

BAB III. METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan tempat percobaan

Percobaan ini dilaksanakan pada bulan Juni sampai Agustus 2025 di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Pertanian, Universitas Siliwangi, Kota Tasikmalaya.

3.2 Alat dan bahan percobaan

Alat yang digunakan dalam percobaan ini diantaranya adalah cawan petri (diameter 90 mm), gelas ukur (10 mL), tabung reaksi, rak tabung reaksi, erlenmeyer (250 mL), *beaker glass* (50–1000 mL), aluminium foil, jarum ose loop (diameter 1–3 mm), *plastic wrap*, spatula, pinset, mikropipet P20 (2–20 μ L), timbangan elektrik (ketelitian 0,001g), *magnetic stirrer*, bunsen, *shaker*, kompor gas, suntikan (kapasitas 1 mL dan 10 mL), autoklaf elektrik, jangka sorong digital (ketelitian 0,01 mm), botol kaca, corong, pipet, *laminar air flow* (LAF), perangkat keras berupa laptop dan perangkat lunak berupa PubChem, SwissADME, ProTox3.0, admetSAR 3.0, PyRx 0.8, Pymol, dan BIOVIA Discovery Studio.

Adapun bahan yang digunakan dalam percobaan ini adalah minyak atsiri biji jarak kepyar dengan kemurnian 100% dan berlabel Standar Nasional Indonesia, etanol 95%, biakan murni *Fusarium sp.*, alkohol 70%, media *potato dextrose agar* (PDA), larutan polysorbate 20 6%, fungisida sintetis bahan aktif Benomyl (dosis anjuran 2 g/L) struktur 3D dan 2D dari senyawa ligan hasil GCMS minyak atsiri biji jarak, dan struktur 3D reseptor.

3.3 Metode penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksploratif dan eksperimental. Metode eksploratif digunakan pada percobaan *in silico* dan metode eksperimental digunakan pada pengujian *in vitro*.

Percobaan *in silico* dilakukan dengan metode *molecular docking* untuk mengetahui penambatan ligan dari senyawa metabolit sekunder yang terkandung pada

minyak atsiri biji jarak terhadap reseptor yang berperan penting dalam pembentukan dinding sel cendawan *Fusarium sp.*

Pengujian *in vitro* dilakukan untuk mengonfirmasi aktivitas penambatan hasil dari uji *in silico* dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) 1 faktor yang terdiri dari 5 perlakuan dan 5 ulangan, sehingga didapatkan 25 unit percobaan. Adapun perlakuan yang digunakan yaitu sebagai berikut.

P₀- = kontrol negatif (tanpa pemberian minyak atsiri biji jarak)

P₀+ = kontrol positif (fungisida dengan bahan aktif benomyl, konsentrasi: 2%)

P₃ = minyak atsiri biji jarak 3%

P₄ = minyak atsiri biji jarak 4%

P₅ = minyak atsiri biji jarak 5%

Tata letak percobaan dapat dilihat pada Lampiran 2 dan data formulasi konsentrasi perlakuan pada Lampiran 3.

Data hasil percobaan yang diperoleh dari pengujian secara *in vitro* 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) menurut (Gomez dan Gomez, 1995) sebagai berikut.

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

Dengan :

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

μ = Nilai rata-rata umum

τ_i = Pengaruh perlakuan ke-i

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

Berdasarkan model linier tersebut, kemudian disusun tabel analisis sidik ragam (ANOVA) sebagaimana pada tabel berikut.

Tabel 3. Sidik ragam uji *in vitro*

Sumber Ragam	db	JK	KT	Fhit	Ftab 5%
Perlakuan	4	JKP	$\frac{JKP}{dbP}$	$\frac{KTP}{KTG}$	2,866
Galat	20	JKG	$\frac{JKG}{dbG}$		
Total	24	JKT			

Sumber : Gomez dan Gomez, 1995

Tabel 4. Kaidah pengambilan keputusan

Hasil analisis	Kesimpulan analisis	Keterangan
$F_{hit} \leq F_{0,05}$	Tidak berbeda nyata	Tidak ada perbedaan pengaruh antar perlakuan
$F_{hit} > F_{0,05}$	Berbeda nyata	Terdapat perbedaan pengaruh antar perlakuan

Sumber : Gomez dan Gomez, 1995

Jika hasil analisis keragaman menunjukkan berbeda nyata, maka dilakukan uji lanjut dengan menggunakan Uji Jarak Berganda Duncan pada taraf nyata 5% dengan rumus sebagai berikut :

$LSR = SSR \cdot S_x$

$SSR = (\alpha \cdot d \cdot b \cdot g \cdot p)$

Nilai S_x dapat dicari dengan rumus sebagai berikut.

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

Keterangan :

S_x : Galat baku rata-rata (*Standard error*)

KTG : Kuadrat tengah galat

r : Jumlah ulangan

SSR : *Significant Studentized Range*

α : Taraf nyata

dbg : Drajat bebas galat

p : Jarak antar perlakuan (*range*)

LSR : *Least Significant Range*

3.4 Prosedur kerja

3.4.1 Pengujian *in silico*

Prosedur pengujian *in silico* mengacu pada Benatar (2025), yang mencakup beberapa langkah sebagai berikut :

a. Kemiripan pestisida

Untuk mengetahui senyawa yang mirip dengan pestisida dapat dilakukan dengan SwissADME, dengan memasukkan SMILES dari senyawa yang akan dianalisis kemudian menekan opsi “Run” kemudian hasil analisis akan muncul. Data hasil yang dianalisis adalah *Molecule Weight* (MW), *ClogP*, Jumlah *Hydrogen Bond Donor* (HBDs), Jumlah *Hydrogen Bond Acceptor* (HBAs), dan *Rotatable bonds* (ROBs). Data hasil analisis tersebut ditentukan kemiripannya dengan pestisida berdasarkan prinsip Hao Rules.

b. Prediksi toksisitas

Prediksi toksisitas terhadap lebah dapat dilakukan menggunakan *BeeToxAI*, dimana toksisitas akut pada lebah dinilai dengan memasukkan SMILES dari senyawa yang akan diprediksi ke dalam kolom “Enter SMILES”, kemudian sistem akan memprosesnya setelah tombol “SUBMIT ANALYSIS” ditekan. Untuk mengetahui toksisitas terhadap tanaman, prediksi dapat dilakukan menggunakan *CropCSM* dengan cara memasukkan string SMILES pada kolom “SMILES string” dan menjalankan prediksi melalui opsi “Run prediction”. Sementara itu, prediksi toksisitas terhadap unggas maupun lingkungan tanah, seperti biodegradasi dan biokonsentrasi, dapat dianalisis menggunakan *Deep-PK*. Pada menu “Prediction”, dengan memasukkan struktur SMILES senyawa yang dimaksud dan memilih mode prediksi “Toxicity” untuk mendapatkan hasilnya. Prediksi toksisitas terhadap organisme air dilakukan menggunakan admetSAR 3.0, dengan memilih menu “predict” pada halaman utama, lalu memasukkan SMILES senyawa, menekan ikon “search”, dan meninjau hasil secara lengkap melalui menu “View” di kolom Detail.

c. Pencarian struktur (2D dan 3D) ligan dan struktur makromolekul

Informasi mengenai struktur 3D dan 2D dari senyawa fitokimia minyak atsiri biji jarak kepyar (*Ricinus communis* L.) dapat ditemukan di situs PubChem lalu diunduh dalam bentuk sdf. Kemudian prosedur dalam mencari struktur makromolekul target yaitu dengan ditentukannya makromolekul yang akan menjadi target reseptor yaitu *1,3- β -glucan synthase*, kemudian diunduh dalam bentuk format .pdb melalui website PDB (*Protein Data Bank*).

d. Preparasi ligan dan makromolekul

Penelitian ini menggunakan dua ligan yang berasal dari bahan aktif benomoli dan ligan dari minyak atsiri biji jarak kepyar. Data ligan yang telah diambil dari situs PubChem dalam format 3D (*.sdf), kemudian dikonversi ke format *.pdb dengan menggunakan perangkat lunak *PyRx* 0.8 lalu disimpan dalam bentuk format pdbqt. Preparasi makromolekul dilakukan menggunakan *software Discovery studio* dengan memasukkan protein yang telah diunduh dalam format .pdb dalam aplikasi kemudian memisahkan senyawa lainnya selain protein lalu disimpan dalam format .pdb.

e. Penambatan molekul dan *scoring*

Prosedur dalam penambatan molekul menggunakan *PyRx* 0.8 dengan cara ligan dan makromolekul yang sudah disimpan dalam proses sebelumnya kemudian menentukan area *docking* dengan mengatur *Grid Box*. Jika *active site* protein diketahui, pengaturan dilakukan pada area tersebut, namun jika tidak diketahui, dapat menggunakan *Blind docking* untuk mengeksplorasi seluruh permukaan protein. Setelah *Grid Box* disesuaikan dengan *active site* protein, proses *docking* dilakukan menggunakan *AutoDock Vina*. Kemudian hasil *scoring* disimpan untuk dianalisis lebih lanjut, termasuk visualisasi interaksi antara ligan dan protein.

f. Analisis hasil penambatan (*scoring*)

Prosedur kerja dalam analisis hasil penambatan dilakukan dengan menggunakan *PyMOL* dan *Biova Discovery Studio*. Senyawa ligan hasil *docking* dan makromolekul (protein target) digabungkan pada aplikasi *PyMOL* untuk melihat informasi posisi *binding* dan interaksi kimianya. Selanjutnya menggunakan aplikasi

Biova Discovery Studio untuk memvisualisasikan rincian interaksi senyawa tersebut, seperti ikatan hidrogen, interaksi hidrofobik, atau *pi-pi stacking*.

3.4.2 Sterilisasi alat dan pembuatan media

Sterilisasi alat dilakukan dengan mencuci semua alat yang digunakan dengan sabun cuci dan air bersih mengalir, kemudian dikeringkan. Alat yang sudah kering dibungkus dengan kertas dan dimasukkan ke dalam plastik tahan panas diikat kuat. Semua alat tersebut serta bahan berupa aquades dan media disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121° selama 20 menit. Alat-alat lain yang tidak tahan dengan suhu dan tekanan tinggi dapat disterilisasi dengan alkohol 70%.

Media yang digunakan adalah media *Potato Dextrose Agar* (PDA). Merujuk kepada penelitian (Aji dan Rohmawati, 2020) media dibuat dengan cara menimbang sebanyak 5,85g PDA kemudian dilarutkan dan dipanaskan dalam 150 ml akuades hingga homogen. Media yang telah larut kemudian disterilisasi dengan *autoklaf* selama 15 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 1,5 atm.

3.4.3 Penyediaan minyak atsiri

Minyak atsiri yang digunakan dalam penelitian ini yaitu minyak atsiri biji jarak kepyar (*Ricinus communis* L.). Minyak atsiri ini diperoleh dari produsen yang telah mendapatkan *Certificate of Analysis* sehingga sudah berstandar SNI. Minyak atsiri tersebut akan diuji keefektifannya dalam menghambat cendawan patogen *Fusarium sp.* yang dilakukan secara *in vitro*.

3.4.4 Isolasi cendawan *Fusarium sp.*

Isolasi patogen dilakukan dengan memotong bagian akar yang terinfeksi berukuran sekitar 2 x 2 cm, kemudian direndam dalam beaker glass berisi alkohol 70% selama 2 menit untuk menghilangkan kontaminasi pada permukaan. Setelah itu, sampel dibilas dengan mencelupkannya ke dalam akuades steril sebanyak tiga kali. Potongan daun tersebut kemudian ditempatkan pada permukaan media dan diinkubasi selama 5 hari pada suhu 27 sampai 28°C. Miselium cendawan yang tumbuh selanjutnya dipindahkan ke media baru hingga diperoleh kultur murni (Utami, 2018).

3.4.5 Pengujian *in vitro*

Uji penghambatan minyak atsiri biji jarak terhadap patogen yang diuji dilakukan dengan menggunakan metode umpan beracun (*food poisoning*) seperti yang dilakukan oleh Suganda, *et al.*, (2019). Pengujian dilakukan dengan menumbuhkan cendawan patogen yang diuji di dalam media PDA yang telah dicampur dengan minyak atsiri sesuai dengan berbagai konsentrasi perlakuan.

Metode pembuatan larutan minyak atsiri mengacu kepada metode Nabigol dan Morshedi. (2011) dan Firmansyah, *et al.*, (2023). Minyak atsiri dicampurkan dengan polysorbate 20 sebanyak 0,6 ml (6%) (v/v) kemudian dicampur dengan aquades steril hingga mencapai 10 ml dan terbentuk larutan minyak atsiri 3%, 4% dan 5%. Adapun formulasi tiap larutan terdapat pada Lampiran 3.

Pengujian dilakukan dengan prosedur yaitu mengambil masing-masing 1 ml dari konsentrasi minyak yang didapatkan, dicampur dengan 9 ml PDA di dalam cawan petri (Ata dan Manalo, 2014). Kontrol yang digunakan dalam pengujian merupakan kontrol negatif dan kontrol positif dengan memakai fungisida sintetis bahan aktif Benomyl (dosis anjuran 2 g/L). Media dibiarkan memadat selama kurang lebih 10 menit. Pencampuran minyak dan PDA dilakukan di dalam LAF agar meminimalisir terjadinya kontaminasi.

Langkah selanjutnya adalah isolat *Fusarium sp.* dipotong menggunakan *cork borer* dengan diameter 5 mm yang telah disterilkan, kemudian diletakkan di tengah cawan petri yang telah berisi media perlakuan. Cawan ditutup rapat lalu dilapisi plastik *wrap* dan diinkubasi pada suhu ruangan. Pengamatan dilakukan setiap hari selama 7 hari dengan mengukur diameter koloni cendawan pada setiap unit percobaan.

3.5 Parameter pengamatan

3.5.1 Pengamatan penunjang

Pengamatan penunjang adalah pengamatan yang datanya tidak dianalisis secara statistik yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh eksternal dari perlakuan. Dalam penelitian ini, pengamatan penunjang yang diamati adalah toksisitas, karakteristik senyawa berdasarkan prinsip Hao Rules dan morfologi cendawan.

3.5.2 Pengamatan utama

a. Interaksi antara ligan dan reseptor

Parameter untuk interaksi antara ligan dan reseptor adalah nilai *Root Mean Square Deviation* (RMSD). RMSD adalah nilai yang digunakan untuk menentukan apakah prediksi modus ikatan tersebut berhasil dan penting untuk validasi program *docking*. Pada umumnya nilai RMSD dikatakan baik jika ≤ 2 Å. Semakin besar penyimpangan, semakin besar pula kesalahan pada prediksi inteksi ligan dengan reseptor (Brooijmans, 2009).

b. *Scoring* antara ligan dan reseptor

Untuk menentukan interaksi ligan yang paling efektif dengan reseptor, dapat ditentukan dari *scoring* atau nilai energi bebas pengikatan ΔG_{bind} . Menurut Ruswanto, *et al.*, (2018) semakin kecil hasil *scoring* dari suatu senyawa ligan uji dengan makromolekul reseptornya maka ikatan ligan dan reseptor tersebut akan semakin stabil serta reaksinya terjadi secara spontan. Keterangan terkait *scoring* ΔG_{bind} akan disajikan dalam Tabel 5.

Tabel 5. Ketentuan *Scoring* ΔG_{bind}

No	Scoring (ΔG_{bind})	Keterangan hasil
1	$\Delta G < 0$	Reaksi akan berlangsung secara spontan
2	$\Delta G > 0$	Reaksi tidak spontan

Sumber : Setiawan, (2014)

c. Diameter koloni

Pengukuran diameter koloni dilakukan pada 2 garis radial yang saling berpotongan yaitu garis x dan y dengan menggunakan rumus (Pormes, Pangemanan, dan Leman, 2016) yaitu sebagai berikut.

$$\text{Diameter koloni} = \frac{Dx + Dy}{2}$$

Keterangan :

Dx : Diameter sumbu x (cm)

Dy : Diameter sumbu y (cm)

d. Daya hambat minyak atsiri (%)

Daya hambat dihitung dengan menghitung diameter pertumbuhan koloni. Daya hambat dihitung berdasarkan metode Silva, *et al.*, (2016), dengan rumus sebagai berikut

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