang Tasikmalaya, dan Stikes BTH Tasikmalaya, pada bulan Januari hingga Juni 2024.

3.2 Alat dan bahan

Alat yang digunakan pada percobaan ini diantaranya yaitu *laminar air flow*, autoclaf, kompor gas, tabung *erlenmeyer*, gelas beaker, pipet mikro, cawan petri, scalpel, pinset, bunsen, bor gabus, gelas ukur, pisau, jangka sorong, spidol, plastik wrap, karet gelang, panci, timbangan analitik, spatula bahan kimia, pH meter, alumunium foil, gunting, oven, Inkubator, baskom, *hairdryer*, blender, saringan, kertas saring, *rotary evaporator*, dan *haemocytometer*.

Bahan yang digunakan pada percobaan ini diantaranya yaitu, ekstrak akar putri malu, ekstrak daun pepaya, biakan murni cendawan (*Colletotrichum* sp.), media PDA (*Potato Dextrose Agar*), buah cabai, *aquades*, alkohol 96%, spirtus.

3.3 Rancangan percobaan

Percobaan dilakukan dengan metode eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Ekstrak akar putri malu dan ekstrak daun pepaya dicampurkan dengan perbandingan 1:2. Kemudian diuji 5 perlakuan konsentrasinya, setiap perlakuan diulang sebanyak 6 kali. Perlakuan konsentrasi yang dicoba adalah sebagai berikut:

- A = kontrol (tidak beri perlakuan ekstrak)
- B = Campuran ekstrak akar putri malu dan ekstrak daun pepaya konsentrasi 30%
- C = Campuran ekstrak akar putri malu dan ekstrak daun pepaya konsentrasi 40%

D = Campuran ekstrak akar putri malu dan ekstrak daun papaya konsentrasi 50%

E = Campuran ekstrak akar putri malu dan ekstrak daun papaya konsentrasi 70%

Model linier untuk rancangan acak lengkap menurut Gomez dan Gomez (1995) adalah sebagai berikut :

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

Keterangan :

Y_{ij} : Nilai pengamatan pada perlakuan ke-i dalam ulangan ke-j

μ : Nilai tengah umum

τ_i : Pengaruh perlakuan ke-i

ε_{ij} : Galat percobaan perlakuan ke-i ulangan ke-j

Data hasil perhitungan dimasukkan ke dalam daftar sidik ragam atau *analysis of variance* (ANOVA). untuk mengetahui taraf nyata dari uji F, seperti pada tabel di bawah ini:

Table 1. Analisis sidik ragam

Sumber ragam	Db	JK	KT	F hit.	F Tab. 5%
Perlakuan	4	$\Sigma x^2 - FK$	JK_p/db_p	KT_p/KT_g	2, 87
Galat	20	$JK_t - JK_p$	JK_g/db_g		
Total	24	$\Sigma T^2 / r - FK$			

Sumber : (Gomez dan Gomez, 1995)

Table 2. Kaidah pengambilan keputusan

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

Jika hasil uji F terdapat perbedaan yang nyata, maka dilakukan uji lanjut dengan uji berjarak ganda Duncan pada taraf nyata 5% dengan rumus:

$$LSR (\alpha \text{ dbg}, p) = SSR((\alpha \text{ dbg}, p) \times S_x$$

nilai S_x didapat dari rumus berikut:

$$S_x = \sqrt{\frac{KT_G}{r}}$$

Keterangan :

- LSR = *Least Significant Ranges*
- SSR = *Studentized Significant Ranges*
- α = Taraf nyata atau tingkat signifikansi
- dbg = Derajat bebas galat
- p = range (Perlakuan)
- S_x = galat baku rata-rata;
- KT_G = kuadrat tengah galat;
- r = Jumlah ulangan

(sumber: Gomez dan Gomez, 2010)

3.4 Pelaksanaan percobaan

3.4.1 Pembuatan ekstrak akar putri malu

Pembuatan esktak akar putri malu menggunakan metode maserasi. Menyiapkan akar putri malu sebanyak 1,5 kg dipilih lalu disortir dipilih bagian akar yang masih utuh, lalu akar di bersihkan dari tanah yang menempel dan di cuci menggunakan air mengalir sampai bersih. Akar putri malu direndam dalam air yang diberi detergen sebanyak 1,5g selama 24 jam setelah itu dibilas dengan air bersih. Kemudian akar disaring dengan kain saring dan dimasukkan dalam wadah yang bersih yang sudah disterilkan dengan penyemprotan alkohol 70% kemudian ditutup dan biarkan selama 12 jam. Akar putri malu dikeringkan dengan metode *shadow drying* di ruangan dengan penerangan lampu selama 4 hari. Setelah kering akar putri malu dipotong-potong dan akar di oven selama beberapa menit untuk mempercepat proses pengeringan. Selanjutnya akar dihaluskan menggunakan blender, untuk menjaga kondisi blender tetap bersih dan terhindar dari kontaminasi wadah blender di sterilkan dan disemprot terlebih daahulu menggunakan alkohol 70%. Setelah

blender siap dan sudah dibersihkan akar putri malu dihaluskan menggunakan blender sebanyak beberapa kali ulangan hingga menjadi serbuk. Simpan serbuk untuk stok pada toples yang sudah bersih dan disterilkan (Ragil, 2019).

Selanjutnya hasil serbuk akar putri malu yang diperoleh ini dilakukan metode maserasi. Serbuk akar putri malu untuk dilakukan proses penyaringan dengan alat penyaring Hasil serbuk akar di timbang dengan timbangan analitik. Setelah ditimbang serbuk akar dimasukkan pada toples kaca bening yang sudah disterilkan lalu di tambahkan larutan etanol 96%. Perbandingan yang digunakan untuk melarutkan serbuk dengan etanol yaitu 1:10. Selanjutnya dilakukan maserasi selama 3x24 jam, larutan disaring menggunakan kertas saring (Kalrengsang, 2021).

3.4.2 Pembuatan ekstrak daun pepaya

Pembuatan esktrak daun pepaya menggunakan metode maserasi. Menyiapkan daun putri malu sebanyak 3 kg dipilih lalu disortir dipilih bagian daun yang masih utuh, lalu daun di bersihkan menggunakan air mengalir sampai bersih. Daun peaya direndam dalam air yang diberi detergen sebanyak 3g selama 24 jam setelah itu dibilas dengan air bersih. Kemudian daun disaring dengan kain saring dan dimasukkan dalam wadah yang bersih yang sudah disterilkan dengan penyemprotan alkohol 70% kemudian ditutup dan biarkan selama 12 jam. Daun pepaya dikeringkan di ruangan dengan penerangan lampu selama 2 hari. Setelah kering daun dipotong-potong dan daun dimasukan untuk di oven selama beberapa menit untuk mempercepat proses pengeringan. Selanjutnya daun dihaluskan menggunakan blender, untuk menjaga kondisi blender tetap bersih dan terhindar dari kontaminasi wadah blender di sterilkan dan disemprot terlebih daahulu menggunakan alkohol 70%. Setelah blender siap dan sudah dibersihkan daun dihaluskan menggunakan blender sebanyak beberapa kali ulangan hingga menjadi serbuk (Ariani, 2016).

Selanjutnya hasil serbuk daun pepaya yang diperoleh ini dilakukan metode maserasi. Hasil serbuk daun di timbang dengan timbangan analitik. Setelah ditimbang serbuk daun dimasukan pada toples kaca bening yang sudah disterilkan lalu di tambahkan larutan etanol 96% dengan perbandingan 1:10. Dilakukan maserasi selama 3x24 jam (Rahayu, 2019).

3.4.3 Pembuatan ekstrak campuran

Pembuatan esktak campuran daun pepaya dan ekstrak akar putri malu dicampur dan diukur menggunakan gelas ukur kemudian dilarutkan menggunakan metode evaporasi meggunakan alat *rotary evaporator* dengan suhu 50°C dan kecepatan 60 rpm (Lakshmibai et al., 2016). Perbandingan campuran yang di gunakan yaitu 1:2, dengan ketentuan :

Tabel 3. Maserasi pencampuran ekstrak akar putri malu dan daun pepaya dengan perbandingn larutan ekstrak 1:2

Ekstrak Akar Putri Malu	Maserasi ekstrak akar putri malu	Ekstrak Daun Pepaya	Maserasi ekstrak daun pepaya	Perbandingan	Total Campuran Ekstrak akar putri malu dan daun pepaya
700ml	70gr serbuk ekstrak akar + 700ml etanol	1,4liter	140gr serbuk ekstrak akar +1,4liter etanol	1:2	2,1 liter

Metode Shu-thong et al. (2001) Larutan ekstrak campuran pengocokan selama 24 jam pada suhu 30⁰C menggunakan shaker. Tujuannya supaya larutan ekstrak menjadi homogen. (Kalrengsang, 2021).

Selanjutnya larutan ekstrak campuran tiap sampel di ambil sesuai ketentuan yang ada di tabel menggunakan gelas ukur. Mengacu pada penelitian Anggraini, Hamidah dan Moehammadi (2013), pengenceran dengan aquadest dengan menggunakan rumus (Agba, 2018):

$$N1 . V1 = N2 . V2$$

Tabel 4. Pengenceran ekstrak campuran akar putri malu dan daun pepaya untuk pembuatan konsentrasi ekstrak tiap perlakuan

Ekstrak campuran	Pengenceran	Konsentrasi (%)
30ml	30ml ekstrak campuran + 70ml aquadest	30%
40ml	40ml ekstrak campuran + 60ml aquadest	40%
50ml	50ml ekstrak campuran + 60ml aquadest	50%
70ml	70ml ekstrak campuran + 30ml aquadest	70%

3.4.4 Sterilisasi alat

Sterilisasi adalah suatu proses yang menghancurkan semua bentuk kehidupan mikroba, termasuk spora, pada permukaan benda mati. Prosesnya dapat berupa pemanasan, pemberian zat kimia, radiasi, atau filtrasi (Auliyah, 2020).

Sebelum dilakukan sterilisasi, peralatan yang digunakan untuk pengujian terlebih dahulu, dilakukan pencucian dan pengeringan. Sebagai tahap awal dalam melakukan sterilisasi secara umum, dengan cara dibersihkan melalui pencucian dengan air yang mengalir selanjutnya dikeringkan. Penutupan peralatan yang memiliki mulut meliputi tabung reaksi, gelas ukur, erlenmeyer dan pipet ukur. Penutupan alat-alat tersebut dilakukan agar tidak ada air yang memasuki peralatan tersebut. Selanjutnya untuk alat yang permukaannya harus steril, alat tersebut dapat ditutup dengan aluminium foil satu-persatu, dan pada cawan petri yaitu dibungkus seluruhnya dengan kertas bekas yang bersih (bukan kertas koran). Lalu, untuk alat-alat gelas yang berupa alat ukur (harus presisi) maupun bukan, disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama selang waktu 15menit sampai 20 menit (Murtius, 2018).

Sementara itu, alat yang tidak dapat disterilisasi dengan suhu panas cukup disterilisasi menggunakan alkohol 70% dan dihangatkan pada api bunsen. Fungsi sterilisasi adalah menghilangkan kontaminasi baik dari alat maupun bahan yang digunakan. Menurut Septimus (2019), Sterilisasi dapat dilakukan secara kimiawi dengan menggunakan alkohol 70% yang bersifat antimikroba dengan mendenaturasi protein (Nida, 2021).

3.4.5 Pembuatan media potato dextrose agar (PDA)

Media yang akan digunakan untuk membiakan dan meremajakan isolat cendawan *Celletotrichum* sp. adalah media *potato dextrose agar* (Azzahra et al., 2020).

Pembuatan media PDA dengan cara serbuk PDA instan ditimbang sebanyak 36,5 g atau 40 g dengan timbangan kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan dilarutkan dengan 1 liter aquades. Media dipanaskan hingga mendidih dan homogen, diaduk menggunakan *stirrer*. Media *potato dextrose agar* yang sudah

mendidih kemudian disterilisasi dengan autoklaf suhu 121 °C selama 15 menit (Yastanto, 2019).

Larutan media di dalam *laminar air flow* kemudian dituangkan ke dalam cawan petri dan dibiarkan hingga memadat, bagian luar dipanaskan dengan api bunsen hingga hangat, bagian samping cawan petri ditutup dengan plastik wrap (Azzahra et al., 2020).

3.4.6 Prosedur isolasi cendawan *Colletotrichum* sp.

Proses isolasi menurut Lestari dan Hartati (2017) digunakan untuk memperoleh mikroba murni dari lingkungan sedangkan inokulasi digunakan untuk memperoleh mikroba murni dan media biakan mikroba itu sendiri. (Badaring, 2020).

Isolasi cendawan dilakukan secara *in vitro*, dengan tahapan yaitu siapkan alat yang sudah di sterilisasi, dan *laminar air flow* (LAF) yang sudah selsai di uv dan siap digunakan. Menyiapkan bahan cabai yang terserang gejala penyakit dan media *Potato Dextrose Agar* PDA yang sudah siap pakai di cawan petri. Potong bagian yang terinfeksi dengan ukuran sekitar 0,5 x 0,5cm. Direndam ke dalam natrium hipoklorit 2,5 % selama 2,5 menit untuk mengurangi kontaminasi organisme lain. Potongan buah cabai tersebut dibilas dengan air bersih atau steril, selanjutnya dikeringkan dengan menggunakan tissue, lalu menempatkan bagian cabai yang sudah dipotong tersebut pada permukaan media *Potato Dextrose Agar* (PDA) menggunakan jarum ose. Cawan petri yang sudah di isolasi cendawan diinkubasi selama \pm 7 hari pada ruang bersuhu 27 °C sampai 28°C (Syabana et al., 2015).

3.4.7 Prosedur inokulasi cendawan *Colletotrichum* sp.

Selanjutnya proses Inokulasi dilakukan karena sering terjadi kontaminasi pada isolat patogen. Peremajaan cendawan dilakukan dengan cara memindahkan sedikit media yang telah ditanami kultur murni patogen ke dalam media PDA baru yang terbebas kontaminan. Biakan murni cendawan patogen diremajakan berulang kali dan diinkubasi selama 5 hari sampai 7 hari pada suhu ruang. Isolat patogen

yang telah tumbuh pada media, diamati ciri-ciri makroskopis dan mikroskopinya (Utami, 2017).

3.4.8 Identifikasi cendawan *Colletotrichum* sp.

Identifikasi cendawan dilakukan secara makroskopis dan mikroskopis. Pengamatan makroskopis didapatkan dengan membuat kultur murni di dalam media *Potato Dextrose Agar* (PDA) lalu diamati dan diidentifikasi sesuai karakteristik cendawan *Colletotrichum* sp. Sedangkan untuk pengamatan mikroskopis preparat disiapkan dengan cara mengambil hifa fungi seujung ose kemudian diletakkan pada kaca objek yang sebelumnya telah ditetesi dengan gliserol, kemudian tumpukan hifa dipisahkan dengan menggunakan jarum ose dan ditetesi dengan biru trifan, selanjutnya ditutupi dengan kaca penutup. Cendawan diamati di bawah mikroskop cahaya dipotret dengan menggunakan kamera digital (Sari, 2021).

3.4.9 Uji Daya Hambat Secara *In Vitro*

Hasil dari ekstraksi campuran daun pepaya dan akar putri malu dapat diuji antagonis secara *in vitro*. Uji aktivitas daya hambat cendawan ini dilakukan di dalam *laminar air flow* agar tetap dalam steril, selanjutnya menuangkan masing-masing sebanyak 9 ml media *potato dextrose agar* (PDA) ke dalam cawan petri. Ekstrak daun pepaya dan akar putri malu ditambahkan ke dalam cawan petri dengan konsentrasi 0% (untuk kontrol), ekstrak campuran daun pepaya dan akar putri malu konsentrasi 30 %, 40 %, 50 %, dan 70 % sebelum media memadat. Cawan petri digoyangkan agar media dan ekstrak daun pepaya dan akar putri malu tercampur. Setelah media memadat selanjutnya diberi tanda tepat ditengah untuk peletakan Patogen *Collectriticum* sp. Metode pengambilan patogen dilakukan dengan menggunakan *cork borer* berdiameter 5 mm dan dipindahkan menggunakan ose. Media diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 5 hari dan diamati setelah melewati 24 jam masa inkubasi.

3.5 Parameter pengamatan

3.5.1 Pengamatan penunjang

Pengamatan penunjang adalah pengamatan yang dilakukan untuk menunjang pengamatan utama. Pengamatan penunjang yaitu

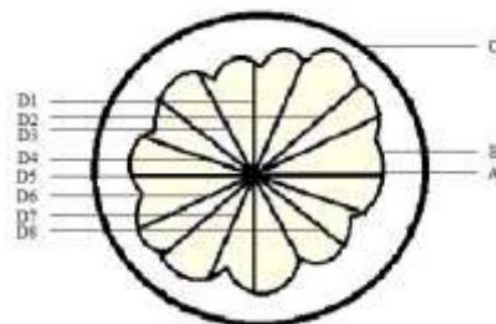
1. Pengamatan makroskopis dan mikroskopis cendawan *Colletotrichum* sp.
2. Suhu dan kelembaban ruangan

3.5.2 Pengamatan Utama

Pengamatan utama adalah pengamatan yang datanya diuji secara statistik. Pengamatan utama yang akan dilakukan meliputi :

1. Diameter *Colletotrichum* sp.

Inokulasi jamur dilakukan secara aseptis dengan metode tanam langsung. Koloni jamur dengan diameter ± 1 cm ditempatkan di permukaan cawan petri pada masing-masing perlakuan. Media yang telah diinokulasi jamur kemudian diinkubasi pada suhu 27°C selama 5 hari. Nilai diameter koloni ditentukan dengan menghitung rerata diameter pengukuran. Nilai diameter koloni dihitung dengan rumus sebagai berikut:



. Pengukuran Diameter Koloni Jamur

Gambar8. Pengukuran diameter koloni jamur (Cahyani,2020)

Keterangan:

- A : Koloni jamur awal (cm)
 B : Koloni jamur setelah inkubasi (cm)
 C : Cawan petri
 D1-D8 : Diameter pengukuran (cm)

Pengamatan dilakukan setiap hari selama 7 hari terhadap pertumbuhan jamur dengan mengukur diameter koloni jamur. Pengukuran diameter koloni pada

masing-masing cawan petri dilakukan dengan mengukur 8 diameter koloni jamur seperti pada gambar 8. pengukuran dilakukan dengan menggunakan penggaris. Nilai diameter koloni ditentukan dengan menghitung rerata diameter pengukuran.

$$\text{Rata}^2 \text{ Diameter (cm)} = \frac{D1+ D2+D3+D4+D5+D6+D7+D8}{8}$$

2. Daya hambat ekstrak daun pepaya dan akar putri malu

Uji daya hambat dilakukan dengan metode sumuran yaitu lempeng agar yang telah diinokulasikan dengan cendawan uji dibuat suatu lubang yang selanjutnya diisi dengan zat anti mikroba uji. Kemudian setiap lubang itu diisi dengan zat uji. Setelah diinkubasi pada suhu dan waktu yang sesuai dengan mikroba uji, dilakukan pengamatan dengan melihat ada atau tidaknya zona hambatan.

3. Pengamatan mikroskopis cendawan setelah uji daya hambat

Pengamatan ini dilakukan untuk melihat pertumbuhan setelah perlakuan dengan menggunakan masing-masing konsentrasi. Uji mikroskopis bertujuan untuk mengamati fragmen pengenal yang merupakan komponen spesifik untuk mengidentifikasi cendawan tersebut (Partiwisari, 2015).

4. Presentase aktivitas penghambatan cendawan

Persentase aktivitas penghambatan pertumbuhan jamur oleh ekstrak metanol umbi dihitung menggunakan rumus (Mori et al., 1997 dalam Kartika et al., 2003) sebagai berikut:

$$P = \frac{Dk - Dr}{Dk - A} \times 100\%$$

Keterangan:

- P : Persentase penghambatan pertumbuhan jamur
- Dk : Diameter koloni jamur yang tumbuh pada perlakuan kontrol negatif (cm)
- Dr : Diameter koloni jamur yang tumbuh pada perlakuan ekstrak
- A : Koloni jamur awal (cm)

Tabel 5. Kategori aktivitas penghambatan cendawan setelah uji daya hambat dengan ekstrak campuran akar putri malu dan daun pepaya

No.	Aktivitas Penghambatan	Tingkat Aktivitas
1.	$P > 75\%$	Sangat kuat
2.	$50\% < P \leq 75\%$	Kuat
3.	$25\% < P \leq 50\%$	Sedang
4.	$0\% < P \leq 25$	Lemah
5.	0	Tidak aktif

Keterangan: P (persentase aktivitas antijamur)