

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Tempat dan waktu

Percobaan ini dilakukan di Laboratorium Dasar, Laboratorium Kultur Jaringan, Laboratorium Produksi Tanaman Fakultas Pertanian Universitas Siliwangi. Waktu pelaksanaan dimulai pada bulan November 2022 sampai Januari 2023.

3.2. Alat dan bahan

Alat yang digunakan dalam percobaan ini berupa hemositometer, mikroskop elektrik, *petridish disposable*, cawan petri, *laminar air flow* (LAF), baki, alat gelas, pipet ukur, pipet mikro, neraca analitik, *magnetic stirrer*, tempat pengeringan, termometer, hygrometer, alat tulis, alat ukur penggaris, alat ukur meteran, kertas cakram, hot plate, piknometer, autoklaf dan alat pirolisis.

Bahan yang digunakan dalam percobaan adalah buah alpukat mentega dengan bobot 154,52 g sampai 214,72 g dari petani di Kp. Cipari Kecamatan Sukaraja Kabupaten Tasikmalaya, limbah tongkol jagung, potato dextrose agar (PDA), Aqua Demineralisata, NaOCl, tween 20 (polisorbate 20), phenolphthalein, NaOH, alkohol, FeCl₃ dan biakan patogen murni *L. theobromae*.

3.3. Metode penelitian

3.3.1. Percobaan *in vitro*

Metode yang dilakukan adalah penelitian eksperimental dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL), terdiri dari 6 konsentrasi asap cair dalam media agar dan diulang sebanyak 4 kali. Perlakuan pemberian asap cair pada media agar dilakukan dengan menggunakan konsentrasi sebagai berikut :

a₀ = tanpa penambahan asap cair (kontrol)

a₁ = konsentrasi asap cair 2%

a₂ = konsentrasi asap cair 4%

a₃ = konsentrasi asap cair 6%

a₄ = konsentrasi asap cair 8%

a₅ = konsentrasi asap cair 10%

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

Tabel 1. Sidik ragam (RAL)

Sumber ragam	Db	JK	KT	F hit.	F tab. 5%
Perlakuan	5	$\sum X^2 - FK$	JK_p/db_p	KT_p/KT_G	2,71
Galat	18	$JK_T - JK_p$	JK_G/db_G		
Total	23	$\sum T^2/r - FK$			

Tabel 2. Kaidah pengambilan keputusan

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

Sumber: Gomez dan Gomez (2007)

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

$$LSR = x \text{ SSR.}$$

Nilai dapat dicari dengan rumus sebagai berikut :

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

Keterangan :

LSR = Least Significant Ranges;

SSR = Studentized Significant Ranges

S_x = galat baku rata-rata

KT Galat = kuadrat tengah galat

r = jumlah ulangan.

(Sumber: Gomez dan Gomez, 2007)

3.3.2 Percobaan in vivo

Percobaan *in vivo* merupakan kelanjutan dari uji *in vitro*, yaitu dosis yang dapat menghambat pertumbuhan jamur 100% dijadikan sebagai perlakuan dosis *in vivo*. Dosis yang digunakan diambil berdasarkan hasil uji *in vitro* dengan penghambatan 100% kemudian dikali 10. Ada dua taraf perlakuan yaitu perlakuan asap cair dan perlakuan tanpa asap cair, masing-masing 20 kali ulangan sehingga diperoleh 40 unit percobaan.

Pengujian *in vivo* dilakukan dengan Uji-T Tidak Berpasangan (Paired T-test) yaitu menguji buah alpukat dengan perlakuan asap cair dengan buah alpukat kontrol tanpa asap cair.

Tahap penelitian ini diaplikasikan dalam rancangan percobaan petak berpasangan terhadap dua penelitian : (i) k_0 : kontrol/tanpa perlakuan ; dan (ii) k_1 : dengan perlakuan asap cair. Percobaan tersebut dilakukan 20 kali ulangan.

Tabel 3. Penempatan kontrol (k_0) dan perlakuan asap cair (k_1) pada denah percobaan. Lengkapnya pada Lampiran 2

1	2	3	4	n20
k_1	k_0	k_1	k_1	k_0
k_0	k_1	k_0	k_0	k_1

Keterangan: 1,2,3.....20 = nomor ulangan.

Apabila data hasil pengamatan terdapat perbedaan yang nyata maka dilakukan uji LSD (*least significance different*) (Montgomery, 2013)

$$LSD = \frac{t_{\alpha}}{2} \cdot N - a \sqrt{\frac{2MSE}{n}}$$

Keterangan:

LSD = least significance different

t_{α} = tabel distribusi t dengan tingkat signifikansi

α N-a = db galat

MSE = Mean Squared Error

n = jumlah sampel

(Sumber. Montgomery, 2013)

3.4. Prosedur percobaan

3.4.1. Pembuatan asap cair

a) Proses pirolisis

Tongkol jagung dibersihkan dari kotoran, kemudian dipecah menjadi beberapa bagian agar luas pembakaran menjadi lebih besar dan pembakaran berlangsung lebih cepat. Tongkol jagung selanjutnya dikeringkan di bawah sinar matahari hingga kadar airnya menurun. Sebanyak 6 kg tongkol jagung kering dimasukkan ke dalam reaktor pirolisis. Tabung reaktor yang sudah diisi tongkol jagung ditutup rapat menggunakan tutup yang memiliki saluran keluarnya asap yang menuju ke kondensor. Suhu maksimal pada pembakaran tongkol jagung 400°C. Hasil kondensasi berupa asap cair yang masih mengandung tar dan *bio oil* kemudian ditampung dalam wadah dan diukur volumenya. Asap cair crude yang diperoleh selanjutnya didestilasi pada suhu 100 sampai 110°C hingga volume yang tersisa sebanyak 40%. Destilasi yang dihasilkan kemudian dilakukan destilasi kembali dengan suhu dan langkah yang sama. Hasil distilasi yang kedua kali memiliki tingkat kemurnian yang lebih tinggi dibandingkan asap cair yang hanya didistilasi satu kali.

b) Uji sifat fisika kimia asap cair

Uji sifat fisika asap cair terdiri dari rendaman, berat jenis asap cair menggunakan piknometer, warna dan transparansi. Pengukuran berjenis dilakukan menggunakan piknometer dengan langkah menimbang bobot piknometer kosong dalam neraca analitik. Selanjutnya piknometer yang berisi asap cair ditimbang bobotnya (Noor dkk., 2006)

Uji sifat kimia yang dilakukan ialah total asam tertitrasi, total fenol dan pH. Pengujian kadar asam dilakukan dengan metode titrimetri (Noor dkk., 2016). Penentuan total asam tertitrasi dalam asap cair dilakukan dengan mengencerkan 1 ml asap cair dalam 10 ml aqua DM lalu ditambahkan 3 tetes indikator phenolphthalein. Selanjutnya dilakukan titrasi dengan menggunakan NaOH 0.1 N. Titrasi dihentikan ketika telah terbentuk warna merah keunguan dan stabil.

Pengujian fenol menggunakan larutan $FeCl_3$ dengan meneteskan sebanyak 5 tetes pada larutan asap cair lalu dihomogenkan hingga berubah warna menjadi coklat.

3.4.2. Percobaan *in vitro*

1. Sterilisasi alat

Alat dan bahan yang tahan panas disterilisasi menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C selama 20 menit untuk alat dan 15 menit untuk media PDA, sedangkan untuk alat yang tidak panas disterilisasi dengan menggunakan alkohol 70%.

2. Pembuatan media PDA

Media PDA instan sebanyak 20 g dimasukkan ke dalam erlenmeyer bersama dengan aqua DM sebanyak 500 ml. Mulut erlenmeyer yang berisi media ditutup menggunakan *aluminium foil* kemudian dihomogenkan menggunakan *hot plate* dan *magnetic stirrer* dengan suhu 100°C sampai homogen. Kemudian media yang telah homogen dan mendidih disterilisasi menggunakan autoklaf selama 20 menit pada suhu 121°C.

3. Persiapan dan Identifikasi jamur *Lasiodiplodia theobromae* Pat.

Isolat jamur *L. theobromae*, jamur ditanam dalam media PDA dan diinkubasi pada suhu 25°C. Identifikasi mikroskopis isolat dilakukan dengan menggunakan alat indera penglihatan, sedangkan untuk mikroskopis menggunakan mikroskop elektrik. Pengamatan mikroskopis diawali dengan mengambil sedikit bagian miselium yang tumbuh, lalu disimpan dalam kaca objek kemudian ditetesi aqua dm. Amati preparat tersebut pada perbesaran 10x dan 40x.

4. Pemurnian dan panen isolat *Lasiodiplodia theobromae* Pat.

Pemurnian dilakukan dengan memindahkan sepotong kecil koloni yang telah terealisasi kemudian dipindahkan ke dalam media kultur PDA yang steril. Kemudian dilakukan untuk menghindari tumbuhnya patogen selain *L. theobromae*. Konidia dapat dipanen setelah berumur 7 sampai 10 hari. Pemanenan dilakukan dengan menambahkan air steril yang mengandung 0.05% Tween-20, lalu disebar secara halus menggunakan *loop* steril dan dikondisikan pada konsentrasi konidia/ml (Wang dkk, 2020). Pengukuran konsentrasi konidia/ml dilakukan menggunakan *hemocytometer* di laboratorium.

5. Uji aktivitas anti jamur asap cair secara *in vitro*

Pengujian aktivitas anti jamur asap cair terhadap pertumbuhan *L. theobromae* dilakukan pada media PDA. Hasil pengamatan dari uji *in vitro* akan

dijadikan penentuan taraf konsentrasi pada uji *in vivo*. Pengujian ini dilakukan dengan cara menambahkan asap cair ke dalam media PDA sesuai dengan konsentrasi yang diharapkan. Konsentrasi yang digunakan dalam pengujian *in vitro* adalah 0%, 2%, 4%, 6%, 8% dan 10%.

Pengujian diawali dengan memasukkan asap cair sebanyak 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1 ml ke dalam cawan petri, tambahkan media PDA steril sampai volume ± 10 ml lalu dihomogenkan. Langkah selanjutnya adalah memasukkan sebanyak 10 μL suspensi konidia dengan kerapatan 10^5 mL^{-1} di bagian tengah media. Media diinkubasi pada suhu 25°C . Aktivitas pencampuran tersebut dilakukan di dalam *Laminar Air Flow Cabinet*. Pengamatan dilakukan setiap hari dengan menghitung diameter koloni yang terbentuk. Pengukuran dilakukan dengan menggunakan alat ukur penggaris dengan titik tengah yang sudah ditentukan sebelumnya. Pengamatan dihentikan apabila miselium yang tumbuh sudah memenuhi cawan petri.

3.4.3. Percobaan *in vivo*

1. Persiapan Buah Alpukat

Buah diperoleh berada pada fase matang dan permukaan berwarna hijau, buah disortir berdasarkan ukuran dan kondisi fisik permukaan yang baik. Penelitian ini terdiri dari 2 perlakuan dan setiap perlakuan terdapat 1 buah alpukat. Sebelum aplikasi patogen, permukaan buah direndam pada desinfektan NaOCl 2% selama 3 menit, kemudian dibilas menggunakan air mengalir dan dikering anginkan.

2. Uji aktivitas anti jamur asap cair secara *in vivo*

Larutan asap cair untuk uji *in vitro* dibuat dengan konsentrasi larutan 0%, 2%, 4%, 6% 8% dan 10%, dengan konsentrasi 0 sebagai kontrol yaitu 0% asap cair. Untuk menentukan konsentrasi dalam uji *in vivo* diambil dari perlakuan konsentrasi yang memiliki penghambatan 100% pada hasil uji *in vitro* dikali 10, sehingga penghambatan 100% pada uji *in vitro* didapatkan pada konsentrasi 4%, jadi konsentrasi perlakuan *in vivo* yang dipakai 40%. Volume larutan asap cair dibuat sebanyak 500 ml.

Pengamatan aktivitas anti jamur asap cair *in vivo* dilakukan pada buah alpukat segar. Buah alpukat yang telah dipreparasi lalu direndam ke dalam larutan

asap cair selama 60 detik kemudian dikering anginkan. Buah yang sudah dikeringkan ditetesi penyakit dari bagian pangkal buah. Larutan konidia jamur diinokulasi dengan konsentrasi 10^5 sebanyak 10 μ L kemudian dikering anginkan.

Buah yang sudah mendapat perlakuan disimpan dalam kotak plastik pada suhu 25°C dan kelembaban 80%. Pengamatan Intensitas serangan dan diameter lesi buah yang terjadi dilakukan pada 2 HSI hingga hari ke 7 HSI sedangkan untuk susut bobot buah dilakukan pada 7 HSI .

3.5 Parameter yang diamati

3.5.1. Parameter penunjang

Pengamatan penunjang adalah pengamatan yang dilakukan terhadap variabel yang datanya tidak diuji secara statistik untuk menunjang data penelitian dan mengetahui kemungkinan pengaruh lain dari luar perlakuan. Variabel dalam parameter penunjang diantaranya:

a. Karakteristik asap cair tongkol jagung

Karakteristik asap cair yang diuji meliputi rendemen, berat jenis, warna, transparansi, pH, kadar asam dan kadar fenol. Rendemen asap cair dihitung dengan menggunakan rumus (Jaya, Sandri, dan Setiawan, 2019):

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

Bobot jenis asap cair dapat dihitung dengan memasukkan hasil pengukuran persamaan berikut :

$$\text{Berat jenis (g/cm}^3\text{)} = \frac{Bc - Bp}{\text{volume piknometer}}$$

Keterangan :

Bc = Bobot piknometer + contoh (g)

Bp + Bobot piknometer kosong (g)

Nilai total asam tertitrasi dapat dihitung berdasarkan persamaan berikut (Setiawati dan Yunianta, 2018):

$$\text{Total asam (\%)} = \frac{\text{volume NaOH} \times \text{Normalitas NaOH} \times \text{BM Asam Asetat} \times 100\%}{\text{Berat sampel} \times 1000}$$

b. Identifikasi isolat *Lasiodiplodia theobromae* Pat.

Identifikasi dilakukan untuk memastikan bahwa jamur yang ditemukan merupakan jamur *L. theobromae*. Pengamatan mikroskopis dilakukan dengan mengamati pertumbuhan koloni jamur pada cawan petri meliputi warna koloni,

bentuk konidia, warna konidia. Pengamatan secara mikroskopis dengan mikroskop elektrik untuk mengamati bentuk konidia dan konidiofor.

3.5.2. Parameter utama

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

1. Pengamatan *in vitro*

a. Pertumbuhan miselium

Pengamatan ini untuk melihat perkembangan patogen dalam PDA yang sudah diberi perlakuan, 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 kedua setelah inokulasi.

b. Daya hambat asap cair

Untuk melihat konsentrasi paling efektif untuk menghambat pertumbuhan *L. theobromae*, dengan menggunakan alat ukur untuk mengukur diameter pertumbuhan miselium. Nilai indeks anti jamur diperoleh dari persamaan berikut (Hartati, Meliansyah dan Puspasari., 2013 ; Suresh *et al.*, 2019)

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

Keterangan :

DH : Daya hambat (%)

2. Pengamatan *in vivo*

a. 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.

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

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 persentase tanaman yang terinfeksi, seperti pada Tabel 4.

Tabel 4. 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)

b. Diameter lesi buah

Pengamatan diameter luka dilakukan dengan menggunakan alat ukur meteran sejak 2 hari setelah inokulasi. Data diameter luka buah didapatkan dari hasil rata-rata diameter luka vertikal dan horizontal dari pusat infeksi setiap buahnya dikurangi luka awal.

c. Susut bobot buah

Pengamatan susut bobot buah ini dilakukan untuk menghitung kehilangan bobot buah akibat serangan penyakit *L. theobromae*, pengamatan dilakukan dengan menimbang buah alpukat pada hari ke 1 dan hari ke 7 menggunakan timbangan analitik, setelah itu dihitung selisih berat buahnya.