

## **BAB III METODE PENELITIAN**

### **3.1 Waktu dan tempat penelitian**

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi dan Proteksi Tanaman Fakultas Pertanian Universitas Siliwangi Kota Tasikmalaya. Penelitian dilaksanakan pada bulan Juni sampai November 2022.

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

Peralatan yang digunakan pada kajian *in vitro* dan *in vivo* adalah *disposable petri dish* (cawan petri sekali pakai), erlenmeyer, gelas ukur, tabung reaksi, ose, neraca analitik, *laminar air flow*, bunsen, kaca preparat, tabung ukuran 50 ml, *scalpel*, mikropipet, piknometer, *wood moisture meter*, *spreader*, hemositometer, autoklaf, reaktor pirolisis, golok, perangkat distilasi, baki plastik dan alat tulis menulis.

Bahan yang digunakan adalah aqua-dm, *aluminium foil*, kertas, plastik, media *Potato Dextrosa Agar* (PDA), *chloramfenicol* atau *streptomycin sulfate*,  $\text{FeCl}_3$  1%, phenolphthalein, NaOH 0,1 N, alkohol, Tween-20 (*polyoxyethylene-20-sorbitan monolaurate*) 0,1%, *wrap plastic*, spirtus, pemantik api, cangkang kelapa muda untuk pembuatan asap cair, buah pepaya yang terinfeksi cendawan *Collectotricum gloeosporioides* dan buah pepaya sehat varietas Calina.

### **3.3 Metode penelitian**

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

Metode yang digunakan yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL), terdiri dari 6 taraf konsentrasi asap cair pada media agar. Pengujian *in vitro* merupakan kegiatan pra penelitian untuk menentukan konsentrasi yang akan digunakan pada percobaan secara *in vivo*. Konsentrasi mengacu pada penelitian Mahmud, Hidayat, dan Aulawi (2020), sebagai berikut:

- $e_0$  = tanpa perlakuan asap cair
- $e_1$  = konsentrasi asap cair 0,5%
- $e_2$  = konsentrasi asap cair 1%
- $e_3$  = konsentrasi asap cair 1,5%

- $e_4$  = konsentrasi asap cair 2%  
 $e_5$  = konsentrasi asap cair 2,5%

### 3.3.2 Percobaan *in vivo*

Penelitian dilakukan dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang disusun secara Faktorial, terdiri atas dua faktor, faktor pertama adalah perlakuan konsentrasi asap cair cangkang kelapa muda (K) dan faktor kedua adalah perlukaan (P) dengan rincian sebagai berikut:

- a. Faktor pertama yaitu konsentrasi asap cair (K), terdiri dari 6 taraf.

- $k_0$  = Konsentrasi ke-0                       $k_3$  = Konsentrasi ke-3  
 $k_1$  = Konsentrasi ke-1                       $k_4$  = Konsentrasi ke-4  
 $k_2$  = Konsentrasi ke-2                       $k_5$  = Konsentrasi ke-5

Penentuan konsentrasi terendah pada pengujian *in vivo* diambil dari efek daya hambat pertumbuhan jamur tertinggi dan konsentrasi terendah pada percobaan *in vitro*.

- b. Faktor yang kedua yaitu perlukaan (P), terdiri dari dua taraf.

- $p_0$  = Tanpa Perlukaan  
 $p_1$  = Dengan Perlukaan

Dengan demikian diperoleh 12 kombinasi perlakuan dan masing-masing diulang sebanyak tiga ulangan.

### 3.3.3 Analissi data

Data hasil percobaan *in vivo* dianalisis menggunakan sidik ragam dan kaidah pengambilan keputusan berdasarkan uji F.

Tabel 2. Kombinasi perlakuan konsentrasi dengan ada/tidak adanya perlukaan

Konsentrasi (K)	Perlukaan (P)	
	$p_0$	$p_1$
$k_0$	$k_0p_0$	$k_0p_1$
$k_1$	$k_1p_0$	$k_1p_1$
$k_2$	$k_2p_0$	$k_2p_1$
$k_3$	$k_3p_0$	$k_3p_1$
$k_4$	$k_4p_0$	$k_4p_1$
$k_5$	$k_5p_0$	$k_5p_1$

Tabel 3. Tabel analisis ragam (ANOVA)

Sumber ragam	Db	JK	KT	F Hit	F Tab 5%
Perlakuan	11	$\Sigma T^2/r - FK$	$JK_p/db_p$	$KT_p/KT_G$	2.22
Konsentrasi (K)	5	$\Sigma K^2/rP - FK$	$JK_K/db_K$	$KT_K/KT_G$	2.62
Pelukaan (P)	1	$\Sigma P^2/rK - FK$	$JK_p/db_p$	$KT_p/KT_G$	4.26
K x P	5	$JK(K) - JK(P)$	$JK_{KxP}/db_{KxP}$	$KT_{KxP}/KT_G$	2.62
Galat	24	$JKT - JK$			
Total	35	$\Sigma x^2 - FK$			

(Sumber: Gomez dan Gomez, 2010)

Tabel 4. Kaidah pengambilan keputusan

Hasil Analisis	Kesimpulan Analisis	Keterangan
$F_{hit} \leq F_{0.05}$	Berbeda tidak nyata	Tidak ada pengaruh
$F_{hit} > F_{0.05}$	Berbeda nyata	Ada pengaruh

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

$$LSR = S_x \times SSR$$

Nilai  $S_x$  dapat dicari dengan rumus sebagai berikut:

1. Apabila terjadi interaksi, untuk membedakan pengaruh faktor K pada setiap taraf faktor P, dan sebaliknya untuk membedakan pengaruh faktor P pada seluruh taraf faktor K,  $S_x$  diperoleh dengan rumus:

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

2. Apabila tidak terjadi interaksi,  $S_x$  dicari dengan rumus sebagai berikut:
  - a. Untuk membedakan pengaruh faktor P pada setiap taraf faktor K, maka rumusnya:

$$S_k = \sqrt{\frac{KT \text{ Galat}}{r \times p}}$$

- b. Untuk membedakan pengaruh faktor K pada setiap taraf faktor P, maka rumusnya:

$$S_p = \sqrt{\frac{KT \text{ Galat}}{r \times k}}$$

Keterangan:

LSR	= <i>Least Significant Ranges</i>
SSR	= <i>Studentized Significant Ranges</i>
$S_x$	= Galat baku rata-rata
$S_k$	= Galat baku rata-rata Konsentrasi
$S_p$	= Galat baku rata-rata Pelukaan
KT Galat	= Kuadrat tengah galat
r	= Jumlah ulangan
K	= Db perlakuan k
P	= Db perlakuan p

### 3.4 Prosedur penelitian

#### 3.4.1 Sterilisasi alat

Alat yang digunakan dalam uji *in vitro* disterilisasi dengan cara mencuci dengan sabun terlebih dahulu untuk membersihkan dari kontaminan yang menempel pada permukaan alat. Alat kemudian dikeringkan dan dibungkus dengan kertas dan plastik anti panas. Alat dimasukkan ke dalam autoklaf, kemudian disterilisasi pada suhu 121°C selama 20 menit. Peralatan yang tidak bisa diautoklaf disterilisasi dengan alkohol 70%.

#### 3.4.2 Pembuatan media PDA

Pembuatan media PDA mengacu pada Anggraeni, Wardoyo, dan Rahmawati (2019) dengan menggunakan 39 gram serbuk PDA yang dididihkan dalam 1 liter akuades. Media yang telah mendidih ditambahkan *Chloramfenicol* (200 mg/l) atau *streptomycin sulfat* (30 mg/l) untuk menghambat pertumbuhan bakteri kemudian disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 1,5 atm selama 20 menit.

#### 3.4.3 Pembuatan asap cair

##### a. Pirolisis

Proses pembuatan asap cair mengacu pada Rahmat dkk. (2014) dan Pamori dkk. (2015). Cangkang kelapa muda dengan kadar air 20% menghasilkan kualitas asap cair terbaik, yang memiliki karakteristik rendemen 9,06%, nilai pH 2,6, total asam C 5,2%, kadar fenol 0,660 dan bobot jenis 1,009. Cangkang kelapa didapat dari beberapa penjual es kelapa muda di Kecamatan Tamansari, Kota Tasikmalaya. Cangkang kelapa muda dipotong kecil-kecil sekitar 3-4 cm

menggunakan golok untuk mempercepat proses pengeringan dan memperbesar luas bidang pembakaran sehingga proses pirolisis lebih efisien. Bahan kemudian dikeringkan di bawah sinar matahari. Pengeringan dihentikan apabila telah mencapai kadar air 15 hingga 20%. Penghitungan kadar air menggunakan *wood moisture meter*. Cangkang kelapa dimasukkan ke dalam reaktor pirolisis sebanyak 800 gram dan dibakar dengan suhu 400°C. Proses diulang hingga didapat asap cair hasil redistilasi sebanyak 1500 ml.

#### b. Distilasi

Asap cair *crude* dimurnikan dengan cara distilasi setelah didiamkan minimal 24 jam setelah pirolisis. Asap cair dimasukkan sebanyak 300 ml ke dalam labu distilasi kemudian dipanaskan dengan suhu 110°C sampai tersisa sekitar 10%. Uap yang terbentuk akan masuk ke pipa pendingin dan ditampung pada *beaker glass*. Asap cair hasil distilasi memiliki kualitas *grade 2* sehingga perlu didistilasi ulang untuk mendapatkan *grade 1*.

#### c. Karakterisasi

Asap cair dikarakterisasi kualitasnya berdasarkan standar kualitas dari Jepang. Asap cair yang diuji ialah hasil distilasi kedua (redistilasi) yang merupakan asap cair *grade 1*. Parameter diuji secara kualitatif dan kuantitatif, meliputi parameter bobot jenis, pH, warna, transparansi, kandungan senyawa fenol, dan kadar asam.

#### 3.4.4 Isolasi *C. gloeosporioides*

Isolasi jamur patogen dilakukan dengan metode *Tissue Transplanting*, yaitu dengan memotong bagian buah pepaya yang memiliki gejala penyakit antraknosa. Gejala antraknosa berupa noda berwarna coklat sampai hitam pada kulit buah, memiliki sudut lancip atau tumpul, dan bercak cekung dengan ukuran yang bervariasi. Jaringan yang diambil berukuran 5 mm<sup>2</sup> direndam dalam etanol 70% (3 menit) dan 0,5% *sodium hypochlorite* (NaOCl) (2 menit) dan dicuci dengan air steril (1 menit) (Talukdar dkk., 2021). Jaringan ditumbuhkan pada media PDA yang sudah dibuat sebanyak tiga titik. Kultur diinkubasi pada suhu 25°C selama 7 hari. *Mycelium discs* (5 mm) diambil kemudian dipindahkan ke media baru untuk mendapatkan biakan murni.

### 3.4.5 Pemanenan konidia *C. gloeosporioides*

Isolat dari media PDA yang berumur 12 hari ditambahkan 10 ml larutan Tween 20 konsentrasi 0,1% lalu kerik permukaan media secara halus menggunakan *spreader* (Rahman, Ojiambo, dan Louws, 2015). Hasil kerikan dimasukkan ke dalam *conical tube* steril setelah sebelumnya disaring menggunakan kain kasa tiga lapis. Suspensi dihitung densitasnya dengan menggunakan hemositometer dan dikondisikan pada  $10^6$  *conidia*/ml. Kerapatan konidia dapat dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$S = \frac{N}{V} \times 10^3$$

Keterangan:

- S = Kerapatan konidia (konidia/ml)  
 N = Jumlah total konidia pada satu *chamber* utama (didapat dari jumlah total konidia pada lima sub-*chamber* dikali 5)  
 V = Volume *chamber* utama (panjang dan lebar 1 mm; *depth* 0,1 mm; maka volume 0,1 mm<sup>3</sup>)

Konstanta  $10^3$  didapat dari: 1 ml = 1000  $\mu$ l

### 3.4.6 Pengujian secara *in vitro*

Pengujian *in vitro* dilakukan untuk mengetahui daya hambat asap cair terhadap isolat jamur *C. gloeosporioides*. Jamur diinokulasikan sebanyak 10  $\mu$ l pada *paper disc* yang ditempatkan di tengah cawan petri pada media PDA yang telah ditambahkan asap cair sesuai perlakuan konsentrasi yang digunakan, yaitu 0%; 0,5%; 1,0%; 1,5%; 2,0%; dan 2,5%. Pengujian dilakukan sebanyak 4 ulangan. Pada cawan petri diberikan asap cair sebanyak 0 ml; 0,05 ml; 0,10 ml; 0,15 ml; 0,20 ml; dan 0,25 ml, kemudian ditambahkan media PDA sampai volume media menjadi 10 ml. Pengujian dilakukan dengan meneteskan suspensi konidia menggunakan mikropipet pada *paper disc* berdiameter 5 mm yang diletakkan di tengah-tengah pada setiap media perlakuan. Hasil inokulasi diinkubasi pada suhu 25°C selama 7 hari sambil diamati setiap hari dengan menghitung diameter koloni.

### 3.4.7 Pengujian secara *in vivo*

Preparasi buah dilakukan dengan membersihkan permukaan buah dari debu dan kotoran kasar yang menempel. Buah kemudian disemprot dengan alkohol 70% dan direndam dalam larutan desinfektan NaOCl 2% (3 menit) lalu dibilas dengan air mengalir dan dikeringanginkan. Buah didapat dari perkebunan di Kecamatan Tamansari. Buah yang digunakan memiliki berat dan tingkat kematangan yang relatif seragam dengan kondisi sehat.

Pengujian secara *in vivo* dilakukan dengan dua taraf perlakuan, yaitu dengan pelukaan dan tanpa pelukaan. Pelukaan diberikan pada dua titik dekat pangkal dan ujung buah dengan memberikan 5 tusukan pada setiap titiknya. Suspensi konidia sebanyak 10  $\mu$ l diberikan pada kedua titik baik pada buah dengan pelukaan dan buah tidak dilukai. Buah diinkubasi selama 48 jam pada kelembaban minimal 90%. Asap cair ditambahkan dengan cara dicelup selama 2 menit hingga seluruh permukaan buah terlapisi. Konsentrasi yang digunakan yaitu konsentrasi ke-0, 1, 2, 3, 4, dan 5. Berdasarkan hasil uji *in vitro*, konsentrasi asap cair cangkang kelapa muda yang diaplikasikan yaitu 0%, 15%, 30%, 45%, 60%, dan 75%. Buah pepaya diletakkan dalam baki plastik ukuran 40 cm x 30 cm x 12 cm dan ditutup *wrap plastic* untuk menghindari kontak dengan udara bebas. Pada dua hari pertama diletakkan kapas basah di salah satu sudut pada setiap kotak untuk menjaga kelembaban  $\geq 90\%$ , kemudian pada hari setelahnya hingga hari ke-7 kapas dihilangkan dalam kotak. Unit percobaan diletakkan dalam ruangan dengan suhu 24 hingga 26°C dan diamati sejak satu hari setelah inokulasi patogen hingga hari ke-7 setelah inokulasi (Zuanif dan Despita, 2019).

## 3.5 Parameter pengamatan

### 3.5.1 Parameter penunjang

#### a. Karakteristik kualitas asap cair cangkang kelapa muda

Kualitas asap cair diuji dengan mengacu pada standar mutu Jepang. Karakteristik yang diuji meliputi pH, kadar asam (total asam tertitrasi), berat jenis, warna, dan transparansi larutan. Standar mutu asap cair spesifikasi Jepang dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Standar mutu asap cair spesifikasi Jepang

Parameter ( <i>Parameters</i> )	Mutu asap cair ( <i>Quality of liquid smoke</i> )
pH	1,5 – 3,7
Kadar Asam ( <i>Acid content</i> ), %	1 – 18
Berat jenis, g/ml	>1.0005
Fenol ( <i>Phenol</i> ),%	-
Warna ( <i>Color</i> )	Kuning – Kecoklatan Merah Pucat – Coklat Kemerahan
Transparansi	Tidak keruh
Bau	-

(Sumber: Yatagai, 2002)

Pengujian dalam karakterisasi asap cair sebagai berikut:

- 1) Bobot jenis asap cair diuji menggunakan piknometer. Piknometer ditimbang terlebih dahulu menggunakan neraca analitik dengan ketelitian  $10^{-4}$ g. Kemudian ditambahkan akuades hingga penuh ke dalam piknometer lalu timbang. Cara yang sama dilakukan untuk menghitung bobot jenis asap cair. Perhitungan menggunakan rumus:

Volume piknometer (ml):

$$V = \frac{(\text{piknometer (g) + air}) - (\text{piknometer kosong (g)})}{\rho \text{ air}}$$

Bobot jenis (g/ml):

$$\rho = \frac{\text{bobot bahan (g)}}{\text{volume piknometer (ml)}}$$

- 2) Rendemen dihitung menggunakan data dari perhitungan bobot jenis menggunakan rumus:

$$\% \text{ rendemen} = \frac{\text{berat produk yang dihasilkan (g)}}{\text{berat sampel awal (g)}} \times 100\%$$

(Sumber: Mahdie dkk., 2020)

- 3) Pengujian warna dilakukan secara kualitatif dengan menggunakan aplikasi Android Colorimeter Lab Tools. Kamera yang digunakan menggunakan smartphone Samsung M12 48 MP. Gambar selanjutnya akan diproses pada aplikasi untuk menentukan warna dan panjang gelombangnya.



- 4) Pengujian pH dilakukan dengan menggunakan alat indikator pH universal. Ujung indikator yang terdapat beberapa lapis warna dicelupkan pada asap cair hingga warna pada indikator berubah. Kemudian warna pada indikator dibandingkan dengan baris warna yang terdapat pada kemasan alat untuk mendapatkan data angka pH.
- 5) Kadar fenol diuji secara kualitatif dengan menambahkan 5 tetes pereaksi  $\text{FeCl}_3$  1% ke dalam 8 ml asap cair pada tabung reaksi. Tabung dikocok beberapa saat hingga homogen, apabila asap cair mengandung fenol maka larutan akan berubah menjadi warna ungu atau coklat.
- 6) Kadar asam diuji dengan metode titrimetri. Buret yang akan digunakan dibilas terlebih dahulu sebanyak tiga kali dengan akuades untuk memastikan tidak ada sisa larutan NaOH yang tertinggal kemudian keringkan. Ke dalam buret ditambahkan larutan NaOH 0,1 N sampai menyentuh angka 1 pada buret. Larutan sampel 1 ml dilarutkan dengan aquadm sampai volume 10 ml lalu ditambahkan larutan indikator *Phenolphthalein* (PP) sebanyak tiga tetes. Selanjutnya dilakukan titrasi sampai larutan sampel berubah warna menjadi merah muda stabil dan dicatat volume NaOH yang berkurang. Perhitungan kadar asam dilakukan dengan menggunakan rumus:

$$\% \text{ asam} = \frac{\text{volume NaOH tertitrasi} \times \text{konsentrasi NaOH} \times \text{mr CH}_3\text{COOH}}{\text{bobot sampel} \times 1000} \times 100\%$$

Keterangan:

Kadar asam..... persen (%)

Volume NaOH tertitrasi..... mililiter (ml)

Konsentrasi NaOH..... normal (N)

Bobot sampel ..... gram (g)

Titrasi dilakukan secara *triplo* (tiga kali ulangan) agar hasil yang didapat lebih akurat. Hasil tiga ulangan titrasi kemudian dirata-ratakan untuk memperoleh kadar asam akhir.

- b. Identifikasi secara morfologi isolat patogen

Patogen *C. gloeosporioides* didapat dengan mengisolasi langsung dari buah yang terkena gejala antraknosa. Pengamatan dilakukan secara mikroskopis

dan makroskopis, yaitu dengan memperhatikan permukaan miselium, warna koloni, bentuk hifa, warna dan bentuk konidia. *Colletotrichum* diidentifikasi dengan mengacu pada Smith dan Black (1992); Watanabe (2002); Photita dkk. (2005); Gautam (2014); serta Rangkuti, Wiyono, dan Widodo (2017).

c. Daya hambat luas koloni *C. gloeosporioides*

Pengamatan dilakukan dengan cara menghitung diameter koloni jamur pada cawan petri setiap hari hingga 7 hari setelah inokulasi. Untuk menghitung daya hambat asap cair terhadap pertumbuhan jamur menggunakan rumus (Martinius Liswarni, dan Miska, 2010):

$$D = \frac{DK - DP}{DK} \times 100\%$$

Keterangan:

D = Daya hambat

DK = Diameter *C. gloeosporioides* kontrol

DP = Diameter *C. gloeosporioides* perlakuan

Setiap perlakuan diulang sebanyak tiga kali sehingga hasil perhitungan dari masing-masing perlakuan dirata-ratakan.

Cara pengukuran koloni jamur berdasarkan rumus berikut (Zuanif dan Despita, 2019):

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

Keterangan:

D = diameter jamur *C. gloeosporioides*

d1 = diameter vertikal koloni jamur *C. gloeosporioides*

d2 = diameter horizontal koloni jamur *C. gloeosporioides*

### 3.5.2 Parameter utama

a. Diameter luka pada buah

Diameter luka buah dihitung setiap hari dimulai pada 3 hari setelah inokulasi. Penentuan diameter luka buah didapatkan dari hasil rata-rata luka vertikal, horizontal, dan diagonal dari pusat infeksi. Terdapat dua pusat infeksi pada setiap buah, maka diameter dirata-ratakan untuk mendapatkan diameter

akhir. Data dianalisis menggunakan *analysis of varian* (ANOVA) dan uji lanjut jarak berganda Duncan.

b. Daya hambat asap cair terhadap perkembangan penyakit

Daya hambat asap cair didapatkan dengan menggunakan rumus yang sama pada perhitungan daya hambat secara *in vitro*, yaitu dengan melihat perbandingan diameter lesi yang terjadi pada buah yang mendapat perlakuan dengan buah tanpa perlakuan asap cair.