

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

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

Penelitian ini dilaksanakan dari bulan Agustus sampai dengan bulan Desember tahun 2022 di Laboratorium Proteksi Tanaman, Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Pertanian Universitas Siliwangi, Kota Tasikmalaya, serta di tempat tinggal penulis di kabupaten Ciamis.

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

Alat yang digunakan untuk penelitian ini diantaranya adalah tabung pirolisis, alat distilasi, gelas ukur, erlenmeyer, kompor, autoklaf, baki plastik, plastik *wrap*, cawan petri, hemocytometer, kertas cakram, mikroskop, penggaris, timbangan, mikropipet, dan jarum ose.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah media *Potato dextrose Agar* (PDA) Merck, Aquades, biakan murni *Rhizopus stolonifer* dari *Indonesian culture collection* (InaCC), tongkol jagung, buah pepaya dari Cimaragas, *tween-20*, NaOH 0.1, sodium hypochlorite 10%, alkohol 70%, dan FeCl<sub>3</sub> 1%.

#### **3.3 Metode penelitian**

##### **3.3.1 Rancangan percobaan *in vitro***

Percobaan *in vitro* menggunakan metode rancangan acak lengkap (RAL), terdiri dari 6 taraf perlakuan asap cair dan 4 ulangan, sehingga diperoleh 24 plot percobaan. Adapun taraf perlakuannya tersebut sebagai berikut:

K<sub>0</sub> = 0% asap cair tongkol jagung (kontrol)

K<sub>1</sub> = 3% asap cair tongkol jagung

K<sub>2</sub> = 4% asap cair tongkol jagung

K<sub>3</sub> = 5% asap cair tongkol jagung

K<sub>4</sub> = 6% asap cair tongkol jagung

K<sub>5</sub> = 7% asap cair tongkol jagung

Berdasarkan rancangan yang digunakan, maka dikemukakan model linier sebagai berikut:

$$X_{ij} = \mu + t_i + r_j + \varepsilon_{ij}$$

Keterangan:

$X_{ij}$  = Hasil pengamatan dari perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

$\mu$  = Rata-rata umum

$t_i$  = Pengaruh perlakuan ke-i

$r_j$  = Pengaruh perlakuan ke-j

$\varepsilon_{ij}$  = Pengaruh galat percobaan terhadap perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

Berdasarkan model linier di atas, data hasil penelitian dianalisis untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap variabel yang diamati dengan sidik ragam dan kaidah pengambilan keputusan berdasarkan uji F.

Tabel 1. Analisis sidik ragam (Anova)

Sumber Ragam	DB	JK	KT	Fhit	Ftab(0,05)
Ulangan (U)	3	$\frac{\sum x_i^2}{j} - FK$	$\frac{JKU}{DBU}$	$\frac{KTU}{KTG}$	3,29
Perlakuan (P)	5	$\frac{\sum x_j^2}{i} - FK$	$\frac{JKP}{DBP}$	$\frac{KTP}{KTG}$	2,90
Galat (G)	15	JK (T) – JK (U) – JK (P)	$\frac{JKG}{DBG}$		
Total (T)	23	$\sum ij^2 - FK$			

Tabel 2. Kaidah pengambilan keputusan uji-F

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

Jika dari uji F terdapat berbeda nyata, maka dilakukan uji lanjut berganda Duncan pada taraf 5 % dengan rumus  $LSR = S_x \times SSR$ . Nilai  $S_x$  dapat dicari dengan rumus sebagai berikut:

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

Keterangan:

LSR = Least Significant Ranger

SSR = Studentized significant ranger

Sx = Galat baku rata-rata

KT galat= Kuadrat tengah galat

R = Jumlah ulangan (sumber: Gomez dan Gomez, 2007)

### 3.3.2 Rancangan percobaan *in vivo*

Percobaan *in vivo* merupakan kelanjutan dari uji *in vitro*, yaitu konsentrasi yang dapat menghambat pertumbuhan jamur 100% dijadikan sebagai perlakuan konsentrasi *in vivo*. Ada dua taraf perlakuan yaitu perlakuan asap cair dan perlakuan kontrol tanpa asap cair, masing-masing 20 buah sampel sehingga diperoleh 40 unit percobaan. Pengujian *in vivo* dianalisis menggunakan uji-t tidak berpasangan, yaitu menguji perbandingan buah pepaya dengan perlakuan asap cair dan buah pepaya kontrol tanpa asap cair.

Tabel 3. Kaidah pengambilan keputusan uji-t tidak berpasangan

Hasil analisis	Hipotesis	Keterangan
$T_{hit} \leq T_{0,05}$	$H_0$	Tidak ada perbedaan hasil antara buah pepaya kontrol dan perendaman asap cair 50%
$T_{hit} > T_{0,05}$	$H_1$	Ada perbedaan hasil antara buah pepaya kontrol dan perendaman asap cair 50%

## 3.4 Prosedur penelitian

### 3.4.1 Pembuatan asap cair tongkol jagung

Tongkol jagung sebanyak 10 kg dibersihkan dari kotoran kemudian dijemur dibawah sinar matahari sampai kadar airnya dibawah 20%, selanjutnya tongkol jagung dipotong 2 sampai 3 cm agar memudahkan dalam proses pembakaran dan proses pirolisis dapat berjalan lebih cepat. Tongkol jagung yang telah kering dimasukkan kedalam klin pirolisis dengan kapasitas 1 kg dan pembakaran pada suhu 350°C selama 60 menit.

Hasil kondensasi berupa asap cair yang mengandung ter dan *bio-oil*. Asap cair kemudian didistilasi pada suhu 100°C (Darmaji, 2002). Proses distilasi asap cair

dapat menghilangkan senyawa yang tidak diinginkan yaitu senyawa ter dan polisiklik aromatik hidrokarbon (Gorbatov dkk., 1971, *dalam* Darmadji, 2002).

Distilasi dilakukan dua kali, pertama untuk mengendapkan asap cair *grade 2*, yaitu asap cair yang masih mengandung sedikit ter dan *bio-oil*, dengan ciri asap cair berwarna coklat. Kemudian asap cair didistilasi kembali untuk mendapatkan asap cair *grade 1* yaitu asap cair yang sudah tidak mengandung ter dan *bio-oil*, dengan asap cair berwarna lebih jernih keemasan.

#### 3.4.2 Sterilisasi alat

Alat yang akan digunakan disterilisasi terlebih dahulu dengan cara dicuci menggunakan sabun pada air yang mengalir sampai bersih kemudian dikeringkan. Setelah itu, alat dibungkus dengan kertas dan plastik tahan panas. Alat yang sudah dibungkus disterilisasi menggunakan uap panas bertekanan tinggi di dalam autoklaf dengan suhu 121°C selama 20 menit. Alat yang tidak tahan panas disterilisasi menggunakan alkohol 70%.

#### 3.4.3 Pembuatan media kultur

Media kultur yang digunakan adalah media *Potato Dextro Agar*. Media dibuat dengan cara mencampurkan 39 g PDA kedalam 1-liter aquades kemudian dihomogenkan dan dipanaskan hingga mendidih. Media yang homogen dan mendidih disterilisasikan menggunakan autoklaf selama 20 menit pada suhu 121°C.

#### 3.4.4 Persiapan dan identifikasi jamur *Rhizopus stolonifer*

Isolat jamur didapatkan dari biakan murni *Rhizopus stolonifer*. Jamur ditanam pada media PDA dan diinkubasi pada suhu 25°C. Identifikasi jamur dilakukan dengan menggunakan indera penglihatan, sedangkan secara mikroskopis menggunakan mikroskop elektrik. Pengamatan mikroskopis diawali dengan mengambil sedikit bagian miselium yang tumbuh, lalu disimpan dalam kaca objek kemudian ditetesi aquades. Amati preparat pada pembesaran 10× dan 40×.

#### 3.4.5 Pembuatan suspensi jamur *Rhizopus stolonifer*

Pembuatan suspensi jamur dengan menambahkan aquades steril dengan 0,05% Tween-20. Biakan jamur yang telah ditumbuhkan selama satu minggu

dipanen sporanya dengan menambahkan larutan 0.05% tween-20 sebanyak 10 ml. setelah itu diatur sporanya hingga  $10^6$  konidia/ml menggunakan hemocytometer.

#### 3.4.6 Uji aktivitas anti jamur asap cair secara *in vitro*

Pengujian aktivitas anti jamur asap cair terhadap pertumbuhan *Rhizopus stolonifer* dilakukan pada media PDA mengacu pada penelitian Wang dkk., (2020). Tujuan dari pengujian ini untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh anti jamur asap cair tongkol jagung terhadap pertumbuhan jamur *Rhizopus stolonifer* dalam media agar.

Pengujian dilakukan dengan cara menambahkan asap cair yang telah didistilasi yaitu asap cair *grade 1* kedalam media PDA sesuai dengan konsentrasi yang ditentukan. Konsentrasi yang digunakan dalam pengujian *in vitro* ini adalah 0%, 3%, 4% 5%, 6% dan 7%. pengujian diawali dengan menambahkan asap cair sebanyak 0; 0,30; 0,40; 0,50; 0,60; 0,70 ml, ke dalam cawan petri kemudian ditambahkan media PDA yang masih cair pada cawan petri hingga volume total 10 ml/cawan petri lalu dihomogenkan. Selanjutnya adalah memasukkan 10  $\mu$ l suspensi konidia pada kertas cakram di bagian tengah media. Media kemudian diinkubasi pada suhu 25°C. Aktivitas pencampuran dilakukan di dalam *Laminar Air Flow Cabinet*.

Pengamatan dilakukan setiap hari dengan menghitung diameter koloni yang terbentuk. Pengukuran dengan alat ukur penggaris dari titik tengah yang sudah ditentukan sebelumnya. Pengamatan dihentikan apabila cawan petri telah dipenuhi miselium.

#### 3.4.7 Uji aktivitas anti jamur asap cair secara *in vivo*

Pengamatan aktivitas anti jamur pada buah pepaya mengacu pada penelitian Mendy dkk., (2019) buah pepaya dengan kematangan *grade 2* dibersihkan terlebih dahulu permukaannya dengan etanol 70% selama 1 menit, selanjutnya menggunakan *sodium hypochlorite* 10% selama 2 menit, kemudian buah dibilas dengan air bersih sebanyak tiga kali dan dikeringkan.

Buah pepaya kemudian dilukai (diameter 3 mm  $\times$  5 mm) menggunakan jarum steril. Buah pepaya yang telah disiapkan kemudian direndam pada larutan asap cair

selama 1 menit. Pengaplikasian asap cair ke buah pepaya ditentukan berdasarkan hasil dari uji *in vitro*, dimana konsentrasi asap cair yang dapat menghambat pertumbuhan jamur 100% dijadikan sebagai perlakuan konsentrasi dikali 10. Bagian yang luka diinokulasikan konidia jamur dengan konsentrasi  $10^5$  sebanyak 10  $\mu$ l, kemudian dikering anginkan.

Buah yang sudah mendapat perlakuan disimpan dalam kotak plastik yang ditutup dengan plastik wrap, pada suhu 28°C dengan kelembaban 68% sampai 70%. Pengamatan dilakukan 72 jam setelah inokulasi atau hari ke-3 hingga hari ke-7. Setiap perlakuan terdiri dari satu buah pepaya dengan dua puluh kali ulangan sehingga dibutuhkan 40 buah pepaya.

### **3.5 Parameter pengamatan**

#### **3.5.1 Parameter penunjang**

##### **a. Rendemen asap cair tongkol jagung**

Rendemen asap cair adalah jumlah cairan asap yang dihasilkan dari jumlah bahan baku yang digunakan, umumnya rendemen asap cair dinyatakan dalam persentase yang merupakan perbandingan banyaknya asap cair yang dihasilkan dengan berat bahan baku yang digunakan. Asap cair tongkol jagung terbuat dari tongkol jagung yang sudah kering dengan kadar air 11% sampai dengan 15%, sebanyak 10 kg.

##### **b. Karakteristik asap cair tongkol jagung**

Karakteristik asap cair diamati meliputi warna, aroma, pH, bobot jenis, kadar asam, dan kadar fenol. Pengukuran pH dilakukan dengan menggunakan pH meter universal. Uji kandungan senyawa fenol dilakukan dengan cara memasukan asap cair sebanyak 5 ml pada tabung reaksi, kemudian ditetaskan  $\text{FeCl}_3$  1% sebanyak 5 tetes, kocok beberapa saat. Hasil uji positif menunjukkan terbentuknya warna larutan dari warna ungu sampai cokelat (Asirvatham, 1992).

Pengukuran bobot jenis asap cair mengikuti langkah Wibowo (2012), yaitu dilakukan dengan menggunakan alat piknometer. Bobot piknometer kosong ditimbang dalam neraca analitik. Selanjutnya piknometer yang diisi penuh asap cair

ditimbang bobotnya. Bobot jenis (BJ) asap cair dapat dihitung dengan memasukan hasil pengukuran pada rumus berikut:

$$BJ \text{ (g/ml)} = \frac{\text{Bobot bahan(g)}}{\text{volume piknometer(ml)}}$$

Penentuan kadar asam asap cair dilakukan dengan metode titrasi mengikuti langkah Lestari (2018). Penentuan total asam titrasi dalam asap cair dilakukan dengan mengencerkan 10 ml asap cair dalam 100 ml aquades yang selanjutnya ditambahkan 3 tetes indikator phenolphthalein. Selanjutnya dilakukan titrasi dengan NaOH 0,1 titrasi dihentikan ketika telah terbentuk warna merah keunguan dan stabil. Nilai total asam titrasi (TAT) dapat dihitung berdasarkan rumus berikut:

$$TAT \text{ (\%)} = \frac{\text{Volume NaOH} \times \text{Normalitas NaOH} \times \text{BM asam asetat}}{\text{Berat sampel} \times 1000} \times 100\%$$

### 3.5.2 Parameter utama

#### a. Penghambatan pertumbuhan miselium pada uji *in vitro*

Aktivitas antijamur asap cair tongkol jagung ditentukan dengan cara menghitung daya hambat pertumbuhan jamur. Diameter pertumbuhan miselium/hifa jamur pada media PDA yang diberikan perlakuan asap cair dan pada media kontrol diukur dengan menggunakan jangka sorong. Pengujian daya hambat dihitung dengan rumus (Hartati dkk., 2013; Suresh dkk., 2019):

$$DH = \frac{Dk - Dp}{Dk} \times 100\%$$

Keterangan:

DH = Daya hambat (%)

Dk = Diameter kontrol(cm)

Dp = Diameter perlakuan (cm)

#### b. Diameter luka pada buah

Pengamatan diameter luka dilakukan dengan menggunakan penggaris dari ke-3 sampai hari ke-7 hari setelah inokulasi. Data diameter luka buah dihitung menggunakan rumus:

$$\text{Diameter luka} = \frac{\text{panjang luka horizontal} + \text{panjang luka vertikal}}{2}$$

c. Intensitas serangan

Pengamatan intensitas serangan dilakukan untuk mengetahui tingkatan kerusakan yang terjadi pada buah. Data intensitas serangan dihitung menggunakan rumus intensitas serangan tidak mutlak (Marhani, 2018):

$$\text{Intensitas serangan}(\%) = \frac{\sum (nv)}{NZ} \times 100\%$$

Keterangan:

- n = Jumlah buah yang terinfeksi  
 v = Besar skala serangan  
 N = Jumlah buah yang diamati  
 Z = Skala tertinggi dari kategori infeksi

Tabel 4. Nilai skala tingkat serangan

Skala	Persentase	Kriteria
0	0	Normal
1	$0 < x \leq 25$	Ringan
2	$25 < x \leq 50$	Sedang
3	$50 < x \leq 75$	Berat
4	$x > 75$	Sangat berat

d. Susut bobot buah

Pengamatan susut bobot buah ini dilakukan untuk menghitung kehilangan bobot buah akibat serangan penyakit *R. stolonifer*. Pengamatan dilakukan dengan menimbang buah pepaya pada hari ke-1 dan hari ke-7 menggunakan timbangan, setelah itu dihitung selisih berat buahnya.