

## **BAB III**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

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

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Pertanian Universitas Siliwangi Tasikmalaya. Adapun waktu penelitian dimulai bulan Januari sampai Februari 2023.

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

Alat yang digunakan untuk penelitian ini adalah autoklaf, *laminar air flow*, neraca analitik, *hot plate*, *magnetic stirrer*, hemasitometer, bunsen, pinset, gunting, gelas ukur, cawan petri, tabung reaksi, rak tabung reaksi, jarum ose, erlenmeyer, mikropipet, *object glass*, *cover glass*, mikroskop, *sprayer*, *cork borer*, jarum steril, wadah plastik, tisu, plastik wrap, aluminium foil, kertas cakram, kertas label, penggaris, korek dan alat tulis.

Adapun bahan yang digunakan adalah buah cabai yang terserang antraknosa, buah cabai merah sehat, isolat bakteri (*Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas fluorescens*), media PDA (*Potato Dextrose Agar*), media NA (*Nutrient Agar*), media NB (*Nutrient Broth*), media PCA (*Plate Count Agar*), media SMA (*Skim Milk Agar*), alkohol, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%, bayclin, dan akuades.

#### **3.3 Metode penelitian**

Penelitian ini menggunakan metode deskriptif dan eksperimental dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Percobaan terdiri dari 4 perlakuan dan diulang sebanyak 6 kali, sehingga jumlah keseluruhan terdiri dari 24 plot percobaan. Metode deskriptif digunakan untuk isolasi dan identifikasi patogen serta menguji aktivitas bakteri, sedangkan metode eksperimen digunakan untuk menguji antagonis bakteri terhadap patogen. Aplikasi perlakuan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

A = Kontrol (tanpa inokulasi bakteri)

B = *Bacillus subtilis*

C = *Pseudomonas fluorescens*

D = *Bacillus subtilis* + *Pseudomonas fluorescens*

Model linier rancangan acak lengkap adalah sebagai berikut (Gomez dan Gomez, 2010):

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

Keterangan:

$Y_{ij}$  : nilai pengamatan dari kelompok ke-j yang mendapat perlakuan ke-i

$\mu$  : nilai tengah umum

$\tau_i$  : pengaruh perlakuan ke-i

$\varepsilon_{ij}$  : galat percobaan pada kelompok ke-j dalam perlakuan ke-i

Data yang diperoleh dari pengamatan masing-masing perlakuan diolah secara statistik menggunakan sidik ragam yang disajikan pada Tabel 1 dan diambil keputusan sesuai Tabel 2.

Tabel 1. Analisis sidik ragam

Sumber ragam	db	JK	KT	Fhitung	F.05
Perlakuan	3	$\frac{\sum_{i=1}^t T^2}{r}$	JKP/dbP	KTP/KTG	
Galat	20	$JK_u - JK_p$	JKG/dbG		
Total	23	$\sum_{i=1}^n X_i^2 - FK$			

Sumber: Gomez dan Gomez (2010)

Tabel 2. Kaidah pengambilan keputusan

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

Sumber: Gomez dan Gomez (2010)

Jika hasil uji F dinyatakan berbeda nyata, maka dilakukan uji lanjut dengan uji jarak berganda Duncan pada taraf nyata 5% dengan rumus sebagai berikut:

$$LSR = SSR(\alpha, db_g, p) \cdot S\bar{x}$$

$$S\bar{x} = \sqrt{\frac{KT \text{ Galat}}{r}}$$

Keterangan:

LSR : *Least Significant Range*

SSR : *Significant Studentized Range*

$\alpha$  : Taraf nyata

dbg : Derajat bebas galat

$p$  : Range (perlakuan)

$S\bar{x}$  : Galat baku rata-rata (*Standard error*)

$r$  : ulangan

KTG : Kuadrat tengah galat

### 3.4 Pelaksanaan penelitian

#### 3.4.1 Uji deskriptif

##### a. Sterilisasi alat

Alat-alat laboratorium yang akan digunakan, dilakukan sterilisasi dengan tujuan untuk menghindari adanya kontaminasi. Sterilisasi dilakukan dengan metode pemanasan basah menggunakan autoklaf pada suhu 121°C yang memiliki tekanan 0,7 kg/cm<sup>2</sup> dalam waktu 15 menit.

##### b. Pembuatan media

Media yang digunakan adalah NA (*Nutrient Agar*) dan NB (*Nutrient Broth*), PDA (*Potato Dextrose Agar*) dan PCA (*Plate Count Agar*). Adapun pembuatannya yaitu dengan cara menimbang kebutuhan bahan dan melarutkannya dalam aquades, kemudian dipanaskan menggunakan *hot plate*. Setelah semua larut, kemudian media disterilisasi menggunakan autoklaf. Media dituang ke dalam cawan petri.

##### c. Isolasi dan identifikasi patogen *Colletotrichum gloeosporioides*

Isolasi *C. gloeosporioides* dilakukan dengan mencari buah cabai merah yang diduga terserang antraknosa. Buah yang menunjukkan gejala penyakit dipotong-potong dengan ukuran  $\pm 0,5$  cm x 0,5 cm. Kemudian disterilisasi menggunakan bayclin, lalu direndam dengan alkohol dan dibilas dengan akuades sebanyak 2 kali. Setelah itu dikeringkan dengan tisu steril, selanjutnya ditumbuhkan dalam media PDA dan diinkubasi selama 3 sampai 4 hari. Hasil inkubasi ini kemudian diidentifikasi, dimurnikan dan diperbanyak.

Identifikasi patogen dilakukan secara makroskopis dan mikroskopis. Identifikasi secara makroskopis dilakukan dengan mengamati bentuk dan warna koloni jamur pada media PDA. Identifikasi mikroskopis diamati dengan menggunakan mikroskop dan dicocokkan dengan pustaka.

Jamur patogen yang telah teridentifikasi *Colletotrichum gloeosporioides* diperbanyak dengan mengambil 1 *cork borer* dari media isolasi ke media PDA yang baru pada cawan petri.

d. Perbanyak bakteri

Isolat bakteri *Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas fluorescens* diperoleh dari Balai Perlindungan Tanaman Pangan dan Hortikultura (BPTPH) Tasikmalaya. Kedua bakteri masing-masing ditumbuhkan pada media NA baru dan diinkubasi selama 24-48 jam.

e. Uji aktivitas bakteri

1. Uji aktivitas enzim protease

Uji aktivitas enzim protease dilakukan dengan menginokulasi isolat bakteri ke media SMA dan diinkubasi selama 24 sampai 48 jam. Adanya aktivitas enzim protease ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekitar koloni bakteri. Zona bening yang dihasilkan merupakan hasil hidrolisis substrat protein yang terdapat pada media SMA oleh enzim protease yang dihasilkan oleh isolat bakteri. Kemudian dilakukan pengukuran aktivitas enzim protease dengan cara diameter zona bening dikurangi diameter koloni bakteri.

2. Uji aktivitas katalase

Uji katalase dilakukan dengan mengambil satu ose kultur bakteri dan diletakkan pada *object glass*, kemudian beri satu tetes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%. Adanya aktivitas katalase ditunjukkan dengan terbentuknya gelembung gas sebagai hasil reaksi antara H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dengan bakteri yang memiliki aktivitas katalase. Gelembung gas yang terbentuk menandakan adanya oksigen yang dihasilkan setelah H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dipecah oleh isolat bakteri.

### 3.4.2 Uji Eksperimen

#### a. Pembuatan suspensi bakteri dan patogen

Suspensi bakteri dibuat dengan cara bakteri ditumbuhkan pada media NB (*Nutrient Broth*) dan dikocok dengan menggunakan *Shaker incubator*. Kemudian suspensi dihitung kerapatannya dengan metode cawan hitung atau *Total Plate Count* (TPC). Bila terlalu padat jumlahnya, dilakukan pengenceran sehingga diperoleh kerapatan  $10^6$  cfu (*Colony Forming Unit*)/ml.

Suspensi patogen dibuat dengan cara biakan jamur diberi aquades steril sebanyak 10 ml, kemudian digosok-gosok dengan jarum ose untuk melepas konidianya. Kemudian kerapatannya dihitung dengan menggunakan *haemocytometer*. Bila terlalu padat jumlahnya, dilakukan pengenceran sehingga diperoleh kepadatan  $10^5$  spora/ml.

#### b. Uji *in vitro*

Uji antagonis *in vitro* dilakukan pada media PDA dengan menggunakan uji ganda (*dual culture*). Bakteri sesuai perlakuan ditetaskan pada kertas cakram ( $\theta \pm 6$  mm) sebanyak 10 mikroliter dengan kerapatan  $10^6$  cfu (*Colony Forming Unit*)/ml dan diletakkan pada media dengan jarak 3 cm dari tepi cawan petri. Jamur *C. gloeosporioides* ( $\theta \pm 5$  mm) diinokulasikan dengan jarak 3 cm dari kertas cakram satu hari setelah inokulasi bakteri.

#### c. Uji *in vivo* pada buah cabai

Uji dilakukan dengan menyiapkan buah cabai sehat, lalu dicuci dibawah air mengalir, setelah itu dilap menggunakan alkohol 70% kemudian cuci dengan aquades dan keringkan menggunakan tisu steril. Kemudian cabai dicelupkan dalam suspensi bakteri dengan kerapatan  $10^6$  cfu (*Colony Forming Unit*)/ml, letakkan di dalam wadah plastik tertutup yang dialasi tisu basah dan pada bagian tengah cabai dilukai dengan satu tusukan menggunakan jarum steril. Setelah itu suspensi patogen *C. gloeosporioides* dengan konsentrasi  $10^5$  spora/ml ditetaskan sebanyak 5 mikroliter pada titik luka, kemudian wadah ditutup rapat dan inkubasi pada suhu kamar. Masing-masing percobaan tiap ulangan dilakukan pada 5 buah cabai yang disimpan dalam satu wadah.

### 3.5 Pengamatan

#### 3.5.1 Pengamatan penunjang

Pengamatan penunjang adalah pengamatan yang dilakukan tanpa diuji secara statistik untuk menunjang data penelitian. Variabel tersebut yaitu isolasi dan identifikasi patogen *C. gloeosporioides*, uji aktivitas bakteri (uji enzim protease dan uji aktivitas katalase).

#### 3.5.2 Pengamatan utama

Pengamatan utama adalah pengamatan yang dilakukan pada setiap variabel yang datanya diuji secara statistik dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh dari setiap perlakuan yang diuji. Adapun parameter yang diamati adalah:

##### 1. Daya hambat bakteri terhadap patogen

Daya hambat diamati dari uji antagonis secara *in vitro* dengan mengukur pertumbuhan diameter koloni patogen pada hari kelima dan ketujuh setelah inokulasi. Pengukuran diameter koloni jamur menggunakan aplikasi ImageJ. Persentase penghambatan pertumbuhan dihitung dengan rumus sebagai berikut (Khairul, Montong dan Ratulangi, 2018):

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

Keterangan:

PA : Persentase antagonis (%)

D1 : Diameter koloni patogen sebagai kontrol

D2 : Diameter koloni patogen pada perlakuan

##### 2. Serangan penyakit

###### a. Luas serangan

Perhitungan dilakukan dengan cara menggambar luka yang ada pada buah cabai di plastik, lalu gambar ditimbang dan hasilnya dikonversi pada satuan luas. Pengamatan dilakukan pada hari ke 7 atau akhir pengamatan.

###### b. Susut bobot buah

Susut bobot buah dilakukan dengan menimbang dan menghitung selisih bobot buah cabai pada awal serta akhir pengamatan.

c. Keparahan penyakit

Intensitas penyakit didapat dari pengujian pada buah cabai dan dihitung dengan menggunakan rumus dari Wibawa, Suprpta dan Khalimi (2019) sebagai berikut:

$$DS = \frac{\sum(n \times V)}{Z \times N} \times 100\%$$

Keterangan:

DS : *Diseases severity* atau keparahan penyakit (%)

n : Jumlah buah cabai pada tiap skor yang diamati

V : Skor untuk tiap gejala penyakit yang diamati

Z : Skor tertinggi

N : Jumlah keseluruhan dari buah yang diamati

Skor untuk intensitas penyakit mengikuti kategori gejala serangan pada Tabel

3.

Tabel 3. Penentuan skor gejala serangan penyakit pada buah cabai

Skor	Tingkat resistensi	Deskripsi gejala
0	HR <i>Highly resistant</i> (sangat tahan)	Tidak ada infeksi
1	R <i>Resistant</i> (tahan)	1-2% area buah menunjukkan nekrotik atau sebagian membusuk/ basah seperti terendam air yang melingkupi situs infeksi
3	MR <i>Moderately resistant</i> (agak tahan)	> 2-5% area buah menunjukkan nekrotik, mungkin ada <i>acervuli</i> (tubuh buah), atau membusuk/basah seperti terendam air hingga 5% dari permukaan buah
5	MS <i>Moderately susceptible</i> (agak rentan)	> 5-15% area buah menunjukkan nekrotik, mungkin ada <i>acervuli</i> (tubuh buah), atau membusuk/basah seperti terendam air hingga 25% dari permukaan buah
7	S <i>Susceptible</i> (rentan)	> 15-25% area buah menunjukkan nekrotik dengan <i>acervuli</i> (tubuh buah)
9	HS <i>Highly susceptible</i> (sangat rentan)	> 25% area buah menunjukkan nekrotik, seringkali melingkupi buah, banyak sekali <i>acervuli</i>

Sumber: Gniffke (2011); Hamidsson, Suwandi dan Effendy (2018)



Gambar 3. Indeks keparahan penyakit antraknosa pada buah cabai  
(Sumber: Hamidson dkk., 2018)