

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Pertanian Universitas Siliwangi. Penelitian dimulai bulan Februari hingga bulan Mei 2025.

3.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya reaktor pirolisis dan perangkat distilasi asap cair, botol penampang, gelas ukur, cawan petri, tabung reaksi, *beaker glass*, labu Erlenmeyer, *laminar air flow* (LAF), bunsen, mikropipet, jarum ose, pinset, spatula, rak kultur, *hot plate*, autoklaf, *corkborer*, *haemocytometer*, jangka sorong, bak plastik, aluminium foil, selotip, plastik wrap, mikroskop, *object glass*, *cover glass*, timbangan analitik, piknometer, termometer bimetal, kompor gas, *wood moisture meter*, tissue, kertas label, kapas, spiritus, kertas lakmus, gunting, korek, kamera dan alat tulis menulis.

Adapun bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah tempurung kelapa, isolat patogen *Colletotrichum* sp. (Laboratorium Proteksi Tanaman), buah cabai rawit varietas ORI 212, media PDA (*Potato Dextrose Agar*) instan merek Himedia, media PDB (*Potato Dextrose Broth*), aquades, alkohol 70%, FeCl₃ 1%, *Phenolphthalein* (PP), NaOH 0,1 N.

3.3 Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan dalam dua tahap yaitu percobaan secara *in vitro* dan percobaan secara *in vivo*, sebagai berikut:

3.3.1. Percobaan *in vitro*

Metode yang digunakan dalam percobaan *in vitro* adalah metode eksperimental dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL), terdiri dari 6 taraf

konsentrasi asap cair tempurung kelapa dalam media PDA. Asap cair ditambahkan ke dalam media agar sebagai perlakuan. Semua perlakuan diulang sebanyak 4 kali ulangan, sehingga terdapat 24 unit percobaan. Konsentrasi (v/v) yang diaplikasikan yaitu sebagai berikut (Mahmud dkk., 2021):

P_0 = tanpa perlakuan (kontrol)

P_1 = konsentrasi 1%

P_2 = konsentrasi 2%

P_3 = konsentrasi 3%

P_4 = konsentrasi 4%

P_5 = konsentrasi 5%

3.3.2. Percobaan *in vivo*

Percobaan *in vivo* merupakan lanjutan dari percobaan *in vitro*, dimana konsentrasi terbaik hasil uji *in vitro* dijadikan sebagai perlakuan kemudian dikali 10. Percobaan ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri 4 taraf perlakuan dan diulang sebanyak 6 ulangan. Setiap unit terdiri dari 5 buah cabai rawit varietas ORI 212, dengan demikian diperoleh 24 unit percobaan dengan jumlah total 120 buah cabai rawit. Konsentrasi (v/v) yang diaplikasikan yaitu sebagai berikut:

K_0 = tanpa perlakuan (kontrol)

$K_a = K_b (\%) - 5$

$K_b = \text{Konsentrasi terbaik } (\%) \times 10$

$K_c = K_b (\%) + 5$

Konsentrasi (v/v) yang diaplikasikan yaitu sebagai berikut:

K_0 = tanpa perlakuan (kontrol)

K_a = 5%

K_b = 10%

K_c = 15%

3.4 Analisis data

Data hasil pengamatan dianalisis untuk mengetahui pengaruh perlakuan yang diberikan terhadap variabel yang diamati menggunakan sidik ragam (Anova) dan kaidah pengambilan keputusan berdasarkan uji F dengan tingkat kepercayaan 95%. Model linier rancangan acak lengkap adalah sebagai berikut:

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

Keterangan:

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

μ : nilai tengah umum

τ_i : pengaruh perlakuan ke-i

ε_{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 2, kemudian diambil keputusan pada Tabel 3.

Tabel 1. Sidik ragam Rancangan Acak Lengkap percobaan *in vitro*

Sumber Keragaman	db	JK	KT	Fhitung	F tabel 5%
Perlakuan (P)	5	$\Sigma P^2 - FK$	JKP/ dbP	KTP/ KTG	2,77
Galat (G)	18	JKT – JKP	JKG/ dbG		
Total (T)	23	$\Sigma T^2 / r - FK$			

Sumber: Gomez dan Gomez, 2015

Tabel 2. Sidik ragam Rancangan Acak Lengkap percobaan *in vivo*

Sumber Keragaman	db	JK	KT	Fhitung	F tabel 5%
Perlakuan (P)	3	$\Sigma P^2 - FK$	JKP/ dbP	KTP/ KTG	3,10
Galat (G)	20	JKT – JKP	JKG/ dbG		
Total (T)	23	$\Sigma T^2 / r - FK$			

Sumber: Gomez dan Gomez, 2015

Tabel 3. Kaidah pengambilan keputusan

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

Sumber: Gomez dan Gomez, 2015

Jika dari uji F terdapat perbedaan nyata, maka dilakukan uji lanjut dengan Uji Jarak Berganda Duncan pada tingkat kepercayaan 95% dengan rumus sebagai berikut:

$$LSR = S_x \times SSR$$

Nilai S_x dapat dicari menggunakan rumus sebagai berikut:

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

Keterangan:

LSR = *Least Significant Ranges*

S_x = galat baku rata-rata

SSR = *Studentized Significant Ranges*

KT Galat = kuadrat tengah galat

r = jumlah ulangan

3.5 Pelaksanaan Penelitian

3.5.1 Sterilisasi alat

Alat-alat laboratorium yang akan digunakan, dilakukan sterilisasi dengan tujuan untuk menghindari adanya kontaminasi. Alat yang akan digunakan dicuci dengan sabun kemudian dikeringkan dan dibungkus dengan kertas dan plastik anti panas. Alat dimasukkan ke dalam autoklaf dan disterilisasi pada suhu 121 °C dalam waktu 20 menit.

3.5.2 Pembuatan media

Media *Potato Dextrose Agar* (PDA) instan merek Himedia ditimbang sebanyak 11,7 gr kemudian dilarutkan dalam 300 mL akuades. Media yang telah dilarutkan kemudian disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 1,5 atm (Aji dan Rahmawati, 2020).

3.5.3 Peremajaan jamur *Colletotrichum* sp.

Isolat *Colletotrichum* sp. diperoleh dari koleksi Laboratorium Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, Universitas Siliwangi. Peremajaan jamur *Colletotrichum* sp. dilakukan dengan cara mengambil koloni jamur menggunakan *cork borer* diameter 5 mm, kemudian koloni tersebut diletakkan menggunakan jarum ose pada cawan petri yang sudah berisi 10 ml media PDA dan diinkubasi selama 7 hari pada suhu ruang (Purba dkk., 2021).

3.5.4 Pembuatan asap cair

Tempurung kelapa didapatkan dari Pasar Cikurubuk, Kota Tasikmalaya. Proses pembuatan asap cair tempurung kelapa dimulai dengan mencacah tempurung kelapa menjadi bagian kecil untuk mempercepat proses pengeringan dan mempermudah memasukan kedalam alat pirolisis, kemudian tempurung kelapa dikeringkan di bawah sinar matahari selama 48 jam (Anisah, 2014). Tempurung kelapa dijemur hingga mencapai kadar air 10%. Pengujian kadar air dilakukan dengan menggunakan alat *wood moisture meter* secara berkala selama proses penjemuran.

Tempurung kelapa sebanyak 20 kg dimasukkan ke reaktor pirolisator kemudian ditutup rapat dan dibakar selama lebih kurang 3 jam dengan suhu akhir pembakaran sekitar 250°C sampai 400°C, pengukuran suhu dilakukan menggunakan termometer bimetal. Asap yang dihasilkan dari pembakaran akan mengalir ke tabung pendingin dan terjadi proses kondensasi sehingga menghasilkan asap cair *Grade 3*. Asap cair ditampung dan didiamkan selama 7 hari untuk memisahkan asap cair dan tar (Wardoyo dkk., 2020). Kemudian asap cair

kasar atau asap cair *Grade 3* ini dimurnikan kembali melalui proses distilasi, sehingga menghasilkan asap cair *Grade 2*. Asap cair *Grade 2* diproses kembali melalui distilasi untuk menghasilkan asap cair *Grade 1*, hal ini menunjukkan kemurnian asap cair lebih tinggi dibandingkan dengan *Grade* sebelumnya. Pada asap cair *Grade 1* ini tidak mengandung tar dan *bio-oil* dengan ciri asap cair yang lebih jernih keemasan.

Asap cair *Grade 1* yang dihasilkan selanjutnya dikarakterisasi untuk mengetahui kualitas asap cair tersebut. Kualitas asap cair diuji dengan mengacu pada standar mutu Jepang. Karakteristik yang diuji meliputi pH, berat jenis, warna, transparansi, kandungan senyawa fenol dan kadar asam (total asam tertitrasi).

3.5.5 Percobaan *in vitro*

Uji penghambatan pertumbuhan koloni jamur *Colletotrichum* sp. dilakukan berdasarkan metode umpan beracun (*food poisoning*) pada media PDA (Ramaiah dan Garampalli, 2015). Pengujian dilakukan dengan cara menambahkan asap cair *Grade 1* ke dalam media PDA sesuai dengan konsentrasi 0%, 1%, 2%, 3%, 4%, dan 5%. Pengujian diawali dengan menambahkan asap cair sebanyak 0; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5 mL yang diperoleh dari perhitungan rumus pada Lampiran 4 dan dicampurkan dengan media PDA, kemudian dituang ke dalam cawan petri dengan masing-masing petri sebanyak 10 mL. Cawan petri diputar agar campuran tersebut merata dan dibiarkan hingga memadat. Setelah media padat, inokulasi patogen *Colletotrichum* sp. pada bagian tengah cawan petri menggunakan *cork borer* dengan diameter 5 mm dan perkembangannya diamati selama 7 hari (Andriyani dan Purwantisari, 2019).

3.5.6 Percobaan *in vivo*

Buah cabai rawit dibersihkan dengan menggunakan alkohol 70% dan air steril 3 kali dan dikeringkan diatas tisu steril. Buah cabai yang telah disterilisasi direndam ke dalam larutan asap cair *Grade 1* selama 60 detik sesuai perlakuan (0%, 5%, 10%, dan 15%) dalam volume 250 mL dengan perhitungan rumus pada

Lampiran 5, kemudian dikeringanginkan. Selanjutnya, suspensi konidia *Colletotrichum* sp. sebanyak 20 μL dengan kerapatan $5 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ diinokulasikan pada bagian tengah buah cabai dengan cara ditusuk menggunakan mikropipet. Kerapatan konidia dihitung dengan rumus pada Lampiran 6. Kemudian, buah dimasukkan ke dalam bak plastik dan diinkubasi selama 7 hari pada suhu ruang. Untuk menjaga kelembaban, bagian bawah bak diisi tisu steril yang telah dibasahi air steril (Dharmaputra dkk., 2016).

3.6 Parameter Pengamatan

3.6.1 Parameter penunjang

a. Karakteristik kualitas asap cair tempurung kelapa

Karakteristik yang diuji meliputi berat jenis, rendemen, warna, transparansi larutan, pH, kadar asam, dan kadar fenol. Standar mutu asap cair spesifikasi Jepang dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Standar mutu asap cair spesifikasi Jepang

Parameter	Nilai Standar Mutu Asap Cair *
pH	1,5 – 3,7
Kadar Asam (%)	1– 18
Berat jenis (g/ml)	>1.0005
Fenol	-
Warna	Kuning – Kecoklatan Merah Pucat – Coklat Kemerahan
Transparansi	Tidak keruh
Bau	-

* Sumber: Yatagai (2002)

Pengujian dalam karakterisasi asap cair sebagai berikut:

- 1) Pengujian berat jenis menggunakan alat piknometer yang dapat mengukur volume larutan dengan akurat. Piknometer ditimbang terlebih dahulu menggunakan neraca analitik berskala 10^{-2} g. Kemudian, piknometer ditambahkan aquades hingga penuh lalu ditimbang kembali. Langkah yang

sama dilakukan untuk menghitung bobot jenis asap cair. Perhitungan bobot jenis asap cair dilakukan dengan menggunakan rumus berikut (Diatmika, 2019):

Volume piknometer (ml):

$$V = \frac{(\text{piknometer (g)+air}) - (\text{piknometer kosong (g)})}{\rho \text{ air}}$$

Bobot jenis (g/mL):

$$\rho = \frac{\text{bobot bahan (g)}}{\text{volume piknometer (mL)}}$$

- 2) Rendemen dihitung menggunakan data dari perhitungan bobot jenis menggunakan rumus (Mahdie dkk., 2020):

$$\% \text{ rendemen} = \frac{\text{berat produk yang dihasilkan (g)}}{\text{berat sampel awal (mL)}} \times 100\%$$

- 3) Pengujian warna dilakukan secara kualitatif dengan menggunakan aplikasi *Android Colorimeter Lab Tools*. Kamera yang digunakan untuk mengambil gambar asap cair yaitu *smartphone* Redmi Note 10. Gambar yang diunggah akan diproses pada aplikasi untuk menentukan warna dan panjang gelombang.
- 4) Pengujian pH dilakukan dengan menggunakan alat indikator pH universal (kertas lakmus). Ujung indikator terdiri dari beberapa baris warna dicelupkan ke dalam larutan asap cair hingga warna pada indikator berubah. Kemudian warna pada indikator dibandingkan dengan baris warna yang terdapat pada kemasan alat untuk mendapatkan data angka pH.
- 5) Kadar fenol diuji secara kualitatif dengan menambahkan 5 tetes pereaksi FeCl_3 1% ke dalam tabung reaksi yang berisi 5 ml asap cair. Tabung reaksi dikocok hingga larutan homogen. Apabila asap cair mengandung fenol maka larutan akan mengalami perubahan warna menjadi ungu atau coklat.

- 6) Pengujian kadar asam asap cair dilakukan dengan menggunakan metode titrimetri. Buret yang akan digunakan dibilas terlebih dahulu sebanyak tiga kali menggunakan aquades untuk memastikan tidak ada sisa larutan sebelumnya. Kemudian buret diisi dengan larutan NaOH 0,1 N hingga mencapai angka 1 ml. Larutan sampel sebanyak 1 ml dilarutkan dengan aquades hingga volumenya menjadi 10 ml, kemudian ditambahkan indikator *Phenolphthalein* (PP) sebanyak 3 tetes. Selanjutnya dilakukan titrasi hingga larutan sampel berubah warna menjadi merah muda stabil. Kadar asam dihitung dengan menggunakan rumus (Diatmika dkk., 2019):

$$\text{Kadar asam} = \frac{V \times N \times \text{BM}}{\text{BC} \times 1000} \times 100\%$$

Keterangan:

V = volume NaOH (ml)

N = konsentrasi NaOH (N)

BM = Berat molekul CH_3COOH

BC = Berat sampel (g)

3.6.2 Parameter utama

a. Pengamatan *in vitro*

1) Uji Daya Hambat

Parameter yang diamati yaitu diameter patogen dan persentase penghambatnya yang diukur mulai 3 HSI, 5 HSI, dan 7 HSI. Rumus persentase penghambatan patogen yaitu (Shentu dkk., 2014):

$$P (\%) = \frac{(\text{DK} - \text{DP})}{\text{DK}} \times 100\%$$

Keterangan:

P = persentase penghambatan pertumbuhan patogen

DK = diameter koloni patogen pada perlakuan kontrol

DP = diameter koloni patogen pada perlakuan

b. Pengamatan *in vivo*

1) Masa inkubasi

Masa inkubasi merupakan waktu yang diperlukan patogen untuk melakukan infeksi dihitung berdasarkan waktu gejala pertama muncul pada buah cabai setelah inokulasi (Syabana dkk., 2015).

2) Kejadian Penyakit

Parameter kejadian penyakit (*disease incidence*) menunjukkan persentase buah cabai yang terserang penyakit dibandingkan total buah cabai yang ada dan diamati selama 7 HSI dengan menggunakan rumus sebagai berikut (Wanda dkk., 2014):

$$KP = \frac{n}{N} \times 100\%$$

Keterangan:

KP = kejadian penyakit

n = jumlah buah yang terinfeksi

N = jumlah buah yang diamati

3) Intensitas Serangan

Intensitas serangan penyakit antraknosa diamati selama 7 HSI dan ditentukan dengan menggunakan rumus Zeck (Supratoyo, 1997) sebagai berikut:

$$I = \frac{\sum (ni \times vi)}{N \times Z} \times 100\%$$

Keterangan:

I = Intensitas serangan penyakit antraknosa

ni = Jumlah buah yang sakit dalam skala vi

vi = Nilai skala atau skor tiap kategori serangan

N = Jumlah buah yang diamati

Z = Skor serangan tertinggi

Nilai kategori serangan (skor) untuk penyakit antraknosa didasarkan pada skala kerusakan tanaman yang terserang penyakit antraknosa (Herwidyarti dkk., 2013). Nilai kategori serangan (skor) sebagai berikut:

Tabel 5. Skoring intensitas penyakit antraknosa pada cabai

Nilai Skor	Keterangan
0	tidak ada gejala penyakit antraknosa
1	1 - 20% bercak pada bagian buah cabai
2	21 - 40% bercak pada bagian buah cabai
3	41 - 60% bercak pada bagian buah cabai
4	61 - 80% bercak pada bagian buah cabai
5	81 - 100% bercak pada bagian buah cabai

(Sumber: Herwidyarti dkk., 2013)

4) Susut bobot buah

Pengukuran susut bobot buah dilakukan dengan menimbang buah cabai sebelum dan sesudah pengamatan menggunakan rumus sebagai berikut (Syabana dkk., 2015):

$$\text{Susut bobot} = \frac{b_1 - b_2}{b_1} \times 100\%$$

Keterangan:

b_1 = bobot awal

b_2 = bobot akhir