

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan tempat penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari 2025 hingga Februari 2026, di Laboratorium Bioteknologi, 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, tabung reaksi, timbangan digital, pemantik api, kompor, *hot plate*, gelas ukur, alat tulis, penggaris/jangka sorong, pinset, kamera, mikropipet dan tip, blender, *cork borer*, pinset, mikroskop, *object glass*, alat tulis, semprotan, *box container*, nampan, saringan dan kertas label.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi ekstrak etanol kulit umbi kentang (*Solanum tuberosum* L.) yang diperoleh secara komersial dari toko Planet Kimia melalui *platform e-commerce* Shopee sebagai bahan aktif perlakuan. Patogen penyebab penyakit *crown rot* diperoleh dari koleksi isolat Laboratorium Bioteknologi Fakultas Pertanian Universitas Siliwangi. Bahan uji *in vivo* berupa buah pisang (*Musa* spp.) varietas Cavendish yang diperoleh langsung dari petani pisang di Kecamatan Ciawi, Kabupaten Tasikmalaya, dengan umur panen sekitar 11 bulan dan tingkat kematangan seragam. Media pertumbuhan patogen yang digunakan adalah *Potato Dextrose Agar* (PDA) siap pakai. Aquades steril digunakan sebagai bahan pengencer, alkohol 70% untuk sterilisasi alat dan permukaan kerja, Natrium Hipoklorit (NaOCl) untuk sterilisasi permukaan buah, serta antibiotik kloramfenikol untuk menghambat pertumbuhan bakteri pada media. Bahan penunjang lainnya meliputi kapas steril, kertas saring, aluminium foil, plastik wrap, dan *styrofoam* yang digunakan selama proses isolasi, inokulasi, dan inkubasi.

3.3 Metode penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dalam dua tahap, yaitu uji *in vitro* dan uji *in vivo*. Penentuan taraf konsentrasi ekstrak kulit umbi kentang dalam penelitian ini didasarkan pada hasil penelitian sebelumnya yang menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi ekstrak berpengaruh terhadap besarnya aktivitas antibakteri yang dihasilkan (Widodo et al., 2024). Konsentrasi tertinggi yang dilaporkan efektif pada penelitian tersebut adalah 45%, sehingga pada penelitian ini digunakan taraf konsentrasi di bawah nilai tersebut, yaitu 40%, 20%, 10%, dan 5%, melalui pendekatan pengenceran bertingkat (*2 fold-serial dilution*) untuk mengevaluasi efektivitas ekstrak pada tingkat konsentrasi yang lebih rendah (Vloemans et al., 2024). Perhitungan pembuatan larutan ekstrak pada masing-masing taraf konsentrasi serta kebutuhan volume larutan untuk setiap perlakuan disajikan secara rinci pada Lampiran 3.

Uji *in vitro* menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 1 faktor perlakuan, terdiri atas 6 taraf konsentrasi ekstrak kulit umbi kentang, dengan masing-masing perlakuan diulang sebanyak 5 kali, sehingga diperoleh 30 unit percobaan. Tata letak percobaan uji *in vitro* dapat dilihat pada Lampiran 1.

perlakuan pada uji *in vitro*, yaitu:

- P0– = tanpa pemberian ekstrak kulit umbi kentang (kontrol negatif)
- P0+ = fungisida sintetik berbahan aktif propineb dengan konsentrasi 1,5g/L (kontrol positif)
- P1 = ekstrak kulit umbi kentang 40%
- P2 = ekstrak kulit umbi kentang 20%
- P3 = ekstrak kulit umbi kentang 10%
- P4 = ekstrak kulit umbi kentang 5%

Penghitungan konsentrasi dapat dilihat pada Lampiran 3.

Data dianalisis dengan uji F, kaidah pengambilan keputusan dengan model linear dari Rancangan Acak Lengkap (RAL) ini adalah sebagai berikut:

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

Keterangan:

Y_{ij} = respon (nilai pengamatan)

μ = nilai tengah umum

T_i = pengaruh perlakuan ke-i

ϵ_{ij} = pengaruh galat percobaan dari perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

Model linear tersebut digunakan untuk menyusun tabel analisis sidik ragam (ANOVA) sebagaimana pada Tabel 1 sebagai berikut:

Tabel 1. Sidik ragam Rancangan Acak Lengkap untuk pengujian *in vitro*

Sumber	db	JK	KT	F hitung	F tabel 5%
Keragaman					
Perlakuan (P)	5	$\Sigma P^2 - FK$	JK_P / db_P	KT_P / KT_G	2,71
Galat (G)	25	$JK_T - JK_P$	JK_G / db_G		
Total (T)	30	$\Sigma T^2 / r - FK$			

Sumber: Gomez dan Gomez, 2015

Uji *in vivo* dilaksanakan menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) dengan satu faktor perlakuan, yaitu konsentrasi ekstrak kulit umbi kentang (*Solanum tuberosum* L.). Perlakuan terdiri atas 6 taraf konsentrasi yang diuji untuk mengetahui pengaruhnya terhadap parameter yang diamati. Setiap perlakuan diulang sebanyak 5 kali dan dikelompokkan ke dalam 5 kelompok berdasarkan kondisi unit percobaan yang relatif seragam dalam setiap kelompok. Pengelompokan ini bertujuan mengendalikan variasi yang mungkin muncul akibat perbedaan kondisi bahan uji atau lingkungan penyimpanan. Secara keseluruhan, terdapat 30 unit percobaan. Tata letak percobaan untuk uji *in vivo* dapat dilihat pada Lampiran 2. Perlakuan yang digunakan yaitu:

P0- = tanpa pemberian ekstrak kulit umbi kentang (kontrol negatif)

P0+ = fungisida sintetik berbahan aktif propineb dengan konsentrasi 1,5g/L (kontrol positif)

P1 = ekstrak kulit umbi kentang 40%

P2 = ekstrak kulit umbi kentang 20%

P3 = ekstrak kulit umbi kentang 10%

P4 = ekstrak kulit umbi kentang 5%

Untuk penghitungan konsentrasi dapat dilihat pada Lampiran 3.

Data dianalisis dengan uji F, kaidah pengambilan keputusan dengan model linear dari Rancangan Acak Kelompok (RAK) ini adalah sebagai berikut:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \beta_j + \epsilon_{ij}$$

Keterangan:

Y_{ij} = respon (nilai pengamatan)

μ = nilai rata-rata umum

T_i = pengaruh perlakuan ke-i

β_j = pengaruh ulangan ke-j

ϵ_{ij} = pengaruh galat percobaan dari perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

Model linear tersebut digunakan untuk menyusun tabel analisis sidik ragam (ANOVA) sebagaimana pada Tabel 2 sebagai berikut:

Tabel 2. Sidik ragam Rancangan Acak Kelompok untuk pengujian *in vivo*

Sumber	db	JK	KT	F hitung	F tabel 5%
Keragaman					
Ulangan (U)	4	$\Sigma U^2 - FK$	JK_U / db_U	KT_U / KT_G	2,87
Perlakuan (P)	5	$\Sigma P^2 - FK$	JK_P / db_P	KT_P / KT_G	2,71
Galat	20	$JK_T - JK_P - JK_U$	JK_G / db_G		
Total (T)	29	$\Sigma T^2 / r - FK$			

Sumber: Gomez dan Gomez, 2015

Kaidah pengambilan keputusan berdasarkan pada nilai F hitung pada sidik ragam Rancangan Acak Lengkap dan Rancangan Acak Kelompok dapat dilihat pada Tabel 3.

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 dan Gomez, 2015

Jika hasil analisis keragaman menunjukkan perbedaan yang nyata baik uji *in vitro* maupun *in vivo*, maka dilakukan uji lanjutan dengan Uji Jarak Berganda

Duncan (DMRT) 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

SSR = *Studentized Significant Ranges*

KT Galat = kuadrat tengah galat

r = jumlah ulangan

3.4 Prosedur penelitian

Prosedur kerja dalam penelitian ini yaitu sebagai berikut:

3.4.1 Sterilisasi alat

Sterilisasi alat dilakukan untuk meminimalkan risiko kontaminasi selama proses penelitian. Peralatan yang digunakan terlebih dahulu dicuci menggunakan sabun dan dibilas dengan air mengalir hingga bersih, kemudian dikeringanginkan pada suhu ruang. Peralatan berbahan kaca dibungkus menggunakan kertas atau plastik tahan panas, lalu disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 20 menit. Alat yang tidak tahan terhadap suhu dan tekanan tinggi, seperti mikropipet dan bagian luar peralatan tertentu, disterilkan menggunakan alkohol 70% sebelum digunakan. Media dan akuades yang digunakan dalam penelitian juga disterilisasi menggunakan autoklaf untuk menjaga kondisi kerja tetap aseptik.

3.4.2 Persiapan dan karakterisasi fitokimia ekstrak kulit umbi kentang

Ekstrak kulit umbi kentang yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh secara komersial dari toko Planet Kimia melalui *platform e-commerce* Shopee. Ekstrak tersebut digunakan sebagai bahan aktif perlakuan pada uji *in vitro* dan *in vivo*. Informasi teknis mengenai proses pembuatan ekstrak diperoleh dari keterangan penyedia.

Keterangan penyedia menunjukkan bahwa bahan baku ekstrak berasal dari kulit umbi kentang. Kulit umbi kentang tersebut dikeringkan menggunakan oven pada suhu 40–50 °C, kemudian diekstraksi menggunakan pelarut etanol. Proses ekstraksi dilakukan dengan perbandingan 500 g serbuk kulit umbi kentang kering dalam 5000 mL etanol. Filtrat hasil ekstraksi kemudian dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental.

Ekstrak kulit umbi kentang yang telah diperoleh selanjutnya disiapkan menjadi larutan perlakuan dengan taraf konsentrasi 40%, 20%, 10%, dan 5%. Setelah itu, ekstrak dikarakterisasi melalui *skrining* fitokimia awal untuk mengidentifikasi keberadaan golongan senyawa metabolit sekunder, seperti saponin, alkaloid, flavonoid, tanin, triterpenoid, dan fenolik. Tujuan dari tahap ini adalah untuk memberikan gambaran awal komponen bioaktif yang terkandung dalam ekstrak, yang berperan penting dalam aktivitas biologisnya, termasuk potensi sebagai antimikroba (Tiarasanti et al., 2024).

Tahap berikutnya adalah analisis fitokimia tingkat lanjut menggunakan teknik *Gas Chromatography–Mass Spectrometry* (GC-MS). Analisis ini bertujuan untuk mengidentifikasi senyawa-senyawa spesifik secara lebih rinci, baik secara kualitatif maupun kuantitatif, sehingga dapat diketahui profil metabolit yang dominan dalam ekstrak. Hasil identifikasi ini menjadi dasar ilmiah untuk mengaitkan komposisi kimia ekstrak dengan aktivitas biologisnya (Hassan dan Hassan, 2015).

Selanjutnya dilakukan uji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*). Uji ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan ekstrak kulit umbi kentang dalam menangkap radikal bebas sebagai salah satu parameter karakterisasi kimia ekstrak (Samotyja, 2019). Hasil uji DPPH digunakan sebagai data penunjang untuk menggambarkan aktivitas antioksidan ekstrak sebelum digunakan dalam pengujian *in vitro* dan *in vivo*.

3.5 Pelaksanaan penelitian

3.5.1 Uji in vitro

Uji *in vitro* dilakukan untuk mengevaluasi kemampuan ekstrak kulit umbi kentang dalam menghambat pertumbuhan patogen penyebab *crown rot* pada buah pisang di lingkungan terkendali (laboratorium).

a. Penyiapan *Media Potato Dextrose Agar* (PDA)

Media Potato Dextrose Agar (PDA) disiapkan dengan menimbang 39 g bubuk PDA (Merck) lalu melarutkannya dalam 1 L akuades. Larutan dipanaskan sambil diaduk hingga homogen, kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Media cair yang telah disterilisasi dituangkan ke dalam cawan petri steril sebanyak 9 mL per cawan, kemudian didinginkan hingga memadat. PDA digunakan sebagai media pertumbuhan patogen untuk tahap inokulasi dan pengujian (Gakuubi et al., 2017).

b. Peremajaan isolat patogen

Isolat patogen penyebab *crown rot* yang diperoleh dari koleksi laboratorium ditumbuhkan kembali pada media PDA baru. Peremajaan dilakukan sebanyak dua kali untuk memastikan kultur yang digunakan benar-benar aktif, murni, dan sehat. Proses inkubasi menghasilkan miselium yang selanjutnya digunakan sebagai sumber inokulum. Potongan miselium berukuran ± 5 mm dari koloni murni dipindahkan ke media PDA menggunakan jarum ose steril, kemudian diinkubasi pada suhu ruang $\pm 27^\circ\text{C}$ selama 5–7 hari hingga koloni menutupi sebagian permukaan media. Peremajaan bertujuan memperoleh kultur patogen yang aktif dan sehat sebelum digunakan pada tahap pengujian (Ibrahim et al., 2020).

Pengujian dilakukan menggunakan metode *food poisoning*, yaitu metode uji antifungi dengan cara mencampurkan ekstrak ke dalam media pertumbuhan sehingga senyawa aktif tersebar di dalam media dan kontak langsung dengan miselium jamur. Metode ini digunakan untuk mengetahui kemampuan ekstrak dalam menghambat pertumbuhan koloni patogen melalui pengukuran diameter koloni dan perhitungan daya hambat. PDA cair bersuhu $\pm 40^\circ\text{C}$ dituangkan sebanyak 9 mL ke dalam cawan petri, kemudian ditambahkan 1 mL larutan ekstrak kulit umbi kentang sesuai perlakuan. Media digoyang memutar secara perlahan agar ekstrak tercampur merata, lalu didiamkan hingga mengeras. Miselium patogen penyebab penyakit *crown rot* diperoleh dengan memotong PDA biakan murni menggunakan *cork borer* berdiameter 5 mm, kemudian

diinokulasikan pada bagian tengah media PDA yang telah dicampur ekstrak kulit umbi kentang. Cawan petri diinkubasi pada suhu ruang $\pm 25^{\circ}\text{C}$ selama 7 hari. Pertumbuhan jamur diamati setiap hari, kemudian diameter koloni diukur dan daya hambat ekstrak dihitung pada akhir pengamatan (Setiawati et al., 2020).

3.5.2 Uji In vivo

Uji *in vivo* dilakukan untuk mengevaluasi efektivitas ekstrak kulit umbi kentang (*Solanum tuberosum* L.) dalam menghambat perkembangan penyakit *crown rot* pada buah pisang (*Musa* spp.). Tahapan uji *in vivo* dirancang secara sistematis untuk memastikan setiap langkah percobaan dapat diamati dan dievaluasi secara jelas. Langkah-langkahnya adalah sebagai berikut:

1. Pemilihan sampel dilakukan menggunakan buah pisang Cavendish yang segar dan sehat, yang ditandai dengan kondisi kulit utuh, tidak mengalami luka mekanis, memar, maupun menunjukkan gejala serangan hama dan penyakit. Sampel dipilih dengan tingkat kematangan yang seragam berdasarkan warna kulit hijau merata tanpa adanya perubahan warna kuning atau cokelat, serta berasal dari waktu panen yang relatif sama yaitu 11 bulan setelah tanam. Keseragaman sampel juga ditentukan berdasarkan ukuran buah, dengan panjang sekitar ± 20 cm. Buah pisang dipotong dari tandan dan sisir, menyisakan tangkai pada buah pisangnya. Setiap buah pisang digunakan sebagai satu unit percobaan. Dokumentasi kondisi awal buah pisang yang digunakan sebagai sampel penelitian dapat dilihat pada Lampiran 8.
2. Buah pisang terlebih dahulu dicuci menggunakan air mengalir untuk menghilangkan kotoran dan debu yang menempel pada permukaan kulit. Buah kemudian disterilisasi dengan cara direndam dalam larutan natrium hipoklorit (NaOCl) 2% selama 2 menit untuk meminimalkan kontaminasi mikroba pada permukaan buah. Buah dibilas menggunakan air mineral setelah perendaman, lalu dikeringkan pada suhu ruang ($25\text{--}28^{\circ}\text{C}$) hingga permukaannya mengering (Morelia-Jiménez et al., 2023). Buah kemudian ditimbang dan diberi label sesuai perlakuan.

3. Aplikasi ekstrak kulit umbi kentang dilakukan dengan metode penyemprotan menggunakan *sprayer* steril. Sebanyak 1 mL larutan ekstrak dengan konsentrasi 40%, 20%, 10%, dan 5% disemprotkan secara merata pada permukaan pangkal buah hingga seluruh area tertutup sempurna. Buah pada kontrol negatif disemprot menggunakan akuades steril, sedangkan pada kontrol positif diaplikasikan fungisida propineb dengan konsentrasi 1,5g/L. Buah dikeringkan selama ± 1 jam pada suhu ruang (25–28°C) setelah aplikasi, untuk memastikan larutan menempel dengan baik pada permukaan buah.
4. Proses inokulasi patogen kemudian dilakukan dengan cara menusuk buah pada dua titik, yaitu bagian atas dan bawah buah, menggunakan jarum steril berdiameter $\pm 0,35$ mm. Suspensi spora patogen diinokulasikan pada setiap titik luka sebanyak 10 μ L dengan konsentrasi 1×10^6 spora/mL menggunakan mikropipet steril.
5. Buah pisang yang telah diinokulasi kemudian ditempatkan dalam wadah *styrofoam* dan ditutup menggunakan plastic wrap untuk menjaga kelembapan. Proses inkubasi dilakukan pada suhu ruang (25–28°C) selama 14 hari. Buah diamati secara berkala selama masa inkubasi, sesuai parameter pengamatan yang telah ditentukan (Morelia-jim et al., 2023).

Parameter yang diamati meliputi masa inkubasi, insidensi penyakit, intensitas penyakit, serta tingkat efikasi pengendalian. Pengamatan dilakukan secara berkala selama 14 hari untuk memantau perkembangan gejala infeksi pada buah pisang. Uji *in vivo* ini diharapkan dapat memberikan gambaran nyata mengenai efektivitas ekstrak kulit umbi kentang dalam kondisi yang mendekati lingkungan penyimpanan dan distribusi sebenarnya, sehingga hasil yang diperoleh lebih representatif dan aplikatif dalam upaya pengendalian penyakit pascapanen (Hasyim, 2023).

3.6 Parameter pengamatan

3.6.1 Parameter penunjang

a. Identifikasi patogen

Identifikasi molekuler isolat patogen merupakan salah satu parameter penunjang yang dilakukan untuk memastikan spesies jamur yang digunakan dalam penelitian. Tahap ini dilakukan sebagai bentuk konfirmasi terhadap isolat

patogen penyebab penyakit *crown rot* sebelum digunakan pada pengujian lebih lanjut, sehingga hasil penelitian didasarkan pada spesies target yang sesuai. Identifikasi dilakukan menggunakan penanda *Internal Transcribed Spacer* (ITS), yang merupakan *DNA barcode* utama untuk identifikasi fungi karena memiliki tingkat variasi antargatun yang tinggi dan mampu membedakan spesies secara akurat (Singha et al., 2016).

Sampel isolat patogen yang telah diremajakan pada penelitian ini selanjutnya dikirim ke laboratorium PT Widya Life Science untuk dilakukan analisis molekuler dan *sequencing* DNA. Hasil *sequencing* yang diperoleh kemudian dianalisis menggunakan basis data GenBank melalui metode *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) untuk mengetahui tingkat kemiripan sekuens DNA dengan spesies yang telah terdaftar. Penentuan spesies dilakukan berdasarkan persentase kemiripan tertinggi dan didukung oleh analisis hubungan kekerabatan genetik, sehingga isolat yang digunakan dalam penelitian dapat dipastikan sesuai dengan spesies target (Singha et al., 2016).

b. Karakteristik ekstrak

1) Kadar abu dan kadar air

Kadar air dan kadar abu ditentukan untuk mengevaluasi mutu awal ekstrak kulit umbi kentang (*Solanum tuberosum* L.) sebelum dilakukan uji hayati lebih lanjut. Pengujian kadar air ekstrak kulit umbi kentang dilakukan untuk mengetahui jumlah air yang masih terkandung dalam ekstrak. Penetapan kadar air dapat dilakukan dengan metode gravimetri, yaitu berdasarkan selisih bobot sampel sebelum dan sesudah pengeringan. Sampel ekstrak ditimbang secara saksama, kemudian dimasukkan ke dalam cawan yang telah diketahui bobotnya. Sampel dikeringkan dalam oven pada suhu 105 °C selama beberapa jam, kemudian didinginkan dalam desikator dan ditimbang kembali. Pengeringan dan penimbangan dilakukan sampai diperoleh bobot yang relatif konstan. Kadar air dihitung berdasarkan persentase kehilangan bobot sampel setelah proses pengeringan. Metode gravimetri digunakan karena prinsipnya sederhana dan umum digunakan dalam penetapan parameter mutu ekstrak (Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan, 2000).

Pedoman standar ekstrak menyebutkan bahwa metode gravimetri dilakukan dengan pengeringan pada suhu 105 °C hingga selisih dua penimbangan berturut-turut tidak lebih dari 0,25%.. Kadar abu diukur melalui metode pengabuan pada suhu tinggi untuk memperoleh residu mineral total, yang mencerminkan kemurnian ekstrak dan potensi adanya kontaminan anorganik (Mredul et al., 2025). Kedua parameter ini dianalisis di PT Palapa Muda Perkasa.

2) Skrining fitokimia awal dan Analisis GC-MS

Skrining fitokimia dilakukan secara kualitatif untuk mendeteksi golongan metabolit sekunder yang terdapat dalam ekstrak kulit umbi kentang. Pengujian saponin, alkaloid, flavonoid, tanin, dan triterpenoid dilakukan di PT Palapa Muda Perkasa, sedangkan pengujian fenolik dilakukan di Laboratorium Sentral Universitas Padjadjaran. Alkaloid diuji menggunakan pereaksi Dragendorff, Mayer, dan Wagner, sedangkan golongan metabolit lainnya diuji menggunakan pereaksi yang sesuai dengan karakteristik kimianya. Penentuan hasil didasarkan pada terbentuknya perubahan warna, endapan, atau buih setelah sampel bereaksi dengan pereaksi tertentu. Pendekatan kualitatif tersebut umum digunakan sebagai tahap awal untuk mendeteksi keberadaan kelompok senyawa alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, fenolik, steroid, dan triterpenoid dalam ekstrak tumbuhan (Dubale et al., 2023). Prosedur kerja, komposisi pereaksi, jumlah bahan, tahapan reaksi, dan kriteria hasil positif setiap golongan senyawa disajikan secara lengkap pada Lampiran 12.

Analisis *Gas Chromatography–Mass Spectrometry* (GC–MS) dilakukan di PT Widya Life Science untuk mengidentifikasi komponen volatil dan semi-volatil yang terdapat dalam ekstrak kulit umbi kentang. Sampel ekstrak disiapkan menggunakan pelarut etanol sesuai prosedur preparasi laboratorium, kemudian dimasukkan ke dalam vial instrumen dan diinjeksikan ke sistem GC–MS. Komponen sampel dipisahkan di dalam kolom kromatografi gas berdasarkan perbedaan volatilitas serta interaksinya dengan fase diam. Senyawa yang keluar dari kolom diteruskan menuju spektrometer massa dan diionisasi menggunakan mode ionisasi elektron atau *electron ionization*. Ion yang

terbentuk dipisahkan berdasarkan rasio massa terhadap muatannya sehingga menghasilkan pola spektrum massa untuk setiap puncak kromatogram. Identifikasi dilakukan dengan membandingkan spektrum massa senyawa sampel dengan spektrum referensi pada pustaka *National Institute of Standards and Technology* (NIST). Hasil analisis dicatat dalam bentuk nomor puncak, waktu retensi, nama senyawa hasil pencocokan, dan luas area relatif sebagai gambaran kelimpahan relatif setiap senyawa yang terdeteksi (Abd Rahim et al., 2018).

3) Uji antioksidan DPPH

Uji antioksidan DPPH digunakan untuk mengevaluasi kapasitas ekstrak dalam menangkap radikal bebas. Aktivitas antioksidan yang tinggi berpotensi memperlambat kerusakan oksidatif pada jaringan buah dan dapat bersinergi dengan aktivitas antimikroba selama penyimpanan pascapanen (Kim et al., 2019).

Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan di Laboratorium Sentral Universitas Padjadjaran menggunakan metode DPPH atau *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*. Larutan ekstrak kulit umbi kentang disiapkan dalam seri konsentrasi 0, 5.002, 10.003, 15.005, 20.006, dan 25.008 ppm, kemudian setiap konsentrasi diuji sebanyak dua kali pengulangan. Larutan ekstrak pada setiap konsentrasi dicampurkan dengan larutan DPPH dan dihomogenkan agar reaksi berlangsung merata. Campuran didiamkan dalam kondisi terlindung dari cahaya sesuai waktu reaksi yang ditetapkan dalam prosedur Laboratorium Sentral Universitas Padjadjaran. Absorbansi setiap campuran diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum DPPH, sedangkan larutan DPPH tanpa penambahan ekstrak digunakan sebagai kontrol. Penurunan absorbansi menunjukkan terjadinya reduksi radikal DPPH oleh komponen antioksidan dalam ekstrak.

Data absorbansi digunakan untuk memperoleh persentase penghambatan pada setiap konsentrasi, kemudian hubungan antara konsentrasi dan penghambatan digunakan untuk menentukan nilai IC₅₀ ekstrak (Gulcin dan Alwasel, 2023).

3.6.2 Parameter Utama

a. Uji *in vitro*

1) Diameter Koloni

Diameter koloni jamur diukur dengan jangka sorong digital, dan pengukuran ini dilakukan setiap hari selama 7 hari. Diameter diukur sebanyak 4 sisi diameter (Ramadani et al., 2023). Diameter pertumbuhan jamur digunakan rumus berikut:

$$D = \frac{d1+d2+d3+d4}{4}$$

Keterangan:

D = diameter pertumbuhan

d1 = diameter pertumbuhan sisi pertama

d2 = diameter pertumbuhan sisi ke dua

d3 = diameter pertumbuhan sisi ke tiga

d4 = diameter pertumbuhan sisi ke empat

Skema pengukuran diameter zona hambat pada empat arah disajikan pada Lampiran 5.

2) Daya Hambat

Daya hambat dihitung untuk mengetahui persentase penghambatan pertumbuhan koloni patogen dibandingkan dengan kontrol. Nilai ini diperoleh dengan membandingkan diameter koloni pada perlakuan dan kontrol menggunakan rumus Abbott atau rumus persentase hambatan (Mendoza et al., 2025). Perhitungan daya hambat dilakukan setelah seluruh pengamatan diameter koloni pada hari ke-7 selesai dilakukan. Daya hambat dihitung menggunakan rumus:

$$\text{Daya hambat} = \frac{dk-dp}{dk} \times 100\%$$

Keterangan:

dk = diameter koloni kontrol negatif

dp = diameter koloni perlakuan

b. Uji *in vivo*

1) Masa inkubasi

Masa inkubasi adalah interval waktu sejak inokulasi patogen ke buah pisang hingga munculnya gejala awal penyakit. Pengamatan dilakukan setiap hari dengan melihat tanda-tanda awal infeksi seperti perubahan warna kulit buah atau munculnya bercak. Parameter ini penting untuk menilai kecepatan infeksi patogen dan efektivitas ekstrak kulit umbi kentang dalam memperpanjang masa bebas penyakit. Semakin lama masa inkubasi, semakin efektif perlakuan dalam menekan perkembangan penyakit (Jacome, 1992).

2) Insidensi penyakit

Insidensi penyakit dihitung sebagai persentase jumlah buah pisang yang menunjukkan gejala *crown rot* dari total buah yang diamati (Hassan et al., 2022). Pengamatan dilakukan setiap hari untuk mencatat munculnya gejala penyakit pada masing-masing buah dalam setiap perlakuan. Jumlah buah yang menunjukkan gejala dihitung setelah seluruh periode pengamatan selesai, lalu dikalikan 100% untuk memperoleh nilai akhir insidensi penyakit. Nilai insidensi yang dilaporkan merupakan indeks insidensi pada akhir pengamatan, yang mencerminkan tingkat penyebaran penyakit pada tiap perlakuan. Rumus yang digunakan adalah:

$$\text{Insidensi penyakit (\%)} = \frac{\text{Jumlah buah bergejala}}{\text{Total buah yang diamati}} \times 100\%$$

Keterangan:

1. Jumlah buah bergejala: jumlah buah yang menunjukkan tanda-tanda penyakit.
2. Total buah yang diamati: seluruh buah yang termasuk dalam perlakuan atau pengamatan.
3. Hasilnya berupa persentase (%), menunjukkan proporsi buah yang terserang penyakit.

3) Intensitas penyakit

Intensitas penyakit digunakan untuk menggambarkan tingkat keparahan serangan *crown rot* pada buah pisang. Penilaian dilakukan dengan mengamati bagian mahkota (*crown*), tangkai (*peduncle*), dan bila diperlukan bagian pulp,

kemudian membandingkan kondisi visual buah dengan gambar acuan sesuai skala penilaian. Skoring intensitas dilakukan menggunakan skala visual 1 hingga 9, dimana nilai yang lebih tinggi menunjukkan tingkat kerusakan yang lebih parah. Pengamatan intensitas dilakukan setiap hari untuk mencatat perkembangan gejala penyakit, dan setelah seluruh periode pengamatan selesai, nilai skoring yang diperoleh dihitung untuk mendapatkan nilai akhir intensitas penyakit pada masing-masing perlakuan. Parameter ini memberikan gambaran kuantitatif mengenai efektivitas ekstrak kulit umbi kentang dalam menekan perkembangan gejala penyakit (Yagual et al., 2023).

Tabel 4. Skala penilaian secara deskriptif

Skor	Kualitas	Kriteria Visual
1	Sangat Baik	Tidak ada miselium. Mahkota bersih dan sehat.
2	Baik	Muncul miselium, tetapi belum ada pembusukan.
3	Rendah ($\frac{1}{4}$ busuk)	Busuk pada $\frac{1}{4}$ bagian mahkota.
4	Rendah ($\frac{1}{2}$ busuk)	Busuk pada $\frac{1}{2}$ bagian mahkota.
5	Buruk ($\frac{3}{4}$ busuk)	Busuk pada $\frac{3}{4}$ bagian mahkota.
6	Buruk	Mahkota busuk total (<i>Total Crown rot</i>).
7	Sangat Buruk	Busuk menjalar hingga $\frac{1}{2}$ tangkai ($\frac{1}{2}$ <i>Peduncle Rot</i>).
8	Sangat Buruk	Busuk menjalar hingga seluruh tangkai (<i>Total Peduncle Rot</i>).
9	Sangat Buruk	Busuk mencapai pulp buah (daging buah).

(Yagual et al., 2023).

SKALA SECARA VISUAL

INDEX	1	2	3	4	5	6	7	8	9
QUALITY	Excellent	Low			Poor		Very Poor		
CRITERIA	No Mycelia	Mycelia	¼ Crown Rot	½ Crown Rot	¾ Crown Rot	Total Crown Rot	½ Peduncle Rot	Total Peduncle Rot	Pulp
SINGLE FRUIT									
CLUSTER									

Gambar 6. Skala penilaian secara visual
(Yagual et al., 2023)

4) Tingkat efikasi

Tingkat efikasi dihitung untuk mengetahui kemampuan perlakuan dalam menekan intensitas penyakit dibandingkan dengan kontrol negatif. Penghitungan dilakukan setelah seluruh periode pengamatan selesai, menggunakan nilai intensitas penyakit akhir sebagai dasar perbandingan. Nilai efikasi dihitung menggunakan rumus Abbott, yang membandingkan intensitas penyakit pada perlakuan dan kontrol. Nilai efikasi yang tinggi menunjukkan efektif ekstrak dalam menekan perkembangan penyakit. Parameter ini menjadi indikator kunci untuk menilai potensi aplikasi ekstrak dalam skala lapangan (Piepho et al., 2024). Rumus untuk menghitung tingkat efikasi adalah sebagai berikut:

$$Efikasi (\%) = \frac{I_c - I_t}{I_c} \times 100\%$$

Keterangan:

I_c = Intensitas penyakit pada kontrol negatif

I_t = Intensitas penyakit pada perlakuan (misal ekstrak kulit kentang)

5) Susut berat

Susut berat digunakan untuk menilai laju kehilangan air dan aktivitas respirasi buah selama penyimpanan. Pengukuran dilakukan dengan menimbang bobot awal buah pisang (*Musa spp.*) pada hari ke-1, setelah buah dipilih secara seragam, kemudian buah disimpan pada kondisi penyimpanan yang telah

ditentukan. Bobot buah diukur kembali pada hari ke-14, bobot untuk memperoleh bobot akhir. Susut berat (%) dihitung menggunakan rumus:

$$\% \text{ Susut Berat} = \frac{W_0 - W_t}{W_0}$$

W_0 adalah bobot awal buah sebelum penyimpanan dan W_t adalah bobot buah pada waktu pengamatan.

Parameter ini memberikan indikasi perubahan fisik buah akibat kehilangan air dan respirasi, sehingga dapat digunakan untuk menilai efek perlakuan ekstrak kulit umbi kentang terhadap kestabilan fisik dan umur simpan buah selama penyimpanan (Al-Dairi, Pathare, Al-Yahyai, dan Al-Mahdouri, 2023).

6) Indeks warna buah

Indeks warna buah diamati untuk menilai tingkat kematangan melalui perubahan warna kulit buah selama penyimpanan. Pengukuran dilakukan menggunakan instrumen kolorimeter dengan skala warna $L^*a^*b^*$, dimana L^* menunjukkan kecerahan, a^* menunjukkan rona merah-hijau, dan b^* menunjukkan rona kuning-biru. Pengukuran pada penelitian ini dilakukan menggunakan aplikasi kolorimeter yang terpasang pada perangkat smartphone, yaitu Redmi Note 8, dengan pengambilan data dari 3 titik pada permukaan buah untuk mendapatkan nilai rata-rata. Pengamatan indeks warna dilakukan secara berkala pada hari ke-0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, dan 14, sehingga perubahan warna kulit dapat dipantau secara progresif sepanjang periode penyimpanan (Aruwajoye et al., 2024).

7) Kekerasan buah

Pengukuran kekerasan buah dilakukan menggunakan penetrometer atau *texture analyzer*, yang prinsipnya menekan atau menembus permukaan buah dengan probe tertentu untuk mengukur gaya yang diperlukan meremas jaringan buah. Buah ditempatkan pada alat penguji, lalu probe menembus permukaan buah dengan kecepatan tertentu, dan alat merekam gaya maksimum yang diterapkan sebelum jaringan buah terdeformasi. Hasil pengukuran berupa angka yang menunjukkan kekuatan atau gaya, dengan satuan Newton (N) atau

kilogram-force (kgf) ($1 \text{ kgf} \approx 9,81 \text{ N}$). Pengamatan kekerasan dilakukan pada hari ke-14, sehingga nilai yang diperoleh menggambarkan tingkat pelunakan atau kekerasan akhir buah setelah periode penyimpanan. Nilai kekerasan yang tinggi menunjukkan jaringan buah masih keras atau segar, sedangkan nilai rendah mencerminkan pelunakan jaringan akibat pemasakan atau serangan patogen (Al-Dairi, Pathare, Al-Yahyai, dan Al-Mahdouri, 2023).

8) Asam tertitrasi total

Prosedur analisis Asam Tertitrasi Total (ATT) dilakukan dengan menimbang sampel buah secara teliti, kemudian dihancurkan, diencerkan dengan akuades, dan disaring untuk memperoleh filtrat jernih. Filtrat tersebut dititrasi menggunakan larutan NaOH 0,1 N dengan penambahan indikator fenolftalein hingga muncul warna merah muda muda yang stabil selama sekitar 30 detik, menandakan titik akhir titrasi pada $\text{pH} \pm 8,1$. Volume NaOH yang digunakan menunjukkan jumlah asam yang dapat dinetralkan oleh basa kuat. Nilai ATT dihitung sebagai persen (% ekuivalen asam dominan, seperti asam sitrat) terhadap berat sampel, yang menggambarkan total kandungan asam organik titrabel dalam buah. Pengukuran ATT dilakukan pada hari ke-14, sehingga nilai yang diperoleh mencerminkan kondisi akhir kandungan asam buah setelah proses penyimpanan. Nilai ATT yang menurun seiring proses pemasakan akibat degradasi atau konversi asam menjadi senyawa lain, sehingga parameter ini penting untuk menilai tingkat kematangan dan kualitas kimia buah (Anyasi et al., 2015).

Nilai asam tertitrasi total (ATT) dihitung menggunakan metode titrasi asam basa mengacu pada prosedur yang dideskripsikan oleh Anyasi et al. (2015), dengan rumus sebagai berikut:

$$\frac{(mL \text{ NaOH}) \times f_p \times 0,1 \text{ N} \times BE}{\text{Bobot contoh (mg)}}$$

Keterangan:

mL NaoH = volume larutan NaOH 0,1 N yang digunakan untuk titrasi

Fp	= faktor pengenceran, yaitu perbandingan antara volume total larutan contoh dengan volume sampel yang dititrasi
N	= normalitas larutan NaOH
BE	= bobot ekuivalen asam dominan
Bobot contoh (mg)	= berat bahan atau ekstrak yang dianalisis

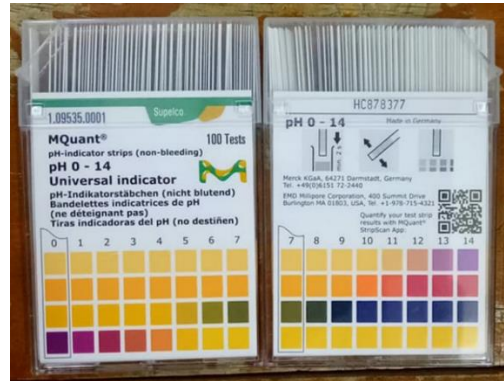
9) Kemanisan buah

Pengujian tingkat kemanisan buah dilakukan dengan mengukur *Total Soluble Solid* (TSS) menggunakan refraktometer. Sampel buah terlebih dahulu dihancurkan hingga menghasilkan sari buah, kemudian sari buah segar langsung ditempatkan pada prisma refraktometer yang telah dikalibrasi sebelumnya. Hasil pembacaan ditunjukkan secara langsung dalam satuan derajat Brix ($^{\circ}\text{Brix}$), yang merepresentasikan persentase total padatan terlarut, terutama gula sederhana seperti glukosa, fruktosa, dan sukrosa. Pengukuran TSS pada penelitian ini dilakukan pada hari ke-14, sehingga nilai yang diperoleh menggambarkan tingkat kemanisan akhir buah setelah periode penyimpanan. Nilai $^{\circ}\text{Brix}$ yang tinggi menunjukkan meningkatnya kadar gula yang terbentuk akibat konversi pati selama proses pemasakan atau pematangan buah (Al-Yahyai et al., 2025).

10) Derajat keasaman

Pengujian derajat keasaman (pH) dilakukan menggunakan kertas lakmus pH Universal untuk menentukan tingkat keasaman atau kebasaan pada sampel buah. Sampel buah terlebih dahulu dihancurkan hingga diperoleh sari buah segar, kemudian selembur kertas lakmus dicelupkan ke dalam sari buah tersebut selama beberapa detik hingga terjadi perubahan warna. Warna yang terbentuk dibandingkan dengan skala standar warna pH pada kemasan kertas lakmus untuk memperoleh nilai pH sampel. Pengukuran pH pada penelitian ini dilakukan pada hari ke-14, sehingga nilai yang diperoleh mencerminkan kondisi akhir tingkat keasaman buah setelah penyimpanan. Nilai pH digunakan bersama

parameter Asam Tertitrasi Total (ATT) untuk menilai keseimbangan rasa, terutama antara tingkat keasaman dan kemanisan (Aruwajoye et al., 2024).



Gambar 7. Indikator warna pH universal
(Sumber: da-Lopez, 2020)

11) Vitamin C

Pengujian kadar Vitamin C (asam askorbat) dalam buah dilakukan dengan tujuan untuk menentukan seberapa besar kandungan vitamin C yang tersedia dalam bahan sampel, sebagai indikator mutu nutrisi dan kesegaran buah (Syafitri et al., 2023). Sampel buah ditimbang secara akurat, kemudian dihancurkan dan diekstraksi untuk memperoleh larutan buah atau filtrat. Larutan tersebut kemudian dititrasi menggunakan larutan yodium (I_2) atau larutan indikator seperti DCPIP (2,6-dichlorophenolindophenol) hingga titik akhir titrasi tercapai yang menandakan semua asam askorbat telah teroksidasi. Pengukuran kadar vit C pada penelitian ini dilakukan pada hari ke-14, sehingga nilai yang diperoleh mencerminkan kondisi akhir kandungan vitamin C setelah periode penyimpanan. Volume titran yang digunakan kemudian dimasukkan ke dalam rumus:

$$\text{Vitamin C (mg/100g)} = \frac{\text{ml Iodin} \times fp \times 0,01 N \times BE}{\text{Bobot Contoh (g)}} \times 100$$

Keterangan:

Fp = Faktor pengenceran ($100 \text{ ml } 25 \text{ ml}^{-1}$)

BE = Bobot Ekuivalen Asam Askorbat