

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan waktu penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret 2025 sampai Mei 2025 yang berlokasi di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Pertanian Universitas Siliwangi, Kota Tasikmalaya.

3.2 Alat dan bahan

3.2.1 Alat

a. Alat yang Digunakan pada *In Silico*

Alat yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari dua perangkat, yaitu perangkat keras dan perangkat lunak. Perangkat keras yang digunakan pada penelitian ini adalah Laptop Asus P2430UA dengan spesifikasi processor Intel Core I3-6006U *with* Intel HD Graphics 520, RAM 8 GB, Memori 256 SSD, dan 512 GB Harddisk. Perangkat lunak yang digunakan ialah memprediksi toksisitas tanaman berupa aktivitas herbisida menggunakan CropCSM (https://biosig.lab.uq.edu.au/crop_csm/), dan memprediksi toksisitas organ-organ manusia menggunakan ProTox 3.0 (<https://tox.charite.de/protox3/>), aplikasi PyRx 0.8, Discovery Studio 2019 Client, PyMOL, situs website SWISSADME (<http://lmmd.ecust.edu.cn/admet2/>), Screening data mining dengan situs PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) dan PDB (Protein data bank) (<https://www.rcsb.org/>). Perangkat lunak ini digunakan untuk mengaplikasikan metode *in silico*, penggunaan ini dapat mengetahui toksisitas dan nilai *scoring* dari penambahan senyawa dengan ligan.

b. Alat yang Digunakan pada *In Vitro* dan *In Vivo*

Alat yang digunakan untuk pengujian *in vitro* dan *in vivo* yaitu cawan petri, *haemocytometer*, bunsen, tabung reaksi, timbangan digital, gelas ukur, pipet tetes, pinset, korek api, *laminar air flow*, mikroskop, oven, *autoclave*, rotamixer, labu erlenmeyer, nampan, alat tulis, jarum ose, mikropipet, kaca preparat, penggaris, aluminium foil, plastik cling wrap dan label.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini ialah buah cabai merah, biakan *Colletotrichum* sp. berkode BKBB, minyak atsiri biji kelor, fungisida berbahan aktif mancozeb, alkohol, aquades, media PDA antibiotik, NaOCL 0,5%, beberapa struktur 2D dari senyawa ligan kontrol, struktur 3D dan 2D dari senyawa ligan hasil GC-MS pada biji kelor dan struktur 3D reseptor. Reseptor target (makromolekul) yang akan digunakan ialah protein/enzim Cutinase yang diunduh melalui situs website PDB (*Protein Data Bank*).(<https://www.rcsb.org/>).

3.3 Metode penelitian

3.3.1 *In Silico*

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksploratif untuk mengetahui penambatan ligan dari senyawa metabolit sekunder pada biji kelor (*Moringa oleifera* L.) terhadap reseptor yang berperan penting dalam penularan kepada inang yaitu protein/enzim cutinase dengan menggunakan metode *molecular docking*. Penelitian ini menggunakan variabel tunggal yaitu potensi kandungan senyawa pada biji kelor (*Moringa oleifera* L.) yang dapat dijadikan pestisida nabati untuk *Colletotrichum* sp. pada Cabai (*Capsicum annuum* L.).

3.3.2 *In Vitro*

Metode yang digunakan dalam percobaan *in vitro* adalah metode eksperimental dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL), terdiri dari 6 taraf perlakuan yaitu, kontrol negatif dan positif, serta perlakuan minyak atsiri biji kelor dalam media PDA. Semua perlakuan diulang sebanyak 5 kali. Konsentrasi (v/v) yang diaplikasikan berdasarkan pada penelitian Nugraheni dkk. (2014) yang menggunakan minyak atsiri serai wangi terhadap *C. gloeosporioides* dengan konsentrasi 500 ppm, 750 ppm, 1000 ppm, 1250 ppm, dan 1500 ppm, penggunaan konsentrasi tersebut dirasa cukup untuk penggunaan minyak atsiri. Konsentrasi (v/v) yang digunakan yaitu sebagai berikut:

P1 = Kontrol negatif (tanpa aplikasi minyak atsiri biji kelor)

P2 = Kontrol positif (menggunakan mancozeb)

P3 = minyak atsiri biji kelor 750 ppm

P4 = minyak atsiri biji kelor 1000 ppm

P5 = minyak atsiri biji kelor 1250 ppm

P6 = minyak atsiri biji kelor 1500 ppm

Model linier dari Rancangan Acak Lengkap adalah sebagai berikut:

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

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. Sidik ragam Rancangan Acak Lengkap *in vitro*

Sumber Keragaman	db	JK	KT	Fhitung	F tabel 5%
Perlakuan (P)	5	$\sum P^2 - FK$	$\frac{JK_p}{db_p}$	$\frac{KT_p}{KT_G}$	2,62
Galat (G)	24	$JK_T - JK_P$	$\frac{JK_G}{db_G}$		
Total (T)	29	$\frac{\sum T^2}{r} - FK$			

Sumber: Gomez & Gomez (2015)

Tabel 2. 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 & Gomez (2015)

Jika dari uji F dari hasil uji *in vitro* terdapat perbedaan yang nyata, 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 sebagai berikut:

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

Keterangan: LSR = Least Significant Ranges

S_x = galat baku rata-rata S

SR = Studentized Significant Ranges

KT Galat = kuadrat tengah galat

r = jumlah ulangan

3.3.3 *In Vivo*

Percobaan *in vivo* merupakan lanjutan dari percobaan *in silico* dan *in vitro*. Percobaan ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) terdiri dari 6 taraf perlakuan yang masing-masing diulang 5 kali. Perlakuan yang sama namun dikali 2. Perlakuan tersebut sebagai berikut:

P1 = Kontrol negatif (tanpa aplikasi minyak atsiri biji kelor)

P2 = Kontrol positif (menggunakan mancozeb)

P3 = minyak atsiri biji kelor 750 ppm

P4 = minyak atsiri biji kelor 1000 ppm

P5 = minyak atsiri biji kelor 1250 ppm

P6 = minyak atsiri biji kelor 1500 ppm

Model linier dari Rancangan Acak Lengkap adalah sebagai berikut:

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

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 3. Sidik ragam Rancangan Acak Lengkap

Sumber Keragaman	db	JK	KT	Fhitung	F tabel 5%
Perlakuan (P)	5	$\sum P^2 - FK$	$\frac{JK_p}{db_p}$	$\frac{KT_p}{KT_G}$	2,62
Galat (G)	24	$JK_T - JK_P$	$\frac{JK_G}{db_G}$		
Total (T)	29	$\frac{\sum T^2}{r} - FK$			

Sumber: Gomez & Gomez (2015)

Tabel 4. 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 & Gomez (2015)

Sedangkan jika dari uji F dari hasil uni *in vivo* terdapat perbedaan yang nyata, maka dilakukan uji lanjutan dengan Uji Berbeda Nyata Terkecil pada tingkat kepercayaan 95% dengan rumus berikut:

$$Sd = \sqrt{\frac{2 KT_{galat}}{r}}$$

Uji BNT 5% = (t.0.5 db. galat). sd

Keterangan:

Sd = galat baku beda rataaan

KT Galat = kuadrat tengah galat

r = jumlah ulangan

3.4 Prosuder kerja

3.4.1 *In Silico*

1. Kemiripan Pestisida dan Prediksi Toksikitas

Prosedur kerja dalam mencari kemiripan pestisida dan prediksi toksikitas. Untuk kemiripan menggunakan website SwissAdme dengan memasukan *SMILES* dengan kolom yang tersedia dan yang telah dicari dari website Pub Chem. Untuk memprediksi toksikitas dengan menyalin *SMILES* yang terdapat pada senyawa yang telah dicari di *website* PubChem, kemudian *SMILES* tersebut masukan kedalam kolom yang teresedia pada *website* CropCSM dan ProTox 3.0. Memprediksi toksikitas tanaman berupa aktivitas herbisida menggunakan CropCSM (https://biosig.lab.uq.edu.au/crop_csm/) dan memprediksi toksikitas organ-organ manusia menggunakan ProTox 3.0 (<https://tox.charite.de/protox3/>). Setelah itu akan diperlihatkan hasil dari prediksi tersebut, dengan setiap *website* memiliki tabel hasil yang berbeda-beda.

2. *Screening data mining* (Pencarian struktur tiga dimensi dan dua dimensi serta prediksi aktivitas biologi)

a. Pencarian struktur ligan 3D dan 2D

Prosedur kerja dalam mencari struktur ligan 3D dan 2D yaitu 2 senyawa tertinggi dan terendah (rel.Area) dari hasil GC-MS yang dicari di situs *website* PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) lalu didownload dalam bentuk sdf.

b. Pencarian Struktul makromolekul target

Prosedur kerja dalam mencari struktur makromolekul target yaitu dengan ditentukannya makromolekul yang akan menjadi target reseptor yaitu Cutinase. Kemudian diunduh dalam bentuk format .pdb melalui situs *website* PDB (Protein Data Bank) (<https://www.rcsb.org/>).

3. *Preparation* (penyiapan struktur ligan dan makromolekul)

a. Preparasi ligan

Prosedur kerja dalam penyiapan ligan dilakukan dengan menggunakan *autodock tools*. Dengan cara ligan yang telah diunduh dalam format sdf. Diinput ke dalam *autodock tools* pada aplikasi PyRx 0.8 yaitu pada *open babel* kemudian

senyawa ligan tersebut di *minimized selected* lalu di *convert to pdb* kemudian disimpan dalam bentuk format *pdqt*.

b. Preparasi makromolekul

Prosedur kerja dalam penyiapan makromolekul dilakukan dengan menggunakan *Discovery studio*. Dengan cara protein yang telah diunduh dalam format *pdb* diinput ke dalam aplikasi *discovery studio* kemudian dipisahkan dari senyawa lainnya selain protein dan *active site* lalu disimpan dalam bentuk format *pdb*.

c. Penambatan molekul dan *scoring*

Prosedur kerja dalam penambatan molekul dilakukan dengan cara menggunakan *PyRx 0.8* dengan cara ligan dan makromolekul (protein) yang telah dipreparasi dan diunduh dalam format *pdb* ditambahkan ke dalam *vina wizard* yang terdapat pada aplikasi *PyRx 0.8* kemudian diklik *forward* lalu ditempatkan *grid box* yang disesuaikan dengan *active site* setiap protein. Setelah itu dilanjutkan *forward* dan ditunggu hasil *scoring*-nya kemudian hasil tersebut disimpan.

4. Analisis hasil penambatan (scoring)

Prosedur kerja dalam analisis hasil penambatan dilakukan dengan menggunakan *PyMOL* dan *Discovery studio* dengan menggunakan hasil *scoring* yang telah dilakukan. Selanjutnya prosedur kerja dalam visualisasi interaksi ikatan dalam bentuk 3D dan 2D dilakukan dengan menggunakan aplikasi *Discovery studio* dengan cara hasil analisis pada *PyMOL* yang telah disimpan dalam bentuk *pdb* input ke dalam *Discovery studio* kemudian dilihat interaksinya secara 3D dan 2D.

3.4.2 In Vitro

1. Sterilisasi Alat

Alat yang digunakan dalam uji *in vitro* disterilisasi dengan cara dicuci memakai sabun terlebih dahulu untuk membersihkan dari kontaminan yang menempel pada permukaan alat. Alat kemudian dikeringkan dan dibungkus kertas dan plastik anti panas. Alat dimasukkan ke dalam autoklaf, kemudian disterilisasi pada suhu 121°C selama 20 menit. Peralatan yang tidak bisa diautoklaf disterilisasi dengan alkohol 70% seperti tabung suntikan, dan mikropipet.

2. Pembuatan Minyak Atsiri Biji Kelor

Minyak atsiri dibeli dari sebuah toko bernama Indoplant Yogyakarta yang berada di *e-commerce* Tokopedia, dalam deskripsi produk pada kolom tersebut menyatakan bahwa murni minyak biji kelor dan juga dengan proses penyulingan.

Minyak atsiri biji kelor dipisah dengan metode penyulingan, dengan proses air dan uap atau disebut sistem kukus atau sistem uap tak langsung. Prinsip kerja penyulingan ini adalah sebagai berikut : ketel penyulingan diisi air sampai pada batas saringan. Bahan baku diletakkan di atas saringan, sehingga tidak berhubungan langsung dengan air yang mendidih, tetapi akan berhubungan dengan uap air. Air yang menguap akan membawa partikel minyak atsiri dan dialirkan melalui pipa ke alat pendingin, sehingga terjadi pengembunan dan uap air yang bercampur minyak atsiri tersebut akan mencair kembali, selanjutnya dialirkan ke alat pemisah untuk memisahkan minyak atsiri dari air (Zaituni dkk., 2016).

3. Peremajaan Isolat *Colletotrichum* sp.

Colletotrichum sp. isolat diperoleh dari koleksi Laboratorium Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, Universitas Siliwangi. Isolat koleksi diremajakan dengan cara mengkultur ulang pada cawan petri yang mengandung 10 ml media PDA (*in vitro*) dan PDB (*in vivo*). Isolat hasil peremajaan digunakan untuk pengujian *in vitro* dan *in vivo*.

4. Pengujian *In Vitro*

Pengujian *in vitro* dilakukan untuk mengetahui daya hambat minyak atsiri biji kelor terhadap isolat jamur *Colletotrichum* sp. pengujian daya hambat menggunakan metode *Poison Food Technique* dilakukan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 5 taraf perlakuan yaitu kontrol negatif (P1), kontrol positif dengan mancozeb (P2), minyak atsiri biji kelor 750 ppm (P3), minyak atsiri biji kelor 1000 ppm (P4), minyak atsiri biji kelor 1250 ppm (P5), minyak atsiri biji kelor 1500 ppm (P6). Sebagai kontrol digunakan aquades steril tanpa penambahan perlakuan (kontrol negatif). Cawan petri ditambahkan 10 ml PDA steril yang masih encer dan diputar secara simultan sampai media merata dan dibiarkan memadat, lalu jamur diambil dengan cobborer ke dalam cawan petri steril menggunakan mikropipet atau jarum ose setelah media PDA memadat.

3.4.3 Pengujian *In Vivo*

Pengujian *in vivo* mengacu pada penelitian Arie dkk. (2015) dengan memodifikasi, cabai merah sehat disterilkan menggunakan alkohol 95% lalu dibilas dengan aquades steril. Buah dilukai dengan menggunakan jarum steril sebanyak 5 tusukan buah cabai merah dengan kedalaman 2 mm, setelah itu minyak atsiri tanaman uji diaplikasikan dengan perendaman selama 5 menit sesuai perlakuan pada buah cabai merah. Kemudian buah cabai diinfeksi dengan suspensi *Colletotrichum* sp. sebanyak 10 μ L hasil dari pengenceran larutan induk. Pengenceran dilakukan hingga 10⁻¹. Kerapatan spora dalam suspensi inokulum yang didapat adalah 6,6x10⁶ konidia/ml yang dihitung dengan haemasitometer. Buah cabai merah yang telah diberi perlakuan diinkubasi selama 7 hari pada kondisi gelap dan terang masing-masing 12 jam, serta pada suhu kamar.



Gambar 8. Prosedur *in vivo*

3.5 Parameter penelitian

3.5.1. Parameter penunjang

1. Karakteristik minyak atsiri biji kelor

Pengujian karakteristik minyak atsiri dilakukan untuk mengetahui kualitas minyak atsiri biji kelor yang dihasilkan. Karakteristik yang diuji berupa warna, ph, dan GC-MS. Tahapan pengujian karakteristik ekstrak sebagai berikut:

- a. Pengujian warna dilakukan secara kualitatif dengan melihat secara visual.
- b. Pengujian pH dilakukan dengan menggunakan alat indikator pH universal. Ujung indikator yang terdapat beberapa lapis warna dicelupkan pada ekstrak minyak atsiri biji kelor hingga warna pada indikator berubah. Kemudian warna pada indikator dibandingkan dengan baris warna yang terdapat pada kemasan alat untuk mendapatkan data angka pH.
- c. Analisis komposisi senyawa ekstraknya dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT), Universitas Gajah Mada dengan menggunakan metode Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS). Analisis senyawa GC-MS dilakukan dengan menggunakan GC-QP2010 (Shimadzu) yang dilengkapi dengan kolom kapiler silika fusi Omega Wax TM250 ID (30 m x 0,25 mm, ketebalan film 0,25 μ m). Instrumen diatur ke suhu awal 100°C dan suhu injeksi 270°C dengan laju aliran kolom adalah 1,21 ml/menit. Gas pembawa adalah helium dengan laju aliran satu ml/menit dan kecepatan linier 35 cm/detik. Semua senyawa diidentifikasi dengan perbandingan spektra massa dan data indeks retensi komponen yang diketahui ditemukan dalam literatur dan database spektrum yang disimpan di perpustakaan GC-MS. Data komposisi senyawa yang terdeteksi dengan GC-MS ditampilkan secara deskriptif dengan menggunakan Tabel (Putri dkk., 2022).

2. Uji patogenesis *Colletotrichum* sp.

Prosedur uji patogenesis diadaptasi dari Syukur dkk. (2009) yaitu sebagai berikut buah dicuci dengan akuades dan disterilkan permukaannya dengan merendam pada larutan NaOCL 3% selama 60 detik kemudian dibilas dengan akuades steril. Bak plastik disiapkan dan agar terjaga kelembapannya bak dialasi tisu yang dibasahi dengan akuades steril. Setiap spesimen dilukai menggunakan jarum steril, buah masing-masing diletakkan ke dalam bak. Setiap buah diinokulasikan potongan jamur ukuran 0,5 cm x 0,5 cm. perubahan morfologi diamati pada buah cabai pada hari ke-3, 5, dan 7.

3. Toksikitas kepada Manusia maupun lingkungan

Prediksi sifat toksikitas menggunakan beberapa situs *website* untuk memprediksi toksikitas kontak akut terhadap lebah madu, estimasi ruang lingkup penerapan, pemetaan kontribusi, toksikitas terhadap burung, toksikitas biokonsentrasi, toksikitas biodegradasi, toksikitas terhadap ikan, toksikitas terhadap organ manusia, toksikitas terhadap kehamilan, berat molekul, logaritma koefisien partisi oktanol/air (LogP), jumlah ikatan rotasi, penerimaan donor ikatan hydrogen, luas permukaan, nilai prediksi molekul, kepercayaan prediksi molekul. Sebelum melakukan penambatan untuk memprediksi toksikitas perlu disiapkan struktur senyawa dalam bentuk 2D dan 3D. Selanjutnya dapat di proses untuk memprediksi toksikitas senyawanya melalui situs *website* tersebut.

3.5.2. Parameter utama

1. *In Silico*

a. Scoring antara ligan dan reseptor

Untuk menentukan interaksi ligan mana yang efektif dengan reseptor dapat ditentukan dari nilai *scoring* atau nilai energi bebas pengikatan ΔG_{bind} . Menurut Ruswanto dkk. (2018) Semakin kecil nilai *scoring* dari suatu senyawa ligan yang diuji dengan makromolekul reseptornya maka kompleks ligan dan reseptor tersebut akan semakin stabil serta reaksinya terjadi secara spontan.

Tabel 5. Ketentuan scoring ΔG_{bind} yang efektif

No	Scoring (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. Interaksi antara ligan dan reseptor

Parameter untuk interaksi antara ligan dan reseptor adalah nilai *Root Mean Square Deviaton* (RMSD). RMSD ialah nilai yang digunakan untuk menentukan prediksi modus ikatan tersebut berhasil dan penting untuk divalidasi program docking. Pada umumnya, nilai RMSD dilakukan baik jika $\leq 2 \text{ \AA}$. Semakin besar

penyimpangan maka semakin besar juga kesalahan pada prediksi interaksi antara ligan dengan reseptor (Brooijmans, 2009).

2. *In Vitro*

- a. Daya hambat pertumbuhan *Colletotrichum* sp.

Pengujian daya hambat dilakukan berdasarkan pada penelitian Suganda dkk. (2023) dengan menggunakan metode *Poison Food Technique*. Perhitungan daya hambat diawali dengan menghitung diameter koloni lalu dihitung persentase penghambatnya, pengukuran dilakukan pada 3 HSI, 5 HSI dan 7 HSI

. Rumus diameter yang digunakan ialah:

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

Keterangan :

D : Diameter koloni jamur (cm)

d1 : Diameter vertikal koloni jamur (cm)

d2 : Diameter horizontal koloni jamur (cm)

persentase penghambatan masing-masing perlakuan dengan rumus :

$$P = \frac{D1 - D2}{D1} 100\%$$

Keterangan :

P : Persentase penghambat (%)

d1 : Diameter koloni jamur kontrol (cm)

d2 : Diameter koloni jamur setiap perlakuan (cm)

4. *In Vivo*

- a. Masa inkubasi (hari) *Colletotrichum* sp.

Masa inkubasi merupakan waktu yang diperlukan patogen untuk melakukan infeksi dihitung berdasarkan waktu gejala pertama muncul pada buah cabai setelah inokulasi.

- b. Diameter lesi *Colletotrichum* sp.

Pengamatan diameter lesi pada buah dilakukan menggunakan jangka sorong digital yang diukur mulai 3 HSI, 5 HSI, dan 7 HSI. Diameter lesi ditentukan dari rerata diameter secara melintang dan membujur dari pusat infeksi setiap buahnya, dengan rumus sebagai berikut:

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

Keterangan :

D : Diameter jamur

d1 : Diameter vertikal (cm)

d2 : Diameter horizontal (cm)

c. Intensitas serangan *Colletotrichum* sp.

Cendawa dihitung berdasarkan skor luas bercak, kemudian diidentifikasi berdasarkan kriteria ketahanan tanaman penyakit (Roha dkk., 2013. Rumus yang digunakan yaitu:

$$IS = \sum \frac{(n \times V)}{(Z \times N)} \times 100 \%$$

Keterangan:

IS = Intensitas serangan

n = jumlah buah setiap kelas bercak

V = nilai skor setiap kelas bercak

N = 4 jumlah buah yang diamati

Z = nilai skor kelas luas bercak yang tertinggi.

Nilai kategori serangan sebagai berikut:

0 = tidak ada serangan

1 = < 10% luas permukaan buah yang terserang

2 = >10% - 20% luas permukaan buah yang terserang

3 = >20%-30% luas permukaan buah yang terserang

4 = >30%-40% luas permukaan buah yang terserang

5 = >40% luas permukaan buah yang terserang