

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan tempat penelitian

Penelitian ini berlangsung mulai bulan Maret sampai bulan Mei 2025, dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi Fakultas Pertanian Universitas Siliwangi, Kota Tasikmalaya.

3.2 Alat dan bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu cawan petri, labu erlenmeyer, kain kasa steril, *cork borer*, mikropipet, jarum suntik steril, *laminar air flow*, mikroskop, bak plastik, jangka sorong digital. Selain itu penelitian ini juga menggunakan perangkat keras berupa laptop Lenovo ThinkPad Yoga 370 (7200U, FHD) dengan spesifikasi DDR4 8GB, *Processor* Intel® Core™ i5-7300U 2,60 GHz (4CPUs). Perangkat lunak yang digunakan yaitu aplikasi PyRx, BIOVIA Discovery Studio, PyMOL, ProTox 3.0 diakses melalui <https://tox.charite.de/protox3/>, StopTox melalui <https://stoptox.mml.unc.edu/>, BeeToxAI (<http://beetoxai.labmol.com.br/>), situs uniport <https://www.uniprot.org/uniprotkb/O94103/entry>, situs website SWISSADME <http://www.swissadme.ch/>), PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), PDB (*Protein data bank*) (<https://www.rcsb.org/>), Deep-PK <http://www.biosig.lab.uq.edu.au/deeppk/>, dan cropCSM https://biosig.lab.uq.edu.au/crop_csm/.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu ekstrak daun kelor, cabai rawit varietas CRV 212 (Ori 212), isolat *Colletotrichum* sp., fungisida berbahan aktif propineb (Antracol), alkohol 95%, aquades, media PDA (*Potato Dextrose Agar*), klorox.

3.3 Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini yaitu metode eksperimen berbasis komputasional secara *in silico* dan eksperimen secara *in vitro* dan *in vivo*.

3.3.1 *In silico*

Metode yang digunakan dalam penelitian *in silico* yaitu metode eksperimen yang dirancang dengan menggunakan studi kasus pre-eksperimental berbasis komputer untuk mengetahui penambatan ligan dari senyawa metabolit sekunder pada daun kelor terhadap reseptor yang berperan penting dalam jamur antraknosa yaitu protein *cutinase* dengan menggunakan metode *molecular docking*. Penelitian ini menggunakan variabel tunggal yaitu potensi kandungan senyawa bioaktif dari ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) yang dapat mengikat protein target (*cutinase & cell division control*) di dalam *Colletotrichum* sp. penyebab antraknosa pada cabai rawit (*Capsicum frutescens* L).

3.3.2 *In vitro*

Metode yang digunakan dalam percobaan *in vitro* yaitu metode eksperimental dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL), terdiri dari 7 taraf perlakuan yaitu, kontrol positif, kontrol negatif, serta perlakuan konsentrasi ekstrak daun kelor dalam media PDA. Semua perlakuan diulang sebanyak 4 kali. Konsentrasi (v/v) yang diaplikasikan yaitu sebagai berikut:

K0 = tanpa aplikasi ekstrak daun kelor (kontrol negatif)

K1 = Fungisida berbahan aktif propineb (kontrol positif)

K2 = ekstrak daun kelor 1%

K3 = ekstrak daun kelor 2%

K4 = ekstrak daun kelor 3%

K5 = ekstrak daun kelor 4%

K6 = ekstrak daun kelor 5%

3.3.3 *In vivo*

Percobaan *in vivo* merupakan lanjutan dari percobaan *in vitro* dengan mengambil perlakuan terbaik. Percobaan *in vivo* dilakukan dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap dengan 7 taraf perlakuan ekstrak daun kelor terbaik dari hasil *in vitro* yang diulang sebanyak 4 kali. Setiap ulangan berisi 5 sampel buah cabai rawit. Konsentrasi (v/v) yang diaplikasikan yaitu sebagai berikut:

K0 = tanpa aplikasi ekstrak daun kelor (kontrol negatif)

K1 = Fungisida berbahan aktif propineb (kontrol positif)

K2 = ekstrak daun kelor 5%

K3 = ekstrak daun kelor 10%

K4 = ekstrak daun kelor 15%

K5 = ekstrak daun kelor 20%

K6 = ekstrak daun kelor 25%

Model linier dari Rancangan Acak Lengkap adalah sebagai berikut:

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

Dengan:

$i = 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6$

$j = 1, 2, 3, 4$

Keterangan:

Y_{ij} = pengamatan pada perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

μ = Rataan umum

τ_i = Pengaruh perlakuan ke-i

ε_{ij} = Pengaruh acak pada perlakuan ke-i ulangan ke-j

Tabel 1 Tabel sidik ragam Rancangan Acak Lengkap

Sumber keragaman	Derajat bebas	Jumlah kuadrat	Kuadrat tengah	F hitung	F tabel 5%
Perlakuan	6	$\Sigma P^2 - FK$	JK_P / db_P	KT_P / KT_G	2,57
Galat	21	$JK_T - JK_P$	JK_G / db_G		
Total	27	$\Sigma T^2 / r - FK$			

Sumber: (Gomez dan Gomez, 2007)

Tabel 2 Kaidah Pengambilan Keputusan

Hasil Analisa	Kesimpulan Analisa	Keterangan
$F_{hit} \leq F_{tabel\ 0,05}$	Berbeda tidak nyata	Tidak terdapat perbedaan pengaruh antar perlakuan
$F_{hit} > F_{tabel\ 0,05}$	Berbeda nyata	Terdapat perbedaan pengaruh antar perlakuan

Sumber: (Gomez dan Gomez, 2007)

Jika dari hasil uji F terdapat perbedaan pada hasil uji *in vitro*, maka dilakukan uji lanjutan dengan Uji Jarak Berganda Duncan pada tingkat kepercayaan 95% dengan rumus berikut:

$$LSR = S_x \times SSR$$

Nilai S_x dapat dicari menggunakan rumus berikut:

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

Keterangan:

LSR = *Least significant ranges*

S_x = galat baku rata-rata

SSR = *studentized significant ranges*

KT galat = kuadrat tengah galat

r = jumlah ulangan

3.4 Prosedur penelitian

Prosedur kerja dalam penelitian ini yaitu sebagai berikut:

3.4.1 Uji *in silico*

a. Penyaringan senyawa fitokimia melalui penambangan data

Informasi tentang senyawa bioaktif diperoleh dari hasil analisis *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* (GC-MS). Senyawa-senyawa ini kemudian dipilih berdasarkan yang termuat dalam Hit 1 pada hasil GCMS. Senyawa-senyawa ini digunakan untuk analisis lebih lanjut. Data terkait senyawa kimia termasuk rumus kimia, struktur kimia, dan SMILES kanonik, diambil dari basis data PubChem (*National Library of Medicine, National Center for Biotechnology Information, Washington*) pada situs web <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Sifat-sifat seperti ClogP, donor ikatan hidrogen, akseptor ikatan hidrogen, dan ikatan yang dapat berputar, ditentukan menggunakan SwissADME (*Molecular Modeling Group of the SIB, Swiss Institute of Bioinformatics, Swiss*). SwissADME, dapat diakses pada situs web <http://www.swissadme.ch/> dengan mengetikkan SMILES kanonik yang diperoleh dari PubChem (Daina, Michielin, and Zoete., 2017). Data dan sifat kimia senyawa yang diperoleh akan digunakan untuk penyaringan kemiripan senyawa dengan pestisida berdasarkan parameter Hao's Rules.

b. Uji toksisitas

Prediksi toksisitas dilakukan untuk mengevaluasi tingkat keamanan senyawa yang telah dipilih pada parameter Hao's Rules. Prediksi toksisitas dilakukan pada 5 senyawa yang memenuhi kriteria Hao's Rules, dirunut berdasarkan Rel Area (%) terbesar pada hasil GC-MS. Analisis ini menjadi langkah penting sebelum senyawa dikembangkan lebih lanjut, karena efektivitas senyawa pada ekstrak harus dibarengi dengan profil toksikologi yang aman bagi lingkungan, tanaman, dan manusia (Benatar, Nurhayati, dan Ridwan, 2025). Uji toksisitas pada penelitian ini meliputi evaluasi toksisitas organ, toksisitas akut, dan toksisitas ekologis.

1) Evaluasi toksisitas terhadap organ

Prediksi terhadap toksisitas organ senyawa ligan uji meliputi hepatoksisitas, neurotoksisitas, penyakit pernapasan, dan karsinogenik dianalisis melalui website ProTox 3.0 (*Charite University of Medicine, Institute for Physiology, Jerman*)

melalui <https://tox.charite.de/protox3/>. dengan memasukkan string SMILES kanonik dan menekan "Start-Tox-Prediction", di mana model *machine learning* memperkirakan tingkat toksisitas untuk setiap parameter (Banerjee *et al.*, 2024)

2) Evaluasi toksisitas akut

Efek toksisitas akut dari senyawa ligan uji dianalisis untuk menilai seberapa berbahaya suatu zat jika tertelan, terhirup, atau kontak langsung dengan kulit dalam jumlah besar. Toksisitas akut diukur dengan nilai LD50 (*Lethal Dose*, 50%) yang menunjukkan dosis yang menyebabkan kematian pada 50% dari populasi uji seperti tikus atau hewan lain dalam percobaan laboratorium. Prediksi toksisitas akut untuk senyawa kimia pada manusia, termasuk LD50 dan kelas toksisitas dilakukan menggunakan website ProTox 3.0. Untuk prediksi maksimal toleransi dosis pada manusia dianalisis dengan website Deep-PK yang dapat diakses melalui <http://www.biosig.lab.uq.edu.au/deeppk/>, dengan cara memasukkan SMILES kanonik dari senyawa kimia yang diperoleh dari PubChem. Sementara toksisitas akut dianalisis menggunakan STopTox yang diakses melalui <https://stoptox.mml.unc.edu/>, digunakan untuk memprediksi toksisitas inhalasi akut, toksisitas oral akut, toksisitas dermal akut, iritasi dan korosi mata, serta iritasi dan korosi kulit dengan memasukkan SMILES dan menekan "PREDICT STOPTOX" di mana model *machine learning* memperkirakan tingkat toksisitas untuk setiap parameter (Borba *et al.*, 2022).

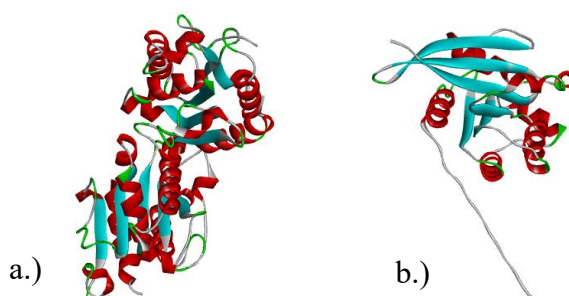
3) Evaluasi toksisitas ekologis

Pengujian toksisitas ekologi dilakukan untuk memastikan bahwa senyawa ligan uji aman bagi lingkungan, termasuk organisme non-target seperti hewan, tanaman, dan sifat biodegradasinya. Aktivitas herbisida diprediksi menggunakan cropCSM (*The University of Queensland, The University of Melbourne, dan The Baker Heart & Diabetes Institute, Australia*) melalui tautan https://biosig.lab.uq.edu.au/crop_csm/ (Pires *et al.*, 2022). Sementara biodegradasi dilakukan menggunakan Deep-PK yang telah dikembangkan oleh *The University of Queensland, The University of Melbourne, dan The Baker Heart & Diabetes Institute, Australia* (Myung, De Sa, and Ascher., 2024). Penggunaan platform Deep-

PK dapat diakses melalui <http://www.biosig.lab.uq.edu.au/deeppk/>, dengan cara memasukkan SMILES kanonik dari senyawa kimia yang diperoleh dari PubChem. Deep-PK akan menganalisis data dengan model pembelajaran mendalam terhadap berbagai kumpulan data toksisitas. Toksisitas *Apis mellifera* diprediksi menggunakan BeeToxAI (LabMol, Fakultas Farmasi, Federal University of Goiás, Brazil) melalui <http://beetoxai.labmol.com.br/>, dengan memasukkan string SMILES dan menekan "SUBMIT ANALYSIS (Moreira-Filho *et al.*, 2021).

c. *Molecular docking*

Prosedur *Molecular docking* dilakukan menggunakan aplikasi PyRex dan BIOVIA Discovery Studio pada perangkat keras dengan spesifikasi DDR4 8GB, Processor Intel® Core™ i5-7300U 2,60 GHz (4CPUs). Aplikasi ini digunakan untuk menganalisis interaksi antara ligan-protein. Pertama, struktur 3D dari protein target dari *Colletotrichum* yaitu protein cutinase dan protein CDC42 (*cell division control*). Protein cutinase dengan PDB ID 3DEA beresolusi 2.30Å diunduh dari Protein Data Bank melalui <https://www.rcsb.org/> dan dipersiapkan di BIOVIA Discovery Studio. Proses ini mencakup penambahan atom hidrogen, penyempurnaan struktur, serta penghapusan molekul air dan ligan yang sudah ada. Reseptor yang sudah disiapkan kemudian disimpan sebagai file .pdb. Sementara untuk struktur protein CDC42 belum terdapat pada basis data Protein Data Bank, sehingga digunakan model prediksi struktur dari AlphaFold yang tersedia pada situs uniprot yang dapat diakses melalui tautan <https://www.uniprot.org/uniprotkb/O94103/entry>.



Gambar 3 Visualisasi 3D reseptor (protein)

a.) Protein Cutinase (3DEA) b.) Protein *Cell Division Control* (CDC42)

Ligan, merupakan senyawa ekstrak daun kelor hasil GCMS yang dipilih sebanyak 5 senyawa yang telah memenuhi parameter Hao's Rules. Kemudian diunduh struktur 3D nya dari PUBChem melalui <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> kemudian dioptimalkan di software PyRx pada menu Open Babel, dan disimpan sebagai file .pdb. Di PyRx, file reseptor dan ligan ini dimuat, lalu area pengikatan ditentukan dengan membuat kotak grid di sekitar situs pengikatan. Docking dilakukan menggunakan AutoDock Vina di PyRx dengan mengatur parameter docking dan menjalankan simulasi. Hasil docking, termasuk skor dan posisi ligan, kemudian ditinjau. Posisi terbaik ditentukan berdasarkan skor dan pengamatan visual. Untuk analisis tambahan, hasil docking diimpor ke BIOVIA Discovery Studio, di mana dilakukan analisis dan penyempurnaan lebih lanjut. (Chairunisa, Eriadi, dan Ramadhani., 2023). Analisis *molecular docking* dengan tahapan yang sama juga dilakukan pada fungisida bahan aktif propineb, sebagai kontrol pembandingan.

3.4.2 Pembuatan ekstrak daun kelor

Ekstrak daun kelor dibuat dengan merujuk pada (Darmadi dkk., 2022) (Yulia dkk., 2020) dan (Husni, Pratiwi, dan Baitariza., 2019) dengan metode maserasi. Serbuk daun kelor dimaserasi dengan menggunakan pelarut alkohol 95%. Serbuk daun kelor dimasukkan ke dalam wadah tertutup dan direndam alkohol 95% dengan perbandingan 1:10 (w/v). Setelah itu dimaserasi dilakukan dengan mendinginkan larutan selama 72 jam. untuk pemisahan residu dan filtrat dilakukan selama 1 x 24 jam. Ekstrak kasar diperoleh dengan cara menyaring hasil maserasi dengan empat lapis kain kasa steril.

3.4.3 Peremajaan patogen

Isolat *Colletotrichum* sp. diperoleh dari koleksi Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Pertanian, Universitas Siliwangi, yang diisolasi dari cabai rawit yang terkena penyakit antraknosa. Peremajaan dilakukan di ruangan steril didalam *laminar air flow*. Isolat diremajakan dengan mengkultur kembali pada cawan petri berisi 10 ml media PDA. Isolat hasil peremajaan digunakan untuk uji *in vitro* dan *in vivo*.

3.4.4 Uji *in vitro*

Uji *in vitro* dilakukan untuk mengetahui aktivitas penghambatan ekstrak terhadap pertumbuhan *Colletotrichum* sp. Uji daya hambat terhadap diameter koloni dilakukan dengan metode *Poison Food Technique* berdasarkan (Suganda dkk., 2023).

Ekstrak daun kelor yang telah diperoleh dilakukan pengenceran sesuai konsentrasi yang digunakan yaitu 1%, 2%, 3%, 4%, dan 5% dengan mengambil 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, dan 5 ml, kemudian larutan tersebut dicampurkan dengan media PDA steril yang masih cair sampai 100 ml secara perlahan melalui dinding labu erlenmeyer, kemudian dihomogenkan dengan memutar labu erlenmeyer pada salah satu sudutnya. Media yang sudah siap dituangkan ke dalam cawan petri menggunakan jarum suntik steril dengan volume sebanyak 10 ml per cawan petri. Untuk kontrol positif, ditambahkan fungisida berbahan aktif propineb dengan konsentrasi 1%. Media PDA cair dicampur dengan fungisida propineb dengan mengambil 1 g kemudian dilarutkan dalam media PDA sampai 100 ml, dan penambahannya ke dalam cawan petri sama dengan penambahan ekstrak daun kelor. Sementara untuk kontrol negatif ditambahkan aquades steril tanpa penambahan ekstrak (Suganda dkk., 2023).

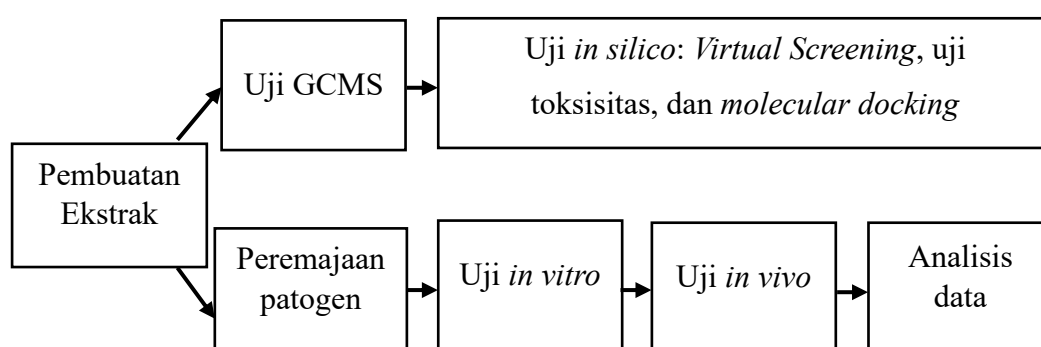
Biakan murni *Colletotrichum* sp. dipotong pada ujung pertumbuhan koloninya dengan menggunakan *cork borer* berdiameter 5 mm lalu ditempatkan di tengah-tengah medium agar, kemudian diinkubasi dalam suhu ruang. Pengamatan terhadap garis tengah pertumbuhan miselium koloni jamur dilakukan setiap 24 jam selama satu minggu.

3.4.5 Uji *in vivo*

Pengujian *in vivo* dilakukan berdasarkan penelitian (Paradisa dkk., 2021) dan (Imaniasita, Wiyono, dan Damayanti., 2024) yang dimodifikasi. Buah cabai rawit disterilkan menggunakan alkohol 70% dan klorok 1% kemudian dibilas menggunakan air steril sebanyak 2 kali. Selanjutnya cabai rawit direndam dalam ekstrak daun kelor selama 5 menit dengan konsentrasi 5%, 10%, 15%, 20%, 25% (v/v). Pada perlakuan kontrol negatif, buah cabai tidak direndam, sedangkan pada kontrol positif buah direndam dalam larutan fungisida kimia 1%. Cabai kemudian

dikeringanginkan. Setelah kering permukaan buah cabai dilukai dengan jarum suntik steril dan ditetaskan sebanyak 10 μL suspensi konidium menggunakan mikropipet dengan kerapatan 5×10^6 konidium mL^{-1} . Buah cabai rawit yang telah diberi perlakuan diletakkan pada bak plastik yang diberi kapas basah steril di keempat sudutnya. Setelah itu cabai diinkubasi selama 7 hari pada suhu kamar serta kondisi gelap dan terang masing masing 12 jam.

Tahapan dalam penelitian ini seperti dalam diagram alir berikut:



Gambar 4 Diagram alir penelitian

3.5 Parameter pengamatan

3.5.1 Parameter penunjang

a. Analisis komposisi senyawa ekstrak hasil GC-MS

Analisis komposisi senyawa ekstrak daun kelor dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT), Universitas Gajah Mada dengan metode GC-MS (*Gas Chromatography-Mass Spectrometry*). Metode ini mengkombinasikan dua metode yaitu *Gas Chromatography* untuk memisahkan dan mendeteksi senyawa-senyawa yang mudah menguap dalam suatu campuran dan *Mass Spectrometry* untuk mendapatkan berat molekul dengan cara mencari perbandingan massa terhadap muatan dari ion dengan mengukur jari-jari orbit yang melingkarnya dalam medan magnetik seragam (Simanjuntak dkk., 2021). Analisis GC-MS dilakukan dengan instrumen TRACE 1310 GC untuk tipe GC, ISQ LT *Single Quadrupole Mass Spectrometer* untuk tipe MS, Triplus RSH Autosampler, HP-5MS UI, TG-5MS, dan TG-WAXMS untuk kolom.

b. Kemiripan senyawa dengan pestisida

Data yang diperoleh dari basis data PubChem (*National Library of Medicine, National Center for Biotechnology Information, Washington*) dan SwissADME (*Molecular Modeling Group of the SIB, Swiss Institute of Bioinformatics, Swiss*) kemudian dianalisis untuk mengidentifikasi *pesticide-likeness* (kemiripan dengan pestisida) menggunakan beberapa properti molekul sederhana yang merujuk pada *Hao rules* (Hao, Dong, and Yang., 2011) yang mencakup 5 parameter utama yaitu: Tabel 3 Hao Rule's

<i>Rule Class</i>	<i>Hao Pesticides</i>
<i>Molecular weight</i>	≤ 435 (g/mol)
CLogP	≤ 6
<i>Hydrogen bond donor</i>	≤ 2
<i>Hydrogen bond acceptor</i>	≤ 6
<i>Rotatable bond</i>	≤ 9

Sumber: (Hao *et al.*, 2011)

c. Profil toksisitas organ

Hepatotoksitas mengacu pada suatu senyawa yang menyebabkan setidaknya satu kejadian patologis atau fisiologis terkait fungsi hati yang terganggu. Penyakit pernapasan diklasifikasikan berdasarkan apakah suatu senyawa berdampak buruk pada sistem pernapasan manusia (beracun) atau aman. Karsinogenisitas ditunjukkan dengan hasil positif, yang mengindikasikan bahwa senyawa tersebut dapat bertindak sebagai karsinogen karena potensi mutageniknya.

d. Profil toksisitas akut dan kronis

LD50 yang diprediksi menunjukkan dosis mematikan rata-rata, yaitu dosis di mana 50% subjek uji mati setelah terpapar suatu senyawa. Kelas toksisitas yang diprediksi, sebagaimana didefinisikan oleh Sistem Harmonisasi Global (GHS), mengelompokkan bahan kimia berdasarkan nilai LD50 dalam mg/kg menjadi kelas-kelas: Kelas I (≤ 5 , mematikan jika tertelan), Kelas II (5-50, mematikan jika tertelan), Kelas III (50-300, beracun jika tertelan), Kelas IV (300-2000, berbahaya

jika tertelan), Kelas V (2000-5000, mungkin berbahaya jika tertelan), dan Kelas VI (> 5000, tidak beracun).

e. Dampak lingkungan dan pertimbangan keselamatan

Aktivitas herbisida dinilai menggunakan model yang dilatih dan diuji pada dataset molekul terbesar dengan profil herbisida yang dikarakterisasi secara eksperimental, mencakup lebih dari 4.500 senyawa. Biodegradasi ditentukan dengan mengklasifikasikan senyawa sebagai mudah terdegradasi atau tidak berdasarkan nilai *biological oxygen demand* (BOD).

3.5 2 Parameter utama

a. Pengamatan *in silico*

1) *Scoring* antara ligan dan reseptor

Scoring energi bebas pengikatan, atau *binding affinity* (ΔG bind) digunakan untuk mengevaluasi kekuatan interaksi antara ligan dan reseptor target. Nilai ini menunjukkan seberapa besar energi yang dibutuhkan atau dilepaskan ketika ligan berikatan dengan reseptor dalam kondisi tertentu. Ruswanto dkk (2018) menyatakan bahwa semakin kecil hasil *scoring* dari suatu senyawa ligan uji dengan makromolekul reseptornya maka kompleks ligan dan reseptor tersebut akan semakin stabil serta reaksinya terjadi secara spontan.

Tabel 4 Ketentuan *Scoring* (ΔG bind) yang efektif

No	<i>Scoring</i> (ΔG bind)	Keterangan hasil
1	$\Delta G < 0$	Reaksi akan berlangsung secara spontan
2	$\Delta G = 0$	Reaksi akan berjalan <i>reversible</i>
3	$\Delta G > 0$	Reaksi tidak berjalan

Sumber : (Ruswanto dkk., 2018)

b. Pengamatan *in vitro*

1) Diameter koloni

Diameter koloni diamati dengan mengukur diameter koloni menggunakan jangka sorong digital. Diameter diukur secara vertikal dan horizontal (Suganda dkk., 2023). Untuk mendapatkan diameter pertumbuhan digunakan rumus:

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

Keterangan:

D = diameter pertumbuhan

d1 = diameter pertumbuhan vertikal

d2 = diameter pertumbuhan horizontal

2) Daya Hambat

Pengukuran daya hambat dilakukan berdasarkan (Suganda dkk., 2023) dengan mengukur diameter koloni menggunakan jangka sorong digital.

Perhitungan persentase daya hambat dihitung menggunakan rumus:

$$\text{Daya hambat} = \frac{dk - dp}{dk} \times 100\%$$

Keterangan:

dk = diameter koloni kontrol

dp = diameter koloni perlakuan

c. Pengamatan *in vivo*

1) Masa inkubasi (hari)

Masa inkubasi merupakan waktu yang diperlukan patogen untuk melakukan infeksi. Pengamatan masa inkubasi dilakukan dari hari pertama setelah inokulasi sampai munculnya gejala awal penyakit pada buah (Lannur, Liswarni, dan Martinius., 2021).

2) Intensitas serangan

Pengamatan intensitas serangan dilakukan pada hari ke-7 setelah inokulasi (HSI) berdasarkan pada skor luas bercak, kemudian diidentifikasi kriteria ketahanan tanaman terhadap penyakit berdasarkan (Sakerebau dan Soekarno, 2013) menggunakan rumus sebagai berikut:

$$IS = [\Sigma (n \times V) / (Z \times N)] \times 100\%.$$

Keterangan:

IS = Intensitas serangan

N = jumlah buah yang diamati

n = jumlah buah setiap kelas bercak Z = nilai skor kelas luas bercak yang tertinggi.

V = nilai skor setiap kelas bercak

Nilai serangan dikategorikan menurut (Bhat *et al.*, 2013) sebagai berikut:

0 = tidak ada serangan

1 = 0,1 - 10,0% luas permukaan buah yang terserang

2 = 10,1% - 25,0% luas permukaan buah yang terserang

3 = 25,1% - 50,0% luas permukaan buah yang terserang

4 = 50,1% - 75,0% luas permukaan buah yang terserang

5 = >75,1% luas permukaan buah yang terserang