

BAB III. METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan tempat penelitian

Pengujian *in vitro* dilaksanakan pada bulan April sampai dengan Juli 2024 dan bertempat di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Pertanian Universitas Siliwangi. Adapun pengujian *in vivo* dilaksanakan pada bulan Juli sampai dengan Agustus 2024, bertempat di Kp. Talun, Desa Tanjungjaya, Kecamatan Tanjungjaya, Kabupaten Tasikmalaya.

3.2. Alat dan bahan

3.2.1. Alat

Alat yang digunakan dalam pengujian *in vitro* diantaranya cawan petri, *erlenmeyer*, gelas ukur, *beaker glass*, *cork borer*, spatula, tabung reaksi, *laminar air flow*, autoklaf, neraca analitik, *hot plate*, jarum ose, spuit, evaporator, pH meter, dan jangka sorong.

Adapun alat yang digunakan dalam pengujian *in vivo* diantaranya polybag ukuran 10 cm x 10 cm, *sprayer*, spuit, cawan petri steril, tabung reaksi, *haemocytometer*, panci, kompor gas, plastik tahan panas, jarum ose, penggaris, dan mikroskop.

3.2.2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam pengujian *in vitro* adalah daun jarak cina (*Jatropha multifida* L.), aquadest, etanol 96%, media *potato dextrose agar* (PDA), etanol 70%, kertas saring, *plastic wrap*, dan *aluminium foil*.

Adapun bahan yang digunakan dalam pengujian *in vivo* yaitu ekstrak daun jarak cina (*Jatropha multifida* L.), aquadest, *paper towel*/tisu dapur, tanah, pupuk kompos, benih cabai merah varietas Tanjung-2, dan air.

3.3. Metode penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen. Pada pengujian secara *in vitro* digunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) Non Faktorial dengan 7 perlakuan dan 3 ulangan, sehingga didapatkan 21 unit percobaan. Data yang diperoleh dianalisis dengan analisis ragam (ANOVA).

Penentuan ulangan dengan menggunakan rumus:

$$t(r-1) \geq 15$$

Keterangan:

t = perlakuan dalam penelitian

r = ulangan dalam penelitian

Perlakuan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari:

A = kontrol (tanpa ekstrak daun jarak cina)

B = ekstrak daun jarak cina konsentrasi 35%

C = ekstrak daun jarak cina konsentrasi 40%

D = ekstrak daun jarak cina konsentrasi 45%

E = ekstrak daun jarak cina konsentrasi 50%

F = ekstrak daun jarak cina konsentrasi 55%

G = ekstrak daun jarak cina konsentrasi 60%

Jika analisis ragam (ANOVA) menunjukkan hasil yang berbeda nyata, maka dilakukan uji lanjut dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) taraf 5% apabila nilai Koefisien Keragaman (KK) 5-10% dan uji Jarak Berganda Duncan apabila nilai Koefisien Keragaman (KK) $\geq 10\%$.

Setelah data dianalisis dengan sidik ragam dan didapatkan hasil dua konsentrasi terbaik maka dilanjutkan pengujian secara *in vivo* dengan menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) yang terdiri dari 3 perlakuan dan 6 ulangan sehingga terdapat 18 unit percobaan. Adapun perlakuan yang digunakan diantaranya:

Penentuan ulangan dengan menggunakan rumus:

$$(t-1)(n-1) \geq 15$$

Keterangan:

t = perlakuan dalam penelitian

r = ulangan dalam penelitian

Adapun perlakuan dalam pengujian *in vivo* terdiri dari:

K = kontrol (tanpa ekstrak daun jarak cina)

P1 = ekstrak dengan konsentrasi terbaik pertama pada hasil pengujian *in vitro*

P2 = ekstrak dengan konsentrasi terbaik kedua pada hasil pengujian *in vitro*

Jika data yang diperoleh dari analisis ragam (ANNOVA) menunjukkan hasil yang berbeda nyata, maka dianalisis dengan uji lanjut Jarak Berganda Duncan (DMRT) taraf 5%.

3.4. Prosedur penelitian

3.4.1. Pengujian secara *in vitro*

1) Sterilisasi alat dan bahan

Erlenmeyer, *beaker glass*, gelas ukur, tabung reaksi, *cork borer*, jarum ose dan aquadest yang disimpan dalam *erlenmeyer* dibungkus dengan kertas/*aluminium foil* kemudian disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 15 atm selama 20 menit. Alat-alat logam disterilisasi kembali dengan disemprotkan alkohol 70% kemudian dilewatkan di atas api bunsen. Adapun sterilisasi alat-alat yang tidak tahan panas yaitu dengan alkohol 70% (Rodiah, Indriarti dan Fifendy., 2022).

2) Pembuatan media PDA

Pembuatan media *Potato Dextrose Agar* (PDA) sesuai dengan penelitian Putri, Ratnasari dan Asri., (2019) sebagai berikut:

- a) Serbuk PDA ditimbang sebanyak 39 gram untuk 1 L aquadest dan dilarutkan pada *erlenmeyer*.
- b) Larutan media PDA dipanaskan dengan menggunakan *hot plate* hingga homogen.
- c) Media dimasukkan ke dalam masing-masing *erlenmeyer*, kemudian ditutup dengan plastik tahan panas hingga rapat.
- d) Sterilisasi media lakukan dengan autoklaf selama 20 menit pada suhu 121°C.
- e) Media dituangkan pada cawan petri.

3) Peremajaan *Fusarium sp.*

Prosedur peremajaan *Fusarium sp.* berdasarkan penelitian Rodiah dkk. (2022) diantaranya:

- a) Koloni *Fusarium* sp. dari biakan murni diambil dengan menggunakan jarum ose. Isolat *Fusarium* sp. yang digunakan didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Pertanian Universitas Siliwangi dan merupakan *Fusarium* yang diisolasi dari tanaman cabai.
- b) Selanjutnya, koloni tersebut diletakkan pada bagian tengah cawan petri *disposable* diameter 90 mm yang telah diisi media PDA.
- c) Media yang berisi fungi tersebut diinkubasi hingga terbentuk koloni selama ± 7 hari.

4) Pembuatan ekstrak daun jarak cina

Proses ekstraksi maserasi daun jarak cina didasarkan pada penelitian Irawati (2017) serta Titalianingtyas & Ratnasari (2023) dengan langkah-langkah sebagai berikut:

- a) Daun jarak cina sebanyak 300 gram dibersihkan di bawah air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang menempel.
- b) Kemudian daun ditiriskan hingga tidak ada sisa air.
- c) Daun jarak cina digunting menjadi bagian-bagian kecil.
- d) Selanjutnya simplisia dimaserasi menggunakan etanol 96% hingga 3 kali perendaman selama 24 jam pada setiap perendaman.
- e) Setelah 3x24 jam, hasil maserasi disaring dengan kertas saring untuk memisahkan residu daun jarak cina dengan filtrat.

5) Pembuatan variasi konsentrasi ekstrak daun jarak cina

- a) Konsentrasi ekstrak daun jarak cina yang dibuat yaitu 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, dan 60% diencerkan hingga volume 100 ml (Titalianingtyas & Ratnasari, 2023). Pengenceran dilakukan dengan rumus:

$$M_1V_1 = M_2V_2$$

Keterangan:

M₁ = Konsentrasi sebelum pengenceran

V₁ = Volume sebelum pengenceran

M₂ = Konsentrasi setelah pengenceran

V₂ = Volume setelah pengenceran

- b) Konsentrasi 35% dengan mengukur 35 ml ekstrak dan ditambahkan 65 ml aquadest steril.
- c) Konsentrasi 40% dengan mengukur 40 ml ekstrak dan ditambahkan 60 ml aquadest steril.
- d) Konsentrasi 45% dengan mengukur 45 ml ekstrak dan ditambahkan 55 ml aquadest steril.
- e) Konsentrasi 50% dengan mengukur 50 ml ekstrak dan ditambahkan 50 ml aquadest steril.
- f) Konsentrasi 55% dengan mengukur 55 ml ekstrak dan ditambahkan 45 ml aquadest steril.
- g) Konsentrasi 60% dengan mengukur 60 ml ekstrak dan ditambahkan 40 ml aquadest steril.

6) Pengujian ekstrak daun jarak cina terhadap *Fusarium* sp. secara *in vitro*

Prosedur pengujian aktivitas antifungi dilakukan dengan metode dilusi padat dengan peracunan makanan (*food poisoning*) berdasarkan penelitian Durgeshlal dkk. (2019) diantaranya:

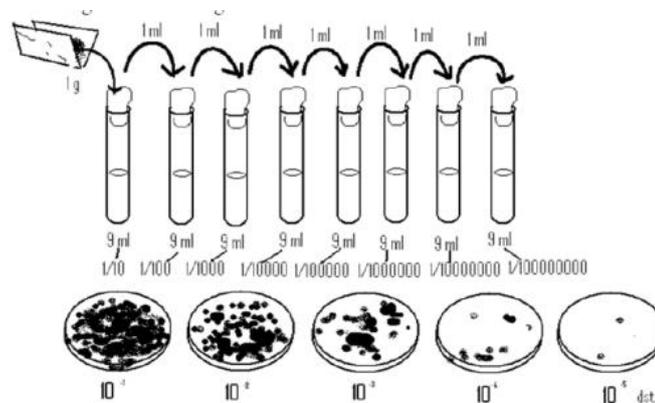
- a) Masing-masing ekstrak daun jarak cina dituangkan pada cawan petri *disposable* diameter 90 mm sebanyak 2 ml. Kemudian ditambahkan media PDA sebanyak 9 ml pada setiap cawan petri yang telah diberi perlakuan ekstrak.
- b) Pada perlakuan kontrol, media PDA dituangkan sebanyak 9 ml dan tidak diberikan ekstrak daun jarak cina.
- c) Setelah media padat, remajaan fungi *Fusarium* sp. berupa cakram hifa aktif diinokulasikan pada bagian tengah cawan petri dengan *cork borer*, kemudian disimpan pada ruangan steril dengan suhu ruang dan disinari lampu selama 24 jam. Remajaan yang digunakan yaitu *Fusarium* sp. yang telah diinkubasi selama 5 hari.
- d) Pengamatan dilakukan dengan mengukur diameter koloni dan persentase daya hambat. Pengukuran diameter koloni dengan menggunakan jangka sorong. Pengamatan dilakukan pada 1 HSI, 3 HSI, 5 HSI dan 7 HSI.

3.4.2. Pengujian secara *in vivo*

1) Pembuatan suspensi *Fusarium* sp. dan pengenceran bertingkat

Tahapan pembuatan suspensi dan pengenceran bertingkat diantaranya:

- Biakan *Fusarium* sp. pada media PDA dalam cawan petri diambil sebanyak 1 gram, kemudian ditambahkan pada aquadest steril 9 ml dan dikocok hingga homogen yang dilihat dari kekeruhan warna.
- Suspensi diambil sebanyak 1 ml, kemudian dihitung kerapatannya dengan menggunakan *haemocytometer*.
- Jika kerapatan spora lebih dari 1×10^7 spora/ml maka dilakukan pengenceran bertingkat dengan mengambil 1 ml suspensi kemudian ditambahkan pada 9 ml aquadest pada tabung reaksi. Perbandingan yang digunakan untuk sampel dan pengenceran pertama hingga selanjutnya yaitu 1 : 9, sehingga pengenceran berikutnya mengandung 1/10 sel mikroorganisme dari pengenceran sebelumnya.



Gambar 4. Pengenceran bertingkat suspensi *Fusarium* sp.
(Sumber: Azni, Amelia dan Ramadhan, 2022)

2) Perhitungan kerapatan spora *Fusarium* sp.

Menurut Harleni & Juleha (2022) kerapatan spora dihitung dengan menggunakan *haemocytometer* dengan tahapan:

- Haemocytometer* dan *cover glass* dibersihkan dengan alkohol 70%, kemudian dikeringkan dengan tisu yang berbahan lembut. Setelah itu dibersihkan dengan aquadest steril.

- b) *Haemocytomer* yang telah dipasang *cover glass* diletakkan di mikroskop, kemudian dicari kotak-kotak pengamatan dengan perbesaran terkecil terlebih dahulu.
- c) Setelah itu, suspensi *Fusarium* sp. diambil sebanyak 1 ml lalu diletakkan pada kotak-kotak dalam *haemocytometer* melalui sela-sela.
- d) Perhitungan kerapatan spora ditentukan dengan rumus (Harleni & Juleha, 2022):

$$K = \frac{t}{n \times 0,25} \times 10^6$$

Keterangan:

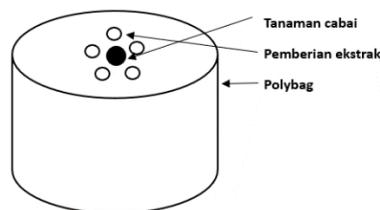
- K = Kerapatan spora (spora/ml)
- t = Jumlah konidia per pada kotak perhitungan
- n = Jumlah bilik kecil yang diamati (5 x 16 = 80)
- 0,25 x 10⁶ = Volume satu bilik kecil (1/4.10⁶ ml)

3) Pengujian ekstrak daun jarak cina terhadap *Fusarium* sp. secara *in vivo*

Tahapan pengujian aktivitas antifungi secara *in vivo* berdasarkan penelitian Tamara (2022) sebagai berikut:

- a) Benih cabai besar varietas Tanjung-2 dikecambahkan dalam *papper towel* yang lembab, kemudian ditutup kembali dengan *papper towel* yang telah disemprot air hingga lembap. Perkecambahan dilakukan pada cawan petri steril.
- b) Benih yang dikecambahkan disimpan dalam suhu ruang hingga terbentuk kecambah dengan panjang radikula sekitar 2-3 mm.
- c) Persiapan media tanam dilakukan dengan mencampurkan tanah dan pupuk kompos dengan perbandingan 3 : 1, kemudian media tanam disterilkan dengan cara dikukus selama 2 jam selama 3 hari, sehingga total waktu pengukusan selama 6 jam.

- d) Setelah terbentuk radikula sekitar 2-3 mm, kecambah direndam dengan suspensi fungi *Fusarium* sp. dengan kerapatan spora 1×10^7 spora/ml selama 1 jam, kemudian ditanam dalam polybag.
- e) Setelah 7 hari, masing-masing ekstrak ditambahkan sebanyak 5 ml pada tanah yang telah dilubangi sedalam 3 cm di sekitar tanaman cabai (Tamara, 2022). Pemberian ekstrak 5 ml dilakukan dengan membuat 5 lubang di sekitar tanaman dan setiap lubang diisi dengan 1 ml ekstrak.



Gambar 5. Pemberian ekstrak pada tanaman cabai

- f) Penyiraman dilakukan sebanyak dua kali secara konstan, yaitu pada pukul 06.00 WIB dan 18.00 WIB.
- g) Pengamatan dilakukan selama 14 hari (8 HST hingga 21 HST). Pengamatan yang dilakukan yaitu jumlah daun, tinggi tanaman, bobot basah, bobot kering, masa inkubasi, kejadian penyakit (I), dan keparahan penyakit (KP). Insidensi penyakit (I) dihitung dengan rumus:

$$I = \frac{\text{Jumlah tanaman yang bergejala}}{\text{Jumlah total tanaman yang diamati}} \times 100\%$$

Perhitungan keparahan penyakit (KP):

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

Keterangan:

- N = Jumlah tanaman yang diamati
v = Nilai skala kategori serangan
n = Jumlah tanaman yang terserang dengan kategori tertentu
Z = Nilai skala tertinggi

3.5. Parameter penelitian

3.5.1. Parameter penelitian pada pengujian *in vitro*

A. Parameter penunjang

- 1) Masa inkubasi sejak inokulasi fungi *Fusarium* sp., dilakukan dengan mengamati lama waktu munculnya fungi dari waktu inokulasi.
- 2) Karakteristik makroskopis *Fusarium* sp., dilakukan dengan melihat warna dan bentuk miselium/koloni *Fusarium* sp. yang tumbuh.

B. Parameter utama

- 1) Diameter koloni, dengan membuat garis vertikal dan horizontal yang berpotongan pada titik inokulasi *Fusarium* sp. Data diameter koloni dihitung dengan rumus (Titalianingtyas & Ratnasari, 2023):

$$D = \frac{d1 + d2}{2} - 4$$

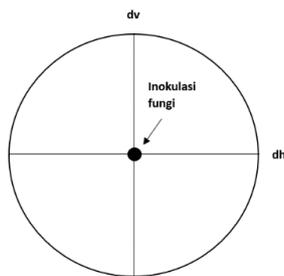
Keterangan:

D = diameter koloni (mm)

d1 = diameter pertumbuhan secara vertikal (mm)

d2 = diameter pertumbuhan secara horizontal (mm)

4 = diameter fungi yang diinokulasi (mm)



- 2) Persentase daya hambat, perhitungan dilakukan setelah pengukuran diameter koloni. Adapun perhitungan persentase daya hambat adalah sebagai berikut (Titalianingtyas & Ratnasari, 2023):

$$P = \frac{D1 - D2}{D1} \times 100\%$$

Keterangan:

P = persentase daya hambat (%)

D1 = diameter koloni pada perlakuan kontrol (mm)

D2 = diameter koloni pada perlakuan ekstrak (mm)

3.5.2. Parameter penelitian pada pengujian *in vivo*

A. Parameter penunjang

- 1) Bobot tanaman, terdiri dari bobot basah dan bobot kering. Bobot basah, dihitung dengan menimbang tanaman sampel pada 21 HST dengan menggunakan timbangan analitik. Bobot kering dihitung dengan menimbang tanaman sampel yang telah dikeringkan dengan *seed dryer/oven* suhu 50 °C selama 1 x 24 jam.
- 2) Tinggi tanaman, dilakukan dengan mengukur tinggi tanaman pada 14 HST dan 21 HST dengan menggunakan penggaris.
- 3) Uji patogenisitas, dilakukan dengan menginjeksi bagian akar tanaman cabai besar yang memiliki kondisi sehat dengan suspensi *Fusarium* sp. kerapatan spora 1×10^7 spora/ml.

B. Parameter utama

- 1) Masa inkubasi, merupakan lama waktu munculnya gejala awal setelah inokulasi patogen dan pemberian ekstrak. Pengamatan masa inkubasi dicatat sejak pemberian perlakuan ekstrak (8 HST hingga 21 HST) dalam satuan hari.
- 2) Insidensi penyakit atau kejadian penyakit (I) merupakan proporsi individu dari tanaman yang diserang penyakit tanpa memperdulikan seberapa tanaman (Rizkyarti, 2010).
- 3) Keparahan penyakit (KP). Skor untuk menghitung keparahan penyakit yang disebabkan *Fusarium* sp. menggunakan skala 0 – 4 (Rahmat, Hartini dan Oktavianti., 2023).
 - 0 : tanaman tidak menunjukkan gejala layu
 - 1 : $\leq \frac{1}{4}$ bagian tanaman terserang gejala layu atau tanaman kerdil
 - 2 : $> \frac{1}{4} - \frac{1}{2}$ bagian tanaman terserang gejala layu
 - 3 : $> \frac{1}{2} - \frac{3}{4}$ bagian tanaman terserang gejala layu
 - 4 : $> \frac{3}{4}$ bagian tanaman terserang gejala layu hingga tanaman mati

Tinggi rendahnya efektivitas ekstrak daun jarak cina sebagai antifungi *Fusarium* sp. ditentukan berdasarkan besarnya persentase keparahan penyakit. Jika KP 0% kategori efektivitasnya sangat tinggi, KP <20% tinggi, KP 20 – 40% sedang, KP 40 – 60% rendah, dan KP >60% sangat rendah (Wati, Yafizha dan Fuskhah., 2020).

- 4) Jumlah daun, dihitung pada pada 8 HST hingga 21 HST.