

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan tempat penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Proteksi Tanaman Fakultas Pertanian Universitas Siliwangi, pada bulan Mei sampai bulan Agustus 2022.

3.2 Alat dan bahan penelitian

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

Bahan yang digunakan pada penelitian ini antara lain cangkang kelapa muda, buah pisang, akuades steril, NaOCl, NaOH, larutan *Phenolphthalein* (PP), alkohol 70%, spirtus, Tween 20, FeCl₃, CH₃COOH, dan media *potato dextrose agar* (PDA) instan.

3.3 Rancangan penelitian

3.3.1 Percobaan *in vitro*

Rancangan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 5 perlakuan dan 5 ulangan, sehingga terdapat 25 unit percobaan.

Adapun perlakuan pemberian konsentrasi asap cair pada media agar dilakukan dengan menggunakan konsentrasi asap cair sebagai berikut :

p_0 = Tanpa pemberian asap cair

p_1 = Asap cair 2%

p_2 = Asap cair 4%

p_3 = Asap cair 6%

p_4 = Asap cair 8%

3.3.2 Percobaan *in vivo*

Percobaan *in vivo* merupakan kelanjutan dari uji *in vitro*, yaitu konsentrasi yang dapat menghambat pertumbuhan jamur 100% dikali 10 dijadikan sebagai perlakuan konsentrasi terendah *in vivo* dan untuk perlakuan konsentrasi selanjutnya ditambahkan 20%. Ada 5 taraf perlakuan konsentrasi asap cair yang disusun dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL) dan diulang sebanyak 5 kali. Setiap perlakuan terdiri dari 6 buah pisang dengan demikian diperoleh 25 unit percobaan sehingga diperlukan 150 buah pisang sehat. Perlakuan konsentrasi tersebut adalah :

p_0 = Tanpa pemberian asap cair

p_1 = Asap cair 40%

p_2 = Asap cair 60%

p_3 = Asap cair 80%

p_4 = Asap cair 100%

3.3.3 Analisis statistik

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

Tabel 6. Analisis sidik ragam

Sumber Ragam	DB	JK	KT	Fhit	F Tab 5%
Perlakuan	4	$\sum X^2 - FK$	$\frac{JK_P}{db_P}$	$\frac{KT_P}{KT_G}$	3,01
Galat	20	$JK_T - JK_P$	$\frac{JK_G}{db_G}$		
Total	24	$\sum \frac{T^2}{r} - FK$			

Sumber: Gomez dan Gomez (2010)

Tabel 7. Kaidah pengambilan keputusan

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

Sumber: Gomez dan Gomez (2010)

Apabila hasil Uji F menunjukkan berpengaruh nyata, maka akan dilakukan uji lanjut dengan menggunakan Uji Jarak Berganda Duncan pada taraf nyata 5% dengan rumus sebagai berikut:

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

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

Keterangan:

LSR = *Least significant range*

SSR = *Studentized significant ranges*

A = 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

3.4 Pelaksanaan penelitian

Tahapan percobaan sebagai berikut:

3.4.1 Pembuatan asap cair dan karakterisasi asap cair

1). Pengambilan limbah kelapa muda

Limbah kelapa muda diambil dari pedagang minuman kelapa muda di kawasan Jalan Peta hingga Jalan Batara, Tasikmalaya. Sampel diambil secara acak dengan ketentuan cangkang masih terlihat bagus dan tidak berjamur. Setelah cangkang kelapa dicacah hingga berukuran ± 5 cm. Pencacahan dilakukan dengan

tujuan agar kadar air dalam tempurung kelapa dapat berkurang secara merata pada saat dijemur. Kemudian hasil cacahan dijemur di bawah sinar matahari hingga kadar air mencapai $\pm 20\%$. Perhitungan kadar air cangkang kelapa menggunakan *wood moisture meter*.

2). Pembuatan asap cair

Bahan yang telah kering dimasukkan ke dalam alat pirolisis untuk melakukan pemanasan dengan suhu mencapai 400°C karena dalam suhu ini berindikasi menyebabkan penghambatan cendawan paling tinggi (Aisyah, dkk, 2013). Dalam 1 kali pemanasan dilakukan selama ± 1 jam untuk mendapatkan asap cair *grade 3*, lalu diendapkan selama 7 hari bertujuan agar tar yang terkandung mengendap di bawah.

Setelah diendapkan dilakukan proses distilasi dengan dimasukkan ke alat destilator bertujuan menyaring dari zat kimia dengan suhu $100\text{-}110^{\circ}\text{C}$, sehingga didapatkan asap cair *grade 2*. Kemudian dilakukan pemurnian kembali (redistilasi) dengan tujuan agar terbebas dari zat berbahaya, mengurangi bau dan menghasilkan warna yang bening. Dengan itu akan didapatkan asap cair *grade 1* yang aman untuk pengawetan makanan.

3). Karakterisasi kualitas asap cair

Asap cair *grade 1* yang didapatkan lalu diuji kualitasnya berdasarkan kualitas asap cair berstandar nasional dan internasional, dengan parameter yang diuji berupa bobot jenis, warna, pH, rendemen, senyawa fenol dan kadar asam.

3.4.2 Isolasi 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.

3.4.3 Pelaksanaan Pengujian *in vitro*

1). Sterilisasi alat

Alat yang digunakan dicuci dengan sabun dan 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%.

2). Pembuatan media perlakuan PDA

Media PDA instan sebanyak 20 g dimasukkan ke dalam erlenmeyer bersama dengan akuades sebanyak 500 ml. Kemudian dihomogenkan dan dipanaskan hingga mendidih menggunakan *hot plate magnetic stirrer*, lalu disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 20 menit. Kemudian media dibagi menjadi 5 bagian dengan menggunakan labu Erlenmeyer, dilakukan di dalam *Laminar Air Flow* (LAF).

Untuk memasukkannya pada cawan petri dengan menambahkan asap cair sesuai perlakuan yaitu 2%, 4%, 6%, dan 8% ke dalam tabung ukur berukuran 25 ml menggunakan mikro pipet, lalu ditambahkan larutan PDA hingga volume 10 ml. Kemudian dihomogenkan dengan digoyangkan secara perlahan dan hati-hati.

Larutan yang sudah homogen dimasukkan ke dalam cawan petri dan dibiarkan hingga mengeras.

3). Inokulasi patogen pada media perlakuan PDA

Media PDA yang sudah diberi perlakuan dan mengeras lalu diberikan kertas cakram di tengahnya dan diteteskan media cair 10 μ L yang berisi 10^5 konidia/ml menggunakan mikro pipet. Pengamatan dilakukan selama 7 hari setelah inokulasi.

3.4.4 Pelaksanaan pengujian *in vivo*

1). Persiapan pisang

Buah pisang susu yang dipanen setelah berumur \pm 90 hari. Ditandai dengan adanya buah pisang yang sudah menguning pada setiap tandannya. Buah dipilih dengan melihat keseragaman ukuran dan kematangan. Terdapat 25 unit plot pengamatan, setiap plot pengamatan membutuhkan 6 buah pisang sehingga dibutuhkan 150 buah pisang susu sehat. Buah pisang kemudian dibersihkan dengan air yang mengalir dan larutan sabun, lalu dikeringkan.

2). Pembuatan dan pengaplikasian larutan asap cair untuk perlakuan pada buah pisang

Larutan asap cair untuk uji *in vitro* dibuat dengan konsentrasi larutan 0%, 2%, 4%, 6% dan 8%. Larutan asap cair dibuat dengan konsentrasi larutan ke-0, 1, 2, 3, dan 4, dengan konsentrasi ke-0 sebagai kontrol yaitu 0% asap cair. Untuk menentukan konsentrasi ke 1 dalam uji *in vivo* diambil dari perlakuan konsentrasi yang memiliki penghambatan 100% pada hasil uji *in vitro* dikali 10. Konsentrasi ke-2 dan seterusnya ditambah 20%, sehingga penghambatan 100% pada uji *in vitro* didapatkan pada konsentrasi 4%, jadi konsentrasi perlakuan *in vivo* yang dipakai 0%, 40%, 60%, 80%, dan 100%. Volume larutan asap cair masing-masing perlakuan dibuat sebanyak 250 ml. Setelah buah pisang dibersihkan dan dikeringkan, buah diberikan perlakuan asap cair dengan cara dioleskan menggunakan kuas yang berbeda pada setiap konsentrasinya.

3). Perlakuan cendawan pada buah pisang

Setelah asap cair kering, buah dilukai \pm 0,2 cm dengan jarum steril untuk diberikan cendawan sebanyak 10 μ L dengan kepadatan konidia 10^5 /ml. Buah yang sudah diberi perlakuan disimpan dalam kotak plastik yang sudah diberi label pada

suhu 25-27°C dan kelembaban 80%. Pengamatan dilakukan pada 1 hari setelah inokulasi patogen hingga hari ke-7.

3.5 Variabel pengamatan

3.5.1 Pengamatan penunjang

Parameter penunjang adalah merupakan faktor-faktor eksternal yang dapat mempengaruhi penelitian. Parameter penunjang terdiri dari data yang tidak dianalisis secara statis antara lain :

a. Karakterisasi kualitas asap cair cangkang kelapa muda

Karakteristik asap cair *grade* 1 dilihat dari warna, pH, rendemen, bobot jenis, kadar asam, fenol.

- 1). Pengujian Bobot jenis dengan menggunakan alat piknometer dengan ditimbang menggunakan timbangan analitik. Dapat dihitung dengan rumus (Wibowo, 2012):

$$\text{Bobot jenis } (\rho) = \frac{\text{Bobot bahan}}{\text{Volume piknometer}}$$

- 1) Pengujian rendemen dihitung menggunakan rumus (Jaya, Sandri, dan Setiawan, 2019) :

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

- 2) Pengujian warna dilakukan dengan menggunakan aplikasi *android colorimeter*.
- 3) Pengujian pH dengan menggunakan kertas lakmus atau indikator pH universal. Ujung kertas yang terdapat warna dicelupkan ke dalam asap cair sampai warna berubah dan bandingkan warna pada kertas lakmus dengan warna yang sudah terdapat dikemasan.
- 4) Pengujian fenol menggunakan larutan $FeCl_3$ dengan meneteskan sebanyak 5 tetes pada larutan asap cair lalu dihomogenkan hingga berubah warna menjadi coklat.
- 5) Pengujian kadar asam menggunakan metode titrimetri atau titrasi. Buret titrasi diisi dengan NaOH 0,1 N sampai menyentuh angka 1. Larutan sampel

1 ml dilarutkan dengan akuades sampai volume larutan 10 ml dan ditambahkan larutan *Phenolphthalein* (PP) sebanyak 3 tetes. Kemudian lakukan titrasi sampai warna sampel berubah menjadi merah muda stabil. Kadar asam dihitung dengan rumus (Setiawati dan Yuniarta, 2018) :

$$\text{Kadar asam} = \frac{\text{Volume NaOH tertitrasi} \times \text{Konsentrasi NaOH} \times \text{mr CH}_3\text{COOH}}{\text{bobot sample} \times 1000} \times 100\%$$

b. 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 *Colletotrichum musae*.

Bagian yang diamati	Karakteristik	
	Bele, Kouamé, 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 Pengamatan utama

a. Pengamatan *in vitro*

1) Pertumbuhan miselium

Pengamatan ini untuk melihat perkembangan patogen dalam PDA yang sudah diberi perlakuan asap cair, dengan mengukur diameter miselium yang terbentuk menggunakan alat ukur penggaris dan kertas cakram sebagai titik tengah. Pengukuran dilakukan selama 7 hari dan diukur sejak hari pertama setelah inokulasi.

2) Indeks anti jamur asap cair

Pengamatan ini dilakukan untuk melihat konsentrasi paling efektif dalam menghambat pertumbuhan *C. musae*, dengan menggunakan penggaris untuk mengukur diameter pertumbuhan miselium. Pengamatan dilakukan selama 7 hari

dimulai dari hari ke-1 setelah inokulasi. Nilai indeks antijamur diperoleh dari persamaan berikut (Hartati, 2013 dan Suresh *et al*, 2019) :

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

Keterangan:

DH = Daya hambat (%)

b. Pengamatan *in vivo*

Pengamatan ini dilakukan untuk melihat daya hambat perkembangan penyakit, frekuensi dan intensitas serangan cendawan *Colletotrichum musae* pada buah yang sudah diberi perlakuan. Pengamatan *in vivo* dilakukan 1 sampai 7 hari setelah inokulasi patogen pada buah pisang.

1) Frekuensi serangan

Pengamatan dilakukan selama 7 hari setelah inokulasi, dihitung sejak 1 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 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)

2) 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	Tidak ada kerusakan
1	Rusak ringan $\leq 25,00\%$
2	Rusak sedang $> 25,01\% - 50,00\%$
3	Rusak berat $> 50,01\% - 75,00\%$
4	Rusak sangat berat $> 75,01\% - 100\%$

Sumber: Marhani (2018)

3) 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 penambahan diameter luka menggunakan penggaris. Untuk penghambatan penyakit dapat dihitung dengan rumus (Hartati, 2013 dan Suresh *et al*, 2019):

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

Keterangan : Pp = Penghambat Penyakit (%)