

## **BAB III**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

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

Penelitian *in vitro* dilaksanakan pada bulan Februari 2025, bertempat di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Pertanian Universitas Siliwangi. Adapun pengujian *in vivo* dilaksanakan pada bulan Maret sampai dengan April 2025, bertempat di rumah plastik Kel. Mugarsari, Kec. Tamansari, Kota Tasikmalaya.

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

Peralatan yang digunakan pada percobaan ini di antaranya reaktor pirolisis dan perangkat distilasi asap cair, botol penampung, gelas ukur, tabung reaksi, *beaker glass*, erlenmeyer, jarum ose, *cork borer*, cawan petri, spatula, pinset, ose, sput, mikropipet, timbangan analitik, bunsen, kompor gas, *laminar air flow* (LAF), timbangan, haemocytometer, *hygrometer* digital, autoklaf, baki plastik, jangka sorong, penggaris, pipet, gelas objek, sput, mikroskop, piknometer, penggaris, alat tulis, tray, cangkul, polybag, *smartphone*, laptop dan alat tulis.

Adapun bahan-bahan yang digunakan di antaranya yaitu limbah tongkol jagung, media *Potato Dextrose Agar* (PDA), *Potato Dextrose Broth* (PDB), akuades (air suling), plastik wrap, alumunium foil, isolat *Fusarium* sp. koleksi Laboratorium Proteksi Fakultas Pertanian Universitas Siliwangi, NaOH 0,1 N,  $\text{FeCl}_3$  1%, alkohol 70%, Phenolphyhalein (PP), tissue, indikator universal, tanah, benih cabai rawit varietas RJHL 085, dan pupuk kompos.

#### **3.3 Metode penelitian**

Metode yang dilakukan pada penelitian *in vitro* dan *in vivo* yaitu dengan menggunakan metode eksperimental.

##### **3.3.1 Percobaan *in vitro***

Pengujian *in vitro* merupakan kegiatan pra penelitian untuk menentukan konsentrasi yang akan digunakan pada percobaan secara *in vivo*. Percobaan ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL), terdiri dari 5 perlakuan asap cair dan diulang sebanyak 5 kali, sehingga terdapat 25 petri.

Konsentrasi asap cair yang digunakan pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

$K_0$  = tanpa asap cair 0% (kontrol)

$K_1$  = asap cair 1,5 %

$K_2$  = asap cair 3 %

$K_3$  = asap cair 4,5 %

$K_4$  = asap cair 6 %

### 3.3.2 Percobaan *in vivo*

Pengujian *in vivo* merupakan tahap lanjutan dari pengujian *in vitro*, diambil konsentrasi asap cair terbaik yang dapat menghambat pertumbuhan patogen *Fusarium* sp. pada uji *in vitro*. Percobaan ini menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) dengan 4 taraf perlakuan dan diulang sebanyak 6 kali, sehingga terdapat 24 plot percobaan. Setiap petak percobaan terdiri dari 4 polibag tanaman cabai, sehingga terdapat 96 polibag. Masing-masing polibag ditanam satu bibit tanaman cabai, dengan seluruh populasi tanaman dijadikan sebagai sampel penelitian. Konsentrasi asap cair yang diaplikasikan yaitu sebagai berikut:

$K_0$  = tanpa asap cair 0% (kontrol)

$K_1$  = asap cair 1,5%

$K_2$  = asap cair 3%

$K_3$  = asap cair 4,5%

### 3.4 Analisis data

Data yang diperoleh dari hasil percobaan kemudian dianalisis untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap variabel yang diamati dengan sidik ragam dan kaidah pengambilan keputusan berdasarkan uji F.

Metode linier dari Rancangan Acak Lengkap (RAL) dan Rancangan Acak Kelompok (RAK) menurut (Gomez dan Gomez, 2010) sebagai berikut:

Rancangan Acak Lengkap (RAL):

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

Rancangan Acak Kelompok (RAK):

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

Dengan :

$Y_{ij}$  = Respon atau nilai pengamatan perlakuan ke-I dan ulangan ke-j

$\mu$  = Nilai rataan umum

$\tau_i$  = Pengaruh perlakuan ke-i

$\beta_j$  = Pengaruh ulangan ke-j

$\varepsilon_{ij}$  = Pengaruh acak pada perlakuan ke-I dan ulangan ke-j

Berdasarkan model linier tersebut disusun dalam daftar sidik ragam pada pengujian *in vitro* sebagaimana tabel berikut ini.

Tabel 1. Sidik ragam uji *in vitro*

Sumber ragam	db	JK	KT	Fhit	Ftab 5%
Perlakuan	4	$\sum \frac{xt^2}{r} - FK$	$\frac{JKP}{dbP}$	$\frac{KTP}{KTG}$	2,87
Galat	20	$JKT - JKP$	$\frac{JKG}{dbG}$		
Total	24	$\sum X^2 - FK$			

Sumber: Gomez dan Gomez, (2010)

Kemudian, model linier disusun dalam daftar sidik ragam untuk pengujian *in vivo* sebagaimana tabel berikut ini.

Table 2. Sidik ragam uji *in vivo*

Sumber ragam	db	JK	KT	Fhit	Ftab 5%
Ulangan	5	$\frac{\sum r^2}{t} - FK$	$\frac{JKU}{dbU}$	$\frac{KTU}{KTG}$	2,90
Perlakuan	3	$\frac{\sum t^2}{r} - FK$	$\frac{JKP}{dbP}$	$\frac{KTP}{KTG}$	3,29
Galat	15	$JKT - JKP - JKU$	$\frac{JKG}{dbG}$		
Total	23	$\sum X^2 - FK$			

Sumber: Gomez dan Gomez (2010)

Pengaruh perlakuan yang diberikan terhadap jamur *Fusarium* sp. diketahui dengan menggunakan uji F.

Tabel 3. Kaidah pengambilan keputusan

Hasil analisis	Analisis	Kesimpulan
$F \text{ hit} \leq 0,05$	Tidak berbeda nyata	Tidak ada perbedaan pengaruh antara perlakuan
$F \text{ hit} > 0,05$	Berbeda nyata	Ada perbedaan pengaruh antara perlakuan

Sumber: Gomez dan Gomez, (2010)

Apabila hasil uji F menunjukkan berpengaruh nyata, maka akan dilakukan uji lanjut dengan menggunakan Uji Jarak Berganda Duncan pada taraf nyata 5% dengan rumus sebagai berikut:

$$LSR = SSR(\alpha. dbg. p) \times S_x$$

Nilai  $S_x$  dihitung dengan rumus sebagai berikut:

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

Keterangan:

LSR	= <i>Least significant range</i>
SSR	= <i>Studenties significant ranges</i>
$\alpha$	= Taraf nyata
$dbg$	= Derajat bebas galat
$p$	= <i>Range</i> (perlakuan)
$S_x$	= Galat baku rata-rata ( <i>Standard Error</i> )
KT Galat	= Kuadrat tengah galat
r	= Jumlah ulangan

### 3.5 Pelaksanaan penelitian

#### 3.5.1 Sterilisasi alat

Seluruh peralatan yang digunakan dalam uji *in vitro* dicuci dengan menggunakan sabun cuci, dibilas, kemudian dikeringkan. Alat-alat yang sudah kering dibungkus dengan kertas dan plastik tahan panas. Semua alat tersebut

disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit (Wulandari dkk, 2021). Alat-alat yang tidak tahan panas dapat disterilisasi menggunakan alkohol 70%.

### 3.5.2 Pembuatan media PDA

Media kultur yang digunakan adalah media *Potato Dextro Agar* (PDA). Media dibuat dengan cara mencampurkan 39 g PDA ke dalam 1-liter akuades kemudian dihomogenkan dan dipanaskan selama ± 15 menit atau sampai media mendidih. Media yang sudah dipanaskan kemudian disterilisasikan menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1,5 atm (Wulandari dkk., 2021).

### 3.5.3 Pembuatan asap cair

Tongkol jagung didapat dari petani di Desa Handapherang, Kecamatan Cijeungjing, Kabupaten Ciamis. Tongkol jagung yang digunakan sudah melalui penyimpanan selama ± satu bulan. Kriteria tongkol jagung yang baik untuk dijadikan sebagai asap cair yaitu saat tongkol jagung sudah matang dan kering, terlihat dari warna biji yang berwarna kuning kecoklatan, tekstur yang keras, dan biji yang sudah penuh. Tongkol jagung dalam kondisi sehat bebas dari hama dan penyakit. Tongkol jagung yang telah dipanen disimpan di tempat yang kering dan berventilasi. Memiliki kadar air yang rendah sekitar 7% hingga 10% untuk dijadikan sebagai asap cair, karena jika kadar air terlalu tinggi akan menghambat proses pembakaran dan mengurangi kualitas asap cair yang dihasilkan (Handayani dkk., 2018).

Proses pembuatan asap cair diawali dengan membersihkan tongkol jagung dari kotoran, kemudian dijemur di bawah sinar matahari langsung selama tiga hari hingga kering. Tongkol jagung yang sudah kering kemudian ditimbang sebanyak 40 kg dan dimuat ke dalam reaktor pirolisis, lalu diproses pada suhu antara 300°C hingga 400°C (Aladin dkk, 2018). lalu ditampung destilat asap cair yang dihasilkan ke dalam wadah penampung. Selanjutnya distilat asap cair didiamkan selama 1 minggu untuk mengendapkan tar. Asap cair yang dihasilkan dimurnikan dengan cara distilasi menggunakan alat distilasi pada suhu 120°C hingga terpisah antara

cairan coklat yang mengandung tar dengan destilat yang memiliki kualitas *grade 2* berwarna agak bening (Handayani dkk., 2018).

Asap cair yang dihasilkan selanjutnya dilakukan karakterisasi untuk mengetahui kualitas asap cair tersebut. Karakterisasi ditentukan berdasarkan standar kualitas dari Jepang. Asap cair yang diuji adalah hasil redistilasi, yaitu asap cair *grade 2*. Pengujian dilakukan secara kualitatif dan kuantitatif, mencakup parameter seperti berat jenis, pH, warna, transparansi, kandungan senyawa fenol, dan kadar asam.

### 3.5.4 Perbanyakan patogen *Fusarium* sp.

Isolat *Fusarium* sp. yang digunakan didapatkan dari koleksi Laboratorium Proteksi Fakultas Pertanian Universitas Siliwangi. Perbanyakan patogen *Fusarium* sp. dilakukan dengan cara mengkulturkan potongan jamur dari biakan murni menggunakan *cork borer* kemudian diletakkan di bagian tengah media. Setelah dikulturkan ditutup rapat dengan plastik wrap. Jamur di inkubasi pada suhu  $\pm 28^{\circ}\text{C}$  selama 7 hari untuk kemudian dijadikan jamur uji pada perlakuan *in vitro* dan *in vivo*.

### 3.5.5 Pengujian secara *in vitro*

Pengujian *in vitro* dilakukan untuk mengetahui daya hambat asap cair tongkol jagung terhadap pertumbuhan patogen *Fusarium* sp. dengan konsentrasi yang digunakan yaitu 0% (PDA), 1,5%, 3%, 4,5%, dan 6%. Larutan dibuat dengan cara melarutkan asap cair tongkol jagung sesuai perlakuan yang dicoba yaitu 0,9 ml asap cair tongkol jagung dilarutkan dengan media PDA mencapai volume 60 ml (1,5%), 1,8 ml asap cair tongkol jagung dilarutkan dengan media PDA mencapai volume 60 ml (3%), 2,7 ml asap cair tongkol jagung dilarutkan dengan media PDA mencapai volume 60 ml (4,5%), dan 3,6 ml asap cair tongkol jagung dilarutkan dengan media PDA mencapai volume 60 ml (6%). Setiap perlakuan dituangkan ke dalam cawan petri sebanyak 10 ml/cawan. Keseluruhan aktivitas pencampuran media dilakukan di dalam *Laminar Air Flow*.

Setelah media memadat, biakan *Fusarium* sp. dipotong menggunakan *cork borer* dengan diameter 5 mm, kemudian diletakkan tepat di bagian tengah media

pada semua perlakuan. Hasil inokulasi diinkubasi pada suhu 25°C selama 7 hari sambil diamati dengan mengukur diameter koloni. Pengukuran diameter koloni dilakukan dengan cara mengukur secara horizontal dan vertikal.

### 3.5.6 Pengujian secara *in vivo*

Tahapan pengujian aktifitas antifungi secara *in vivo* yaitu sebagai berikut:

- a) Benih cabai rawit varietas Rengganis 93 di rendam dalam air hangat selama 15-30 menit. Proses perendaman benih tersebut bertujuan untuk mempermudah perkecambahan benih (Ralahalu dkk., 2013). Kemudian benih disemai satu per satu dalam tray.
- b) Persiapan media tanam berupa tanah dan pupuk kompos yang disterilkan dengan cara dikukus selama 2 jam. Setelah itu, tanah dan pupuk kompos di campurkan dengan perbandingan 2:1 dan di masukkan ke dalam polybag ukuran 15 cm x 15 cm.
- c) Cabai rawit disemai selama 4 minggu, akar cabai direndam dalam suspensi *Fusarium* sp. dengan kerapatan  $1 \times 10^6$ /ml selama 1 jam, kemudian ditanam dalam polybag (Matondang dkk., 2022).
- d) Konsentrasi asap cair yang digunakan yaitu 0% (aquades), 1,5%, 3%, dan 4,5%. Larutan dibuat dengan cara melarutkan asap cair sesuai perlakuan yang dicoba yaitu 7,5 ml asap cair tongkol jagung dilarutkan dengan aquades hingga 500 ml (1,5%), 15 ml asap cair tongkol jagung dilarutkan dengan aquades hingga 500 ml (3%), dan 22,5 ml asap cair tongkol jagung dilarutkan dengan aquades hingga 500 ml (4,5%).
- e) Setelah 7 hari, masing-masing perlakuan konsentrasi asap cair tongkol jagung diberikan sebanyak 15 ml ke dalam polybag dengan cara disiramkan disekitar tanaman cabai. Pengaplikasian asap cair dilakukan setiap satu minggu sekali.

## 3.6 Parameter pengamatan

### 3.6.1 Parameter penunjang

Paraemeter penunjang adalah pengamatan yang dilakukan terhadap variabel yang datanya tidak diuji secara statistik untuk mengetahui kemungkinan pengaruh

lain dari luar perlakuan. Variabel yang diamati dalam parameter pengamatan ini yaitu:

a. Karakteristik asap cair tongkol jagung

Karakteristik yang diuji meliputi rendemen, berat jenis, warna, transparansi, pH, kadar asam dan kadar fenol.

Tabel 4. Karakteristik asap cair standar Jepang

Parameter ( <i>Parameters</i> )	Mutu asap cair ( <i>Quality of liquid smoke</i> ) gris
pH	1,50 – 3,70
Berat jenis	>1,001
Warna	Kuning cokelat kemerahan
Kadar asam (%)	1 - 18
Fenol	-
Transparansi	Tidak keruh

Sumber: Yatagai, (2002 dalam Alpian dkk., 2014)

Pengujian dalam karakterisasi asap cair sebagai berikut:

- 1) Pengujian berat jenis asap cair dilakukan dengan menggunakan piknometer. Pertama, piknometer ditimbang menggunakan neraca analitik berskala 10,00 gram. Kemudian, piknometer diisi penuh dengan akuades dan ditimbang kembali. Langkah yang sama diulangi untuk mengukur bobot jenis asap cair. Perhitungan bobot jenis asap cair dilakukan dengan menggunakan rumus berikut (Diatmika, Kencana, dan Arda 2019):

Bobot jenis (g/ml):

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

- 2) Rendemen dihitung menggunakan data dari perhitungan bobot jenis menggunakan rumus (Sitanggang dan Sigalingging, 2018):

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

- 3) Pengujian warna dilakukan secara kualitatif dengan menggunakan aplikasi *Android Colorimeter Leb Tools*. Pengambilan gambar asap cair menggunakan kamera *smartphone Iphone 14*. Gambar yang sudah diambil

diunggah dalam aplikasi tersebut, kemudian aplikasi akan mengidentifikasi warna dan panjang gelombang yang terikat dengan tampilan visual asap cair.

- 4) Pengujian pH dilakukan dengan menggunakan alat indikator pH universal (kertas laksus). Ujung indikator yang terdapat beberapa lapis warna dicelupkan pada asap cair hingga warna indikator berubah. Kemudian, warna pada indikator dibandingkan dengan skala warna yang terdapat pada kemasan alat untuk mendapatkan nilai pH.
- 5) Pengujian kadar fenol dilakukan secara kualitatif dengan menambahkan 5 tetes larutan  $\text{FeCl}_3$  1% ke dalam tabung reaksi yang sudah berisi 5 ml asap cair. Kemudian, tabung dikocok beberapa saat hingga larutan menjadi homogen, apabila asap cair mengandung fenol larutan akan mengalami perubahan warna menjadi ungu atau coklat.
- 6) Pengujian kadar asam dalam asap cair dilakukan dengan metode titrimetri. Buret yang akan digunakan dibilas terlebih dahulu sebanyak tiga kali dengan akuades untuk memastikan tidak ada sisa larutan sebelumnya yang menempel di dinding buret kemudian keringkan. Buret diisi dengan larutan  $\text{NaOH}$  0,1 N hingga mencapai skala 1 ml. Larutan asap cair 1 ml dilarutkan dengan akuades sampai volume 10 ml, kemudian tambahkan larutan indikator Phenolphthalein (PP) sebanyak tiga tetes. Selanjutnya, titrasi dilakukan hingga larutan sampel berubah warna menjadi merah muda stabil dan catat volume  $\text{NaOH}$  yang berkurang. Proses ini diulang 3 kali dan ditentukan reratanya untuk memperoleh hasil yang maksimal. Perhitungan kadar asam dilakukan dengan menggunakan rumus (Wibowo, 2012):

$$\% \text{asam} = \frac{V \times N \times \text{Mr CH}_3\text{COOH}}{W \times 1000} \times 100\%$$

Keterangan:

- V : volume  $\text{NaOH}$  tertitrasi yang diperlukan (ml)  
 N : normalitas larutan  $\text{NaOH}$  dinyatakan (N)  
 W : bobot sampel (g)

b. Suhu dan kelembaban

Suhu dan kelembapan diukur selama uji *in vivo* berlangsung pada tanaman cabai rawit. Alat pengukuran yang digunakan adalah *hygrometer* digital.

3.6.2 Parameter utama

a. Parameter uji *in vitro*

1) Diameter *Fusarium* sp.

Pengamatan diameter koloni jamur patogen *Fusarium* sp. dilakukan dengan cara mengukur diameter pertumbuhan secara horizontal dan vertikal dengan menggunakan jangka sorong. Pengukuran dilakukan pada hari 3 HSI, 5 HSI, dan 7 HSI. Perhitungan diameter koloni *Fusarium* sp. dihitung dengan menggunakan rumus (Zuanif dan Despita, 2019):

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

Keterangan:

D = diameter koloni *Fusarium* sp. (cm)

d1 = diameter vertikal koloni *Fusarium* sp. (cm)

d2 = diameter horizontal koloni *Fusarium* sp. (cm)

2) Daya hambat asap cair

Pengamatan pada uji *in vitro* dilakukan dengan menghitung daya hambat asap cair terhadap pertumbuhan jamur patogen *Fusarium* sp. pada 3 HSI, 5 HSI, dan 7 HSI. Adapun perhitungan persentase hambatan tersebut dilakukan dengan menggunakan rumus di bawah ini (Pangestu, Suswanto, dan Supriyanto 2014):

$$P = \frac{(a - b)}{a} \times 100\%$$

Keterangan:

P = penghambatan

a = diameter koloni *Fusarium* sp. pada perlakuan kontrol

b = diameter koloni *Fusarium* sp. pada perlakuan

b. Parameter uji *in vivo*

1) Masa inkubasi

Masa inkubasi adalah waktu yang diperlukan sejak tanaman cabai pertama kali terkena patogen hingga tanaman mulai menunjukkan gejala awal infeksi, yang ditandai dengan menguningnya daun dari bawah (Herwidiyarti dkk., 2013).

2) Kejadian penyakit

Pengamatan tingkat kejadian penyakit pada tanaman cabai rawit dilakukan dengan cara mengamati gejala-gejala eksternal yang muncul pada tanaman seperti daun dari bagian bawah menguning. Pengamatan kejadian penyakit dilakukan pada akhir penelitian dengan menggunakan rumus sebagai berikut (Khaeruni dan Gusnawaty, 2012):

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

Keterangan :

KP = tingkat kejadian penyakit (%)

n = jumlah tanaman bergejala yang diamati

N = jumlah tanaman yang diamati

Setelah menghitung persentase kejadian penyakit, dilanjutkan dengan menghitung efektivitas penghambatan kejadian penyakit dengan menggunakan rumus sebagai berikut (Istiqomah dan Kusumawati 2018):

$$EP = \frac{KP \text{ Kontrol} - KP \text{ Perlakuan}}{KP \text{ Kontrol}} \times 100\%$$

Adapun efektivitas penghambatan antijamur diklasifikasikan dalam beberapa kategori mengacu pada Syahidah dan Subekti (2019), yaitu:

Table 5. Klasifikasi Efektivitas penghambatan

Efektivitas Penghambatan	Tingkat Efektivitas
D > 75%	Sangat kuat
50% < D ≤ 75%	Kuat
25% < D ≤ 50%	Sedang
0 < D ≤ 25%	Lemah
0	Tidak aktif

3) Tinggi tanaman

Pengamatan tinggi tanaman dilakukan dengan cara mengukur tinggi tanaman dari batang hingga tajuk tertinggi menggunakan penggaris atau meteran. Pengamatan tinggi tanaman ini dilakukan pada 14 HST dan 28 HST.

4) Bobot akar per tanaman

Pengamatan bobot akar dilakukan diakhir penelitian yaitu saat tanaman cabai berumur 28 HST dan merupakan rata-rata dari empat tanaman. Pengamatan bobot dilakukan dengan memotong pangkal batang tanaman cabai kemudian akar dibersihkan dari tanah yang masih menempel pada akar, kemudian ditimbang dengan timbangan analitik.

5) Bobot pupus per tanaman

Pengamatan bobot pupus dilakukan diakhir penelitian yaitu saat tanaman cabai berumur 28 HST dan merupakan rata-rata dari empat tanaman. Pengamatan bobot dilakukan dengan memisahkan bagian atas dan bagian akar, kemudian bagian atas tanaman (daun, batang, dan cabang) ditimbang dengan timbangan analitik.

6) Nisbah pupus akar

Variabel nisbah pupus akar diperoleh dari perbandingan antara biomassa atau panjang tunas dan biomassa atau panjang akar tanaman (Hariyadi dkk., 2023). Pengamatan dilakukan diakhir penelitian yaitu saat tanaman cabai berumur 28 HST.