

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

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

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium Mikrobiologi Fakultas Pertanian Universitas Siliwangi. Pada bulan Desember 2023 sampai dengan Januari 2024.

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

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah cawan petri, gelas ukur, tabung reaksi, *erlenmeyer*, pipet mikro, bor gabus, botol kaca ukuran 1L, timbangan analitik, jangka sorong, jarum steril, jarum ose, hemositometer, bunsen, LAF (*Laminar Air Flow*), autoklaf, *hot plate*, bunsen, rak inkubasi, blender, kertas saring, baskom, nampan, spatula, wadah plastik, *sprayer*, mikroskop, kaca preparat, kaca penutup, alat tulis, dan kamera *handphone*.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun sirih hijau, isolat *Colletotrichum musae*, buah pisang matang, Media PDA instan, fungisida Iprodion, detergen, spirtus, plastik *wrapping*, *aluminium foil*, tisu, aquades, karet gelang, kapas, kain kasa, alkohol 70%, suntikan dan *masker*.

#### **3.3 Metode penelitian**

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

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

Metode yang digunakan dalam percobaan ini adalah metode eksperimental dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL), terdiri dari 6 perlakuan yaitu, kontrol negatif dan perlakuan beberapa konsentrasi ekstrak daun sirih dalam media PDA. Taraf perlakuan dalam percobaan ini yaitu sebagai berikut :

A = tanpa ekstrak daun sirih (kontrol)

B = ekstrak daun sirih 10 %

C = ekstrak daun sirih 20 %

D = ekstrak daun sirih 30 %

E = ekstrak daun sirih 40 %

F = ekstrak daun sirih 50 %

Untuk percobaan *in vitro*, setiap perlakuan di replikasi sebanyak 4 kali sehingga terdapat 24 unit percobaan. Setiap unit percobaan terdiri dari 2 cawan petri, sehingga total cawan petri yaitu 48 buah.

Model linear dari rancangan acak lengkap (RAL) tersebut adalah sebagai berikut:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \epsilon_{ij}$$

Keterangan:

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

$\mu$  = nilai tengah umum (rata-rata respon)

$T_i$  = pengaruh perlakuan ke-i

$\epsilon_{ij}$  = pengaruh galat percobaan dari perlakuan ke-I dan ulangan ke-j

Data hasil pengamatan *in vitro* dianalisis dengan menggunakan sidik ragam (ANOVA) seperti pada Tabel 4 dan kaidah pengambilan keputusan pada Tabel 5.

Tabel 4. Analisis Ragam *in vitro*

Sumber ragam	Db	JK	KT	F hit.	F Tab. 5%
Perlakuan	5	$\Sigma x^2 - FK$	JKP/6	KTP/KTG	2,77
Galat	18	JKT-JKP	JKG/18		
Total	23	$\Sigma T^2/r - FK$			

Tabel 5. Kaidah pengambilan keputusan

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

Jika dari uji F terdapat perbedaan yang nyata, maka dilanjutkan dengan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) ada taraf nyata 5% dengan rumus:

$$BNT = t_{5\%; dbg} \times \sqrt{\frac{2 (KT Galat)}{r}}$$

Keterangan:

BNT = Beda Nyata Terkecil

$t_{5\%}$  = tabel uji T pada taraf nyata 5%

KT Galat = Kuadrat tengah galat

r = Jumlah ulangan

### 3.3.2 Percobaan *in vivo*

Percobaan ini merupakan lanjutan dari percobaan *in vitro*, dengan metode eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL), dengan 5 taraf perlakuan yaitu, kontrol negatif (tanpa pemberian ekstrak daun sirih), kontrol positif (pemberian fungisida Iprodion) dan 3 perlakuan konsentrasi ekstrak daun sirih yang paling efektif dan efisien yang diperoleh dari hasil penelitian *in vitro*. Perlakuan uji *in vivo* yaitu sebagai berikut

A = tanpa ekstrak daun sirih (kontrol)

B = ekstrak daun sirih 10 %

C = ekstrak daun sirih 20 %

D = ekstrak daun sirih 30 %

E = Fungisida berbahan aktif Iprodion konsentrasi 2 g/L

Setiap perlakuan diulang sebanyak 4 kali sehingga terdapat 20 unit percobaan. Setiap unit percobaan terdiri dari 5 buah pisang, sehingga total buah pisang yang menjadi objek penelitian sebanyak 100 buah.

Model linear dari rancangan acak lengkap (RAL) tersebut adalah sebagai berikut:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \epsilon_{ij}$$

Keterangan:

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

$\mu$  = nilai tengah umum (rata-rata respon)

$T_i$  = pengaruh perlakuan ke-i

$\epsilon_{ij}$  = pengaruh galat percobaan dari perlakuan ke-I dan ulangan ke-j

Data hasil pengamatan *in vivo* dianalisis dengan menggunakan sidik ragam (ANOVA) seperti pada Tabel 6.

Tabel 6. Analisis Ragam *in vivo*

Sumber ragam	Db	JK	KT	F hit.	F Tab. 5%
Perlakuan	4	$\Sigma x^2 - FK$	JKP/6	KTP/KTG	3,06
Galat	15	JKT-JKP	JKG/15		
Total	19	$\Sigma T^2 / r - FK$			

Tabel 7. Kaidah pengambilan keputusan

Hasil analisa	Kesimpulan analisa	Keterangan
F hit $\leq$ F 0,05	Berbeda tidak nyata	Tidak ada pengaruh
F hit $>$ F 0,05	Berbeda nyata	Ada pengaruh

Jika dari uji F terdapat perbedaan yang nyata, maka dilanjutkan dengan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) ada taraf nyata 5% dengan rumus:

$$\text{BNT} = t_{5\% ; dbg} \times \sqrt{\frac{2 (\text{KT Galat})}{r}}$$

Keterangan:

- BNT = Beda Nyata Terkecil
- t 5% = tabel uji T pada taraf nyata 5%
- KT Galat = Kuadrat tengah galat
- r = Jumlah ulangan

### 3.4 Prosedur penelitian

#### 3.4.1. Sterilisasi alat

Alat yang digunakan dicuci dengan sabun pada air mengalir, kemudian dikeringkan. Selanjutnya alat yang tahan panas dibungkus kertas dan dimasukkan ke dalam autoklaf untuk disterilisasi dengan suhu 121°C selama 20 menit. Untuk alat yang tidak tahan panas sterilisasi menggunakan alkohol 70%.

#### 3.4.2 Peremajaan isolat *Colletotrichum musae*

Isolat *C. musae* diperoleh dari laboratorium *Seed of Plant* Kab. Lumajang, Jawa Timur. Isolat cendawan diremajakan dengan cara mengkultur ulang pada cawan petri yang mengandung 10 ml media PDA. Isolat hasil peremajaan yang berumur 5-7 hari setelah inokulasi (HSI) digunakan untuk pengujian *in vitro* dan *in vivo*.

#### 3.4.3 Pembuatan ekstrak daun sirih

Menurut Yuniarti (2016), daun sirih hijau yang digunakan merupakan daun sirih hijau yang masih muda dan segar, daun terletak berada di dekat bagian atas batang sirih. Bentuk daun masih utuh, berwarna belum hijau tua dan kecokelatan, tidak malformasi, tidak termakan oleh serangga dan tidak terserang penyakit. Daun

sirih hijau di petik pada bagian pangkal daun, kemudian dikemas dengan menggunakan plastik.

Fungisida nabati ekstrak daun sirih di buat dengan cara daun sirih dibersihkan menggunakan air bersih dan di semprot alkohol 70%. Setelah itu dikeringkan di bawah sinar matahari sampai kering, Kemudian diblender hingga menjadi bubuk halus. Serbuk daun sirih tersebut di homogenkan dengan aquades steril dengan perbandingan 1:5 (g/v) menggunakan blender dan di inkubasi selama 48 jam. Ekstrak diperoleh dengan cara menyaring hasil ekstraksi dengan menggunakan kertas saring dan kain kasa steril (Friska, 2008).

#### **3.4.4 Pengujian ekstrak daun sirih secara *in vitro***

Uji daya hambat ekstrak daun sirih terhadap perkembangan *Colletotrichum musae* dilakukan pada media PDA. Media dalam kondisi hangat kuku dituangkan ke dalam cawan petri sebanyak dan dicampur dengan ekstrak daun sirih sesuai dengan konsentrasinya, kemudian dihomogenkan. Setelah media memadat kemudian bagian tengah media dilubangi menggunakan bor gabus, bagian lubang tersebut di letakan inokulum patogen menggunakan jarum ose. Setelah itu inkubasi pada suhu kamar selama 7 hari.

#### **3.4.5 Pengujian ekstrak daun sirih secara *in vivo***

Uji efektifitas ekstrak daun sirih dalam mengendalikan penyakit antraknosa yang disebabkan oleh cendawan *C. musae* pada buah pisang susu secara *in vivo* dilakukan dengan cara sebagai berikut : Buah pisang yang digunakan sebagai bahan memiliki umur yang sama (dalam satu tandan), sehat (bebas serangan patogen), berukuran relatif seragam, dan tidak pernah disemprot pestisida kimia.

Buah-buah pisang susu yang terpilih untuk bahan percobaan kemudian dicuci pakai air mengalir dan pakai sabun, selanjutnya dikering anginkan. Kemudian buah pisang dilukai dengan jarum steril sebanyak 3 lubang. Setelah itu, buah pisang direndam selama 5 menit dalam larutan ekstrak daun sirih dengan konsentasi sesuai perlakuan yang dicoba yaitu 10 %, 20 %, 30 %, dan larutan fungisida Iprodion konsentrasi 2 g/L air, kemudian untuk perlakuan kontrol (tanpa pemberian ekstrak daun sirih) buah pisang direndam dalam aquades, lalu dikering anginkan. Setelah itu diinokulasi cendawan sebanyak 10  $\mu$ L dengan kepadatan

konidia  $10^5$ /ml pada bagian yang dilukai. Setelah itu buah pisang diinkubasi pada suhu kamar selama 7 hari dan dijaga kelembabannya kemudian diamati setiap hari.

### 3.5 Parameter pengamatan

#### 3.5.1 Parameter pengamatan penunjang

Parameter penunjang adalah merupakan faktor-faktor eksternal yang dapat mempengaruhi penelitian. Parameter penunjang terdiri dari data yang tidak dianalisis secara statistik yaitu suhu dan kelembaban ruangan tempat percobaan serta identifikasi secara morfologi isolat patogen. Patogen diisolasi langsung dari buah pisang maka perlu dilakukan identifikasi untuk membuktikan bahwa patogen yang tumbuh di media merupakan patogen yang sesuai. Berikut karakterisasi patogen *C. musae*

Tabel 8. Karakteristik morfologi *C. musae*

Bagian yang diamati	Karakteristik	
	Bele, Kouame dan Atta (2018)	Rani, Unnithan dan Thammaiah (2017)
Bentuk Konidia	Silinder dengan ujung membulat	Ellips, silinder dan tidak bersekat
Warna Koloni	Putih	Putih hingga merah muda
Warna Konidia	Transparan/ bening	Transparan/bening

#### 3.5.2 Parameter pengamatan utama

##### a. Parameter pengamatan utama pada uji *in vitro*

###### 1) Diameter koloni *C. musae*

Perhitungan diameter koloni dilakukan dengan rumus sebagai berikut:

$$D = \frac{D1 + D2}{2}$$

Keterangan:

D : Diameter koloni *C. musae* (mm);

D1, D2 : Panjang koloni *C. musae* (mm) hasil pengukuran dari dua arah yang berbeda.

###### 2) Daya hambat anti jamur ekstrak daun sirih

Pengamatan ini dilakukan untuk melihat konsentrasi paling efektif dalam menghambat *C. musae* dengan menggunakan penggaris untuk mengukur diameter

pertumbuhan miselium. Pengamatan dilakukan selama 7 hari dimulai dari hari ke-1 setelah inokulasi. Indeks antijamur diperoleh dari persamaan berikut (Hartati, 2013 dan Suresh dkk, 2019):

$$DH (\%) = \frac{\text{Diameter kontrol} - \text{diameter perlakuan}}{\text{Diameter Kontrol}} \times 100\%$$

Keterangan:

DH: Daya hambat (%)

#### b. Parameter pengamatan utama pada uji *in vivo*

##### 1) Masa Inkubasi

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

##### 2) Frekuensi serangan

Pengamatan dilakukan selama 7 hari setelah inokulasi, dihitung sejak 1 hari setelah inokulasi. Dengan membandingkan jumlah buah yang terserang dengan seluruh buah yang diamati dengan menggunakan persamaan berikut (Marhani, 2018).

$$FS = \frac{n}{N} \times 100\%$$

Keterangan:

FS = Frekuensi serangan;

n = Jumlah buah terinfeksi;

N = Jumlah buah diamati.

Penilaian frekuensi serangan berdasarkan persentase sampel terserang mengacu pada Marhani (2018):

Tabel 9. 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)

### 3) Intensitas Serangan

Untuk mengetahui kerusakan pada buah atau biasa disebut dengan intensitas serangan yang terjadi pada buah dihitung dengan menggunakan rumus intensitas serangan tidak mutlak (Marhani, 2018). Rumus ini digunakan karena pengamatan hanya terfokus pada buah saja. Dihitung sejak 1 hari setelah inokulasi sampai 7 hari setelah inokulasi.

$$I = \frac{\sum (nv)}{NZ} \times 100\%$$

Keterangan:

I = Intensitas serangan

n = Jumlah buah yang terinfeksi

v = Besar skala serangan

Z = Skala tertinggi dari kategori terinfeksi

N = Banyaknya buah yang diamati

Nilai skala penilaian intensitas serangan berdasarkan tanaman yang terinfeksi, seperti pada Tabel 10.

Tabel 10. Nilai skala untuk tiap kategori serangan

Nilai Skala (Z)	Kategori Serangan
0	Bebas serangan
1	$0 < x < \frac{1}{4}$ bagian terserang
2	$\frac{1}{4} < x < \frac{1}{2}$ bagian terserang
3	$\frac{1}{2} < x < \frac{3}{4}$ bagian terserang
4	$> \frac{3}{4}$ bagian terserang

Sumber: Marhani (2018)

Berdasarkan ketentuan BIMAS, tinggi rendahnya intensitas serangan dapat digolongkan sebagaimana dapat dilihat pada Tabel 11.

Tabel 11. Kategori Intensitas serangan

% serangan	Kategori serangan
< 15%	Ringan
> 15% - 25%	Sedang
> 25% - 50%	Berat
> 50% - 75%	Berat sekali
> 75%	Puso

Sumber : Marhani (2018)

#### 4) Daya hambat perkembangan penyakit

Pengamatan ini dilakukan selama 7 hari setelah inokulasi patogen ke dalam buah pisang untuk melihat perbandingan serangan penyakit pada buah pisang yang sudah diberi perlakuan dengan kontrol, dengan mengukur pertambahan diameter luka menggunakan jangka sorong. Untuk penghambatan penyakit dapat dihitung dengan rumus (Hartati, 2013 dan Suresh *et al.*, 2019):

$$PP (\%) = \frac{\text{Diameter kontrol} - \text{diameter perlakuan}}{\text{Diameter Kontrol}} \times 100\%$$

Keterangan:

PP = Penghambat Penyakit (%)

#### 5) Susut Bobot

Pengukuran susut berat dilakukan pada saat buah pisang sebelum disimpan dan pada hari terakhir pengamatan. Pengukuran susut berat dapat menggunakan rumus berikut (Hayati, 2021):

$$\text{Susut bobot \%} = \frac{b1 - b2}{b1} \times 100\%$$

Keterangan:

b1: bobot awal

b2: bobot akhir