

III. METODE PENELITIAN

3.1. Tempat dan Waktu

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Penyakit Tumbuhan Jurusan Proteksi Tanaman Fakultas Pertanian Universitas Lampung dari bulan Juli 2011 sampai dengan Maret 2012.

3.2. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah cawan petri, erlenmeyer, mikroskop majemuk, mikro pipet, bunsen, alat potong, pinset, *autoclave*, *aluminium foil*, plastik tahan panas, kaca preparat, kaca penutup, bor gabus, jarum ose, jarum ent, tabung reaksi, selotip, sprayer, plastik, karet gelang, nampan plastik, paralon, penggaris dan alat tulis.

Bahan –bahan yang akan digunakan antara lain daun mengkudu, buah cabai bergejala, biakan *C.capsici*, alkohol 70% dan 96%, NaOCl 1%, media PDA (*Potato Dextrose Agar*), arang aktif dan aquades.

3.3. Rancangan Percobaan

Percobaan disusun dalam rancangan acak lengkap (RAL) dengan sebelas perlakuan dan tiga ulangan. Perlakuan terdiri atas kontrol (K), ekstrak daun

mengkudu yang terlarut dalam alkohol konsentrasi 10% (DM+10), 20% (DM+20), 30% (DM+30), 40% (DM+40), 50% (DM+50), 60% (DM+60), 70% (DM+70), 80% (DM+80), dan 90% (DM+90), serta ekstrak daun mengkudu yang terlarut dalam aquades (DM+Aq). Data hasil pengamatan dianalisis menggunakan sidik ragam dan perbedaan nilai tengah antar perlakuan diuji dengan Uji Jarak Berganda (Duncan) pada taraf nyata 5%.

3.4. Pelaksanaan Percobaan

3.4.1. Penyiapan Isolat *C. capsici*

C. capsici diisolasi dari buah cabai yang menunjukkan gejala busuk atau terinfeksi. Jaringan kulit buah yang bergejala dipotong pada bagian perbatasan antara bagian yang sakit dan yang sehat (± 5 mm), kemudian potongan direndam dalam larutan NaOCl 1% selama 2 menit, dan dibilas dengan aquades steril. Selanjutnya potongan kulit buah tersebut ditanam dalam cawan petri yang berisi media PDA dan diinkubasi dalam suhu ruang selama 3 hari. Jamur yang tumbuh kemudian isolasi dan diidentifikasi.

3.4.2. Pembuatan Ekstrak Daun Mengkudu

Daun mengkudu diperoleh dari tanaman mengkudu di sekitar lingkungan Fakultas Pertanian, Universitas Lampung. Daun mengkudu yang digunakan adalah daun yang tidak terlalu muda dan tidak terlalu tua yaitu pada ruas ke 4 – 5 dari pucuk daun. Daun mengkudu seberat 100 gram dicuci dengan air bersih lalu dikering-anginkan. Kemudian daun mengkudu dipotong-potong dan *diblender* dengan diberi sedikit air untuk memperoleh bentuk yang lebih halus, selanjutnya dilarutkan dan diekstrak berturut-turut dengan 1 liter aquades, 10 %, 20%, 30%,

40%, 50%, 60%, 70%, 80%, dan 90% menggunakan alat yang dirancang menggunakan paralon (Gambar 2).

Alat yang digunakan untuk mengekstrak dibuat dengan menggunakan paralon berbagai ukuran yang terdiri atas empat sambungan dan setiap sambungannya diberi kain kasa. Pada sambungan kedua diisi arang aktif yang telah dihaluskan sebagai filter. Masing-masing larutan hasil ekstraksi selanjutnya dituang dalam nampan plastik dan diuapkan dalam ruangan dengan suhu kamar, sehingga diperoleh fraksi kering ekstrak daun mengkudu dan disimpan dalam lemari es untuk pengujian selanjutnya.



Gambar 3. Alat yang digunakan untuk mengekstrak daun mengkudu (A = bagian paralon yang berisi daun mengkudu yang telah dihaluskan, B = kain kasa, C = bagian paralon yang berisi arang aktif, D = hasil ekstraksi).

3.4.3. Penyiapan Media Tumbuh Jamur *C. capsici* untuk Perlakuan

Pengujian

Pembuatan media PDA dimulai dengan 250 gr kentang dipotong kecil – kecil, lalu direbus didalam 1250 ml air sambil diaduk, setelah itu rebusan kentang disaring dan dimasukkan ke dalam dua labu erlenmeyer masing - masing berukuran 1 liter dan 250 ml yang sebelumnya telah diberi 20 gr gula dan 20 gr agar pada labu erlenmeyer 1 liter dan 5 gr gula dan 5 gr agar pada labu erlenmeyer 250 ml. Media dalam labu erlenmeyer tersebut disterilisasi di dalam otoklaf. Setelah proses sterilisasi selesai, media PDA 1250 ml tadi dibagi kedalam 11 labu erlenmeyer yang berbeda, masing - masing menjadi 100 ml larutan PDA. Tiap tabung yang telah berisi 100 ml PDA dicampur dengan 10 mg masing-masing fraksi kering ekstrak daun mengkudu.

3.4.4. Uji Penghambatan Pertumbuhan *C. capsici*

Uji penghambatan pertumbuhan *C. capsici* dilakukan untuk mengetahui ukuran diameter koloni pada tiap-tiap perlakuan pada media PDA dalam cawan petri. Masing - masing fraksi kering ekstrak daun mengkudu dicampurkan dalam media PDA dengan konsentrasi 100 ppm yaitu 10 mg bagian fraksi kering ekstrak daun mengkudu per 100 ml bagian media PDA dan di tuang ke dalam cawan petri. Jamur *C. capsici* yang telah dimurnikan diambil dengan bor gabus yang berukuran ± 5 mm dan diletakkan pada bagian tengah cawan petri. Masing - masing perlakuan dilakukan tiga kali ulangan.

Pengamatan dilakukan terhadap diameter koloni jamur sehingga diketahui kemampuan dari masing – masing fraksi ekstrak daun mengkudu dalam menghambat pertumbuhan *C. capsici*. Pengamatan ini dilakukan pada hari ke-2 hingga hari ke-11 setelah infestasi. Data pertumbuhan koloni jamur yang didapat merupakan rata - rata empat kali pengukuran diameter pada daerah yang berbeda. Data yang diperoleh selanjutnya digunakan untuk menghitung persentase penghambatan ekstrak daun mengkudu terhadap *C. capsici* dengan rumus sebagai berikut (Ahmad dan Suryana, 2009).

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

Keterangan: P = persentase penghambatan
 D1 = Diameter *C.capsici*. pada kontrol (cm)
 D2 = Diameter *C. capsici*. pada setiap perlakuan (cm)

3.4.5. Pengamatan dan Penghitungan Jumlah Spora

Pengamatan dilakukan untuk mengetahui jumlah spora pada tiap-tiap perlakuan. Pengamatan ini diperlukan sebagai data pendukung dari data pengamatan pertumbuhan *C. capsici*. Jumlah spora dihitung menggunakan metode hitungan mikroskopis langsung, dimana sampel diletakkan pada *haemocytometer*. Jumlah spora dapat dihitung dengan cara mengambil semua spora yang tumbuh pada tiap cawan petri dalam tiap ulangan. Suspensi spora *C. capsici* kemudian dimasukkan ke dalam 10 ml aquades steril di dalam cawan petri setelah itu dihomogenkan. Selanjutnya suspensi spora *C. capsici* diteteskan pada ruang hitung *haemocytometer* dan ditutup dengan kaca obyek, sehingga suspensi mengalir ke bawah kaca obyek dan mengisi ruang hitung. Lalu jumlah spora dihitung dalam

lima kotak sedang di bawah mikroskop. Jumlah spora dihitung dengan rumus menurut Sudiby (1994) *dalam* Surtikanti dan Juniarsih (2010) :

$$K = \text{Jumlah spora} \times 2,5 \times 10^6$$

Keterangan : K = kerapatan spora per ml
2,5 = konstanta atau faktor koreksi penggunaan kotak sampel pada *haemocytometer*

Uji kerapatan ini dilakukan sebanyak tiga kali ulangan dari setiap perlakuan.