

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan tempat penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari sampai Mei 2025 di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Pertanian Universitas Siliwangi.

3.2 Alat dan bahan penelitian

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan selama penelitian meliputi cawan petri, labu erlenmeyer, *Laminar Air Flow* (LAF), bunsen, *autoclave*, jarum ose, timbangan digital, pemantik api, kompor, *hot plate*, gelas ukur, alat tulis, penggaris/jangka sorong, pinset, kamera, mikropipet dan tip, blender, *cork borer*, oven, pinset, saringan dan kertas label.

Selain itu, penelitian ini juga menggunakan perangkat keras dan perangkat lunak. Perangkat keras berupa Laptop AVITA Essential 14 NE14A2IDC43A-CRB dengan spesifikasi prosesor Intel® Celeron® N4000, RAM 4GB LPDDR4, SSD 128GB, layar 14 inci Full HD, dan sistem operasi Windows 10 Home in S mode. Adapun perangkat lunak yang digunakan pada penelitian ini yaitu NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>), ProTox 3.0 (<https://tox.charite.de/protox3/>), admetSAR 3.0, PyRx, Pymol, dan BIOVIA Discovery Studio.

3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan meliputi *Potato Dextrose Agar* (PDA), daun serai dapur, pestisida dengan bahan aktif propineb, alkohol 70%, akuades, aluminium foil, *plastic wrap*, kapas, kertas saring, cabai merah yang memiliki gejala antraknosa, cabai sehat, wadah, natrium hipoklorit, dan tisu.

3.3 Metode penelitian

Penelitian ini dilakukan dalam 2 tahap, yaitu *in silico* dan *in vitro*. Pendekatan *in silico* dilakukan dengan metode eksploratif untuk mengetahui toksisitas senyawa dan pola interaksi serta nilai scoring beberapa senyawa aktif dalam ekstrak serai dapur terhadap protein target patogen *Colletotrichum* sp. Selanjutnya, tahap *in vitro* menggunakan metode eksperimental dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) 1 faktor yang terdiri dari 5 perlakuan dan 5 ulangan, sehingga didapatkan 25 unit percobaan. Adapun perlakuan tersebut yaitu:

P0- = Kontrol negatif (tanpa pemberian ekstrak serai dapur dan pestisida)

P0+ = Kontrol positif (pestisida dengan bahan aktif propineb, dosis: 2 g/l)

P1 = Ekstrak serai dapur dengan konsentrasi 5%

P2 = Ekstrak serai dapur dengan konsentrasi 10%

P3 = Ekstrak serai dapur dengan konsentrasi 15%

Tata letak percobaan dapat dilihat pada Lampiran 1 dan perhitungan konsentrasi dapat dilihat pada Lampiran 2.

Model linier untuk rancangan acak lengkap adalah sebagai berikut:

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

Keterangan:

i : 1,2,3,4,5

j : 1,2,3,4,5

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.

Data hasil pengamatan kemudian dianalisis menggunakan sidik ragam (Uji F) pada taraf nyata 5%, sebagaimana ditunjukkan pada tabel di bawah ini.

Tabel 2. Daftar sidik ragam

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	F hitung	F _{0,05}
Perlakuan	4	JKP	JKP/db P	KTP/KTG	2.866
Galat	20	JKG	JKG/db G		
Total	24	JKT			

Sumber: (Gomez & Gomez, 1995)

Kaidah pengambilan keputusan berdasarkan pada nilai F hitung dapat dilihat pada tabel.

Tabel 3. Kaidah pengambilan keputusan

Hasil Analisis	Kesimpulan Analisis	Keterangan
$F_{hit} \leq F_{0,05}$	Tidak berbeda nyata	Tidak terdapat perbedaan antara perlakuan
$F_{hit} > F_{0,05}$	Berbeda nyata	Terdapat perbedaan antara perlakuan

Sumber: (Gomez & Gomez, 1995)

Apabila hasil uji F menunjukkan adanya perbedaan nyata di antara perlakuan, maka dilakukan uji lanjutan menggunakan Uji Jarak Berganda Duncan pada taraf kesalahan 5%. Rumus yang digunakan adalah sebagai berikut.

$$LSR = SSR \cdot S_x$$

$$SSR = (\alpha, dbg, p)$$

Nilai S_x dapat dicari menggunakan rumus sebagai berikut:

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

Keterangan:

S_x : Galat baku rata-rata (*Standart Error*)

KTG : Kuadrat tengah galat

r : Jumlah ulangan pada tiap nilai tengah perlakuan yang dibandingkan

SSR : *Significant Studentized Range*

α : Taraf nyata

dbg : Derajat bebas galat

p : Jarak antara perlakuan (range)

LSR : *Least Significant Range*

3.4 Prosedur kerja

Prosedur kerja dalam penelitian ini yaitu sebagai berikut:

3.4.1 Pengujian *in silico*

a. Pencarian data senyawa serai dapur

Analisis komposisi senyawa ekstrak dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT), Universitas Gadjah Mada, menggunakan metode Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS). Instrumen yang digunakan adalah GC-QP2010 (Shimadzu) dengan kolom kapiler silika fusi Omega Wax TM250 (30 m × 0,25 mm, ketebalan film 0,25 µm). Pengaturan suhu awal adalah 100°C, suhu injeksi 270°C, dan laju aliran kolom 1,21 ml/menit. Gas pembawa yang digunakan adalah helium dengan laju aliran 1 ml/menit dan kecepatan linier 35 cm/detik. Identifikasi senyawa dilakukan dengan membandingkan spektra massa dan indeks retensi dengan data literatur serta database spektrum GC-MS (Putri et al., 2022).

Pemilihan senyawa kimia dilakukan berdasarkan kelimpahan relatif tertinggi (% area puncak) serta nilai Similarity Index tertinggi sebagai indikator kesesuaian dengan data pustaka. Sebanyak empat senyawa dipilih untuk analisis lebih lanjut. Informasi seperti formula, struktur kimia, dan *canonical SMILES* dari senyawa tersebut dikumpulkan dari database PubChem. Sifat-sifat seperti logP, donor dan akseptor ikatan hidrogen, ikatan rotasi, serta kelarutan air dianalisis menggunakan SwissADME melalui situs <http://www.swissadme.ch> dengan memasukkan *canonical SMILES* dari PubChem.

b. Preparasi ligan

Penelitian ini menggunakan dua jenis ligan, yaitu ligan dari bahan aktif propineb dan ligan uji yang berasal dari ekstrak serai. Data ligan diperoleh dari situs PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) dalam format 3D (*.sdf). Setelah diunduh, ligan tersebut diubah ke format *.pdb menggunakan perangkat lunak Pyrx. Ligan yang digunakan merupakan komponen yang telah dianalisis menggunakan GC-MS pada tahap sebelumnya.

c. Preparasi protein target

Penelitian ini menggunakan protein homolog CDC42 sebagai target protein karena perannya dalam pertumbuhan vegetatif, perkembangan morfologi, integritas dinding sel, dan patogenisitas *Colletotrichum* pada tanaman inangnya (Wang et al., 2018). Struktur 3 dimensi dari protein ini dapat diunduh dari situs UniProt dalam format *.pdb. Preparasi reseptor dilakukan menggunakan perangkat lunak Biovia Discovery Studio. Proses preparasi mencakup penghapusan molekul air serta ligan bawaan pada reseptor, penambahan atom hidrogen, dan penyimpanan dalam format *.pdb.

d. Evaluasi toksisitas pada manusia

Prediksi toksisitas dilakukan pada senyawa ligan yang diunduh melalui situs <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> dalam format *canonical SMILES*. Proses prediksi toksisitas senyawa kimia pada manusia dilakukan menggunakan ProTox 3.0, yang dapat diakses di <https://tox.charite.de/protox3/>. dengan evaluasi meliputi *organ toxicity*, yaitu hepatotoksitas dan neurotoksisitas, serta *toxicity end points*, yaitu karsinogenisitas dan mutagenisitas (Banerjee et al., 2018; Banerjee et al., 2024).

e. Evaluasi toksisitas ekologi

Prediksi toksisitas ekologi dilakukan pada ligan uji senyawa ekstrak serai menggunakan *admetSAR 3.0*. Analisis ini mencakup pengujian toksisitas terhadap zooplankton (*Daphnia magna*), dan lebah madu (*Apis mellifera*) (Cheng et al., 2012). Penggunaan *admetSAR 3.0* dimulai dengan membuka situs <http://lmmd.ecust.edu.cn/admetSAR2/>. Format *canonical SMILES* dari senyawa target, yang dapat diperoleh dari PubChem atau sumber lainnya, dimasukkan ke dalam kolom input yang tersedia di halaman utama. Setelah itu, analisis dimulai dengan menekan tombol "Submit".

f. Proses *docking* ligan dan protein

Protein dan ligan yang telah dipreparasi dimasukkan ke dalam perangkat lunak PyRx untuk proses docking. Dalam tahap ini, area docking ditentukan dengan mengatur *Grid Box*. Jika lokasi situs aktif protein diketahui, pengaturan

dilakukan secara spesifik pada area tersebut. Namun, jika tidak, *blind docking* menjadi alternatif untuk menelusuri seluruh permukaan protein.

Setelah *Grid Box* disesuaikan, proses docking dilakukan menggunakan *AutoDock Vina*. Hasilnya berupa beberapa pose ligan yang membentuk kompleks dengan protein, masing-masing dengan nilai *binding affinity* tertentu. Pose dengan nilai *binding affinity* paling negatif biasanya dipilih karena menunjukkan kompleks yang lebih stabil. Hasil docking ini kemudian disimpan untuk dianalisis lebih lanjut, termasuk visualisasi interaksi ligan dengan protein.

g. Visualisasi *docking*

File hasil docking dalam format PDB dibuka menggunakan PyMOL, kemudian protein dan ligan digabungkan untuk memperlihatkan posisi binding. Analisis interaksi dilakukan menggunakan Biovia Discovery Studio guna mengidentifikasi jenis-jenis interaksi, seperti ikatan hidrogen dan interaksi hidrofobik. Hasil visualisasi disimpan dalam bentuk file dan tangkapan layar untuk keperluan dokumentasi.

Langkah-langkah uji *in silico* secara detail dapat dilihat pada Lampiran 5.

3.4.2 Pembuatan ekstrak serai dapur

Ekstrak serai dapur dibuat menggunakan metode maserasi. Simplisia daun serai diperoleh secara langsung dalam bentuk jadi Sebanyak 40 gram simplisia serai dilarutkan pada 160 mL alkohol 70% dan disimpan pada suhu ruang selama 3 hari. Setelah itu, hasil maserasi disaring menggunakan kertas saring untuk memperoleh ekstrak siap pakai yang digunakan dalam pengujian *in vitro* terhadap pertumbuhan *Colletotrichum* sp. (Ibrahim et al., 2021).

3.4.3 Isolasi dan identifikasi *Colletotrichum* sp.

Isolasi *Colletotrichum* sp. dilakukan dari buah cabai yang menunjukkan gejala antraknosa. Bagian buah bergejala dipotong berukuran $\pm 0,5 \times 0,5 \text{ cm}^2$, kemudian direndam dalam larutan natrium hipoklorit 2,5% selama 2,5 menit untuk mengurangi kontaminasi. Potongan tersebut dibilas dengan air bersih, dikeringkan menggunakan tisu, lalu ditanam pada media PDA dalam cawan petri. Cawan diinkubasi selama ± 7 hari pada suhu 26–28 °C (Syabana et al., 2015). Hasil isolasi

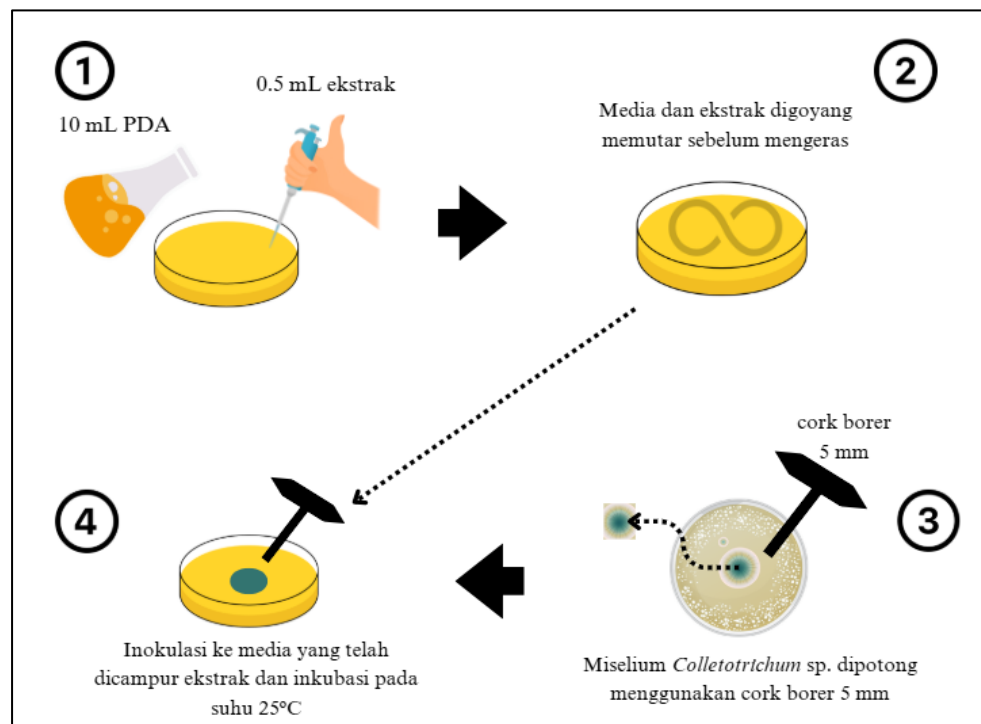
kemudian diremajakan dan dipisahkan jika terdapat perbedaan jenis jamur untuk memperoleh kultur murni. Proses ini dilakukan dengan menginokulasikan satu ose isolat ke dalam medium PDA baru. Setelah peremajaan, jamur diidentifikasi melalui pengamatan makroskopis dan mikroskopis (Nursanti et al., 2021).

3.4.4 Uji patogenisitas

Uji patogenisitas dilakukan untuk memastikan bahwa satu isolat *Colletotrichum* sp. benar-benar patogen pada buah cabai. Uji patogenisitas dilakukan melalui tahapan-tahapan berikut: Pertama, buah cabai merah yang sehat disterilkan dengan alkohol 70% dan dibilas tiga kali dengan air suling steril. Kedua, permukaan buah dilukai dengan jarum steril sedalam 1 mm (6 tusukan dalam pola lingkaran berdiameter 5 mm). Ketiga, cakram miselium *Colletotrichum* berusia 5 hari (diameter 5 mm) ditempatkan di atas luka. Keempat, buah diinokulasi dalam wadah plastik tertutup dengan kelembapan terjaga menggunakan kapas steril yang dibasahi air steril. Terakhir, gejala infeksi diamati setelah 10 hari inkubasi untuk memastikan apakah isolat tersebut menyebabkan penyakit pada buah cabai (Hodiyah et al., 2024).

3.4.5 Pengujian *in vitro*

Pengujian *in vitro* dilakukan dengan menumbuhkan miselium jamur *C. capsici* pada media PDA yang telah ditambahkan ekstrak perlakuan. PDA cair dituangkan sebanyak 10 ml ke dalam cawan petri, kemudian ditambahkan 0,5 ml larutan perlakuan ekstrak serai dan fungisida sintesis, lalu digoyangkan hingga homogen sebelum dibiarkan memadat. Miselium *Colletotrichum* sp. diperoleh dengan memotong biakan murni menggunakan *cork borer* berdiameter 5 mm, kemudian inokulum tersebut diletakkan pada bagian tengah cawan petri yang berisi PDA dengan perlakuan ekstrak. Selanjutnya, cawan petri diinkubasi pada suhu ruang selama 7 hari. Diameter koloni jamur diukur pada hari ke-3, ke-5, dan ke-7 masa inkubasi untuk menentukan persentase daya hambat ekstrak terhadap pertumbuhan jamur.



Gambar 8. Prosedur uji *in vitro*
(Sumber: Dokumentasi Pribadi, 2025)

3.5 Parameter pengamatan

3.5.1 Pengamatan penunjang

Dalam penelitian ini, pengamatan penunjang yang dilakukan adalah mengamati suhu dan kelembapan, morfologi jamur *Colletotrichum* sp. secara makroskopis (tekstur koloni, warna koloni tampak depan dan tampak belakang, konidiomata) dan mikroskopis (bentuk konidia, warna konidia, hifa bersekat atau tidak), karakteristik senyawa ligan ekstrak serai dapur, dan toksisitas senyawa.

3.5.2 Pengamatan utama

Adapun parameter pengamatan utama pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

a. *Root Mean Square Deviation* (RMSD)

Parameter interaksi antara ligan dan reseptor diukur menggunakan nilai *Root Mean Square Deviation* (RMSD). RMSD digunakan untuk mengevaluasi keberhasilan prediksi mode ikatan dan penting dalam validasi program docking. Secara umum, nilai RMSD dianggap baik jika $\leq 2 \text{ \AA}$. Semakin tinggi nilai RMSD,

semakin besar kesalahan dalam prediksi interaksi antara ligan dan reseptor (Brooijmans, 2009).

b. *Binding affinity*

Efektivitas interaksi ligan dengan reseptor dapat ditentukan berdasarkan nilai skor atau energi bebas pengikatan (ΔG_{bind}). Menurut Kartasasmita et al. (2009) dan Ruswanto et al. (2018), semakin kecil nilai skor suatu senyawa ligan terhadap reseptor makromolekulnya, semakin stabil kompleks ligan-reseptor tersebut, dan reaksi cenderung terjadi secara spontan.

c. Diameter koloni

Pengamatan diameter koloni dilakukan terhadap koloni jamur yang tumbuh pada cawan petri untuk tiap unit percobaan. Cara menghitung diameter koloni jamur menggunakan jangka sorong. Pengamatan dilakukan pada hari ke-3, 5, dan 7 setelah inokulasi (Suganda & Satryo Adhi, 2017).

d. Daya hambat ekstrak serai dapur (%)

Daya hambat dihitung dengan menghitung diameter pertumbuhan koloni. Daya hambat dihitung berdasarkan metode Barrera Necha et al. (2004), dengan rumus berikut:

$$IC = \left(\frac{\text{diameter kontrol negatif} - \text{diameter perlakuan}}{\text{diameter kontrol negatif}} \right) \times 100\%$$

Keterangan:

IC = *Inhibition Capacity*