

III. BAHAN DAN METODE

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Lampung (UNILA) sebagai tempat ekstraksi fungisida nabati, perlakuan dan pengamatan *C. capsici*. Penelitian ini dimulai pada bulan April 2015 sampai dengan Juli 2015.

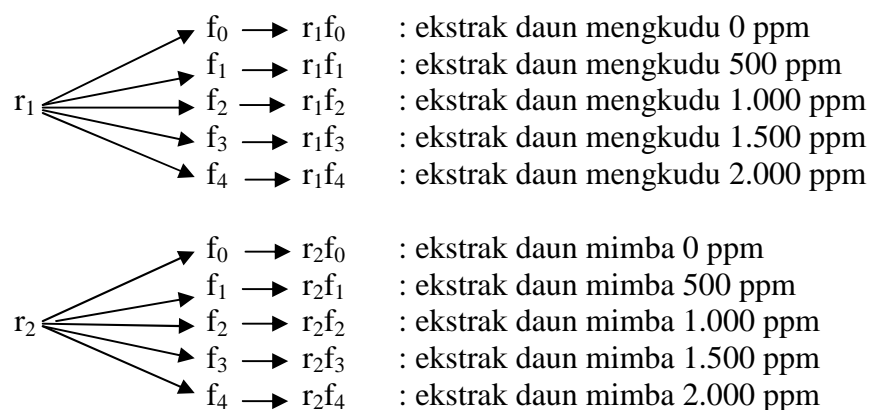
3.2 Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang akan digunakan dalam penelitian ini antara lain alkohol 70 %, aquades, arang aktif, biakan jamur *C. capsici*, daun mengkudu, daun mimba, klorok 1%, media PSA (*Potato Succrose Agar*), dan spiritus.

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain *aluminium foil*, *autoklaf*, ayakan, blender, bor gabus (5 mm), bunsen, cawan petri, *cutter*, *drigalsky glass*, gelas ukur, gunting, *haemocytometer*, jarum ose, kaca preparat, kaca penutup preparat, kain sifon, karet gelang, labu erlenmeyer, *Laminar Air Flow (LAF)*, lem paralon, mikropipet, mikroskop majemuk, mistar, nampan plastik, alat fraksinasi sederhana, pinset, plastik tahan panas, plastik *wrap*, *rotamixer*, timbangan dan tisu.

3.3 Metode Penelitian

Metode penelitian ini merupakan percobaan faktorial 2x5 dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) Tersarang. Konsentrasi ekstrak tersarang pada jenis tanaman uji. Ekstrak tanaman uji (R) terdiri dari: ekstrak daun mengkudu (r_1) dan ekstrak mimba (r_2). Konsentrasi (F) terdiri dari: 0 ppm (f_0), 500 ppm (f_1), 1.000 ppm (f_2), 1.500 ppm (f_3), dan 2.000 ppm (f_4). Setiap perlakuan diulang sebanyak 5 kali sehingga diperoleh 50 satuan percobaan. Perlakuan tersebut adalah sebagai berikut:



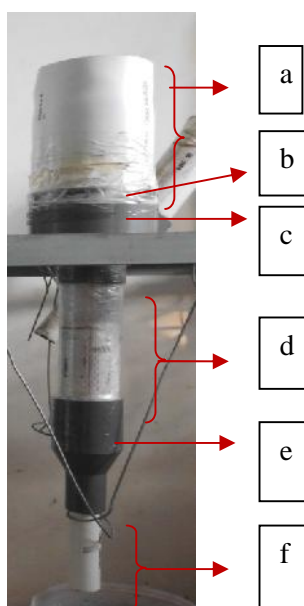
Data pengamatan dianalisis ragam dan jika perlakuan menunjukkan pengaruh yang nyata maka dilanjutkan dengan perbandingan polinomial ortogonal pada taraf 1%.

3.4 Pelaksanaan Penelitian

3.4.1. Pembuatan Ekstrak Daun Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) dan Ekstrak Daun Mimba (*Azadirachta indica* A. Juss.)

Pembuatan ekstrak daun mengkudu dan mimba dilakukan menggunakan alat fraksinasi sederhana (Gambar 3). Alat fraksinasi sederhana terdiri dari paralon

dengan tiga ukuran diameter yang berbeda. Pada tingkat pertama menggunakan paralon dengan diameter 4 inci, 2 inci, dan 1 inci (1 inci = 2,54 cm). Diantara bagian sambungan pertama dan kedua diletakkan kain sifon yang berfungsi sebagai penyaring. Kemudian pada bagian sambungan pertama diisi dengan arang aktif halus dengan ketebalan ± 5 cm dari permukaan kain sifon. Arang aktif berfungsi sebagai penyaring (*filter*) dan sebagai adsorpsi.



Gambar 3. Alat fraksinasi. (a) paralon 4 inci, (b) arang aktif ± 5 cm, (c) kain kasa, (d) paralon 2 inci, (e) Penyambung, dan (f) paralon 1 inci.

Daun yang digunakan untuk pembuatan ekstrak daun mengkudu dan daun mimba adalah daun yang segar. Daun mengkudu yang digunakan sebanyak 200 g dicuci dengan air bersih. Daun dipotong-potong dan diblender sampai halus dengan air 1000 ml kemudian dimasukkan ke dalam alat fraksinasi. Proses fraksinasi yang dilakukan untuk daun mengkudu menggunakan pelarut air, hasil ekstraksi ditampung dalam nampan. Ekstrak dari daun mengkudu dikeringanginkan selama (± 14 hari) kemudian dikeruk, dimasukkan ke dalam cawan petri, dan ditimbang untuk disimpan sebelum menyiapkan media uji. Proses fraksinasi ekstrak daun

mimba dilakukan dengan cara yang sama seperti pembuatan fraksi ekstrak daun mengkudu.

3.4.2 Penyiapan Media PSA (Potato Sucrose Agar) dan Media Uji

Media perbanyak isolat *C. capsici*, uji penghambatan pertumbuhan dan perkembangan *C. capsici* yang digunakan adalah PSA (*Potato Sucrose Agar*). PSA sebanyak 1 liter dibuat dengan 200 g kentang dipotong kecil-kecil dan direbus didalam 1 liter air. Air rebusan kentang dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer yang sebelumnya telah diberi 20 g sukrosa dan 20 g agar. Selanjutnya media disterilisasi ke dalam autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama ± 20 menit.

Media yang telah steril kemudian dibagi ke dalam 10 labu erlenmeyer berukuran 100 ml. Labu erlenmeyer dengan perlakuan 0 ppm (kontrol) tidak ditambahkan ekstrak tanaman uji. Labu erlenmeyer kedua ditambahkan ekstrak tanaman uji dengan konsentrasi 500 ppm (0,05 g ekstrak tanaman uji/100 ml media), labu erlenmeyer ketiga ditambahkan ekstrak tanaman uji dengan konsentrasi 1.000 ppm (0,1 g ekstrak tanaman uji/100 ml media), labu erlenmeyer keempat ditambahkan ekstrak tanaman uji dengan konsentrasi 1.500 ppm (0,15 g ekstrak tanaman uji/100 ml media), dan labu erlenmeyer kelima ditambahkan ekstrak tanaman uji dengan konsentrasi 2.000 ppm (0,2 g ekstrak tanaman uji/100 ml media) dari masing-masing ekstrak tanaman uji. Pencampuran ekstrak tanaman uji ke dalam media PSA ketika media dalam keadaan cukup panas dan cair. Media ini merupakan media yang digunakan untuk pengujian penghambatan pertumbuhan *C.capsici*.

3.4.3 Penyiapan Isolat *C. capsici*

Penyiapan isolat *C. capsici* dimulai dengan mengumpulkan buah cabai yang diduga terserang penyakit antraknosa. Bagian permukaan daerah buah cabai yang bergejala antraknosa diambil sporanya kemudian diletakkan pada kaca preparat untuk diamati di bawah mikroskop. Tujuannya untuk memastikan penyebab penyakit antraknosa pada buah cabai tersebut disebabkan oleh jamur *C. capsici*. Setelah terbukti penyebabnya adalah *C. capsici*, bagian buah cabai yang bergejala tersebut dipotong kecil antara bagian yang sehat dan yang bergejala dengan ukuran ± 5 mm.

Potongan tersebut dicuci ke dalam air steril, didesinfeksi dalam larutan klorok 1 % selama 30 detik, lalu bilas dengan air steril dan dikeringanginkan di atas tisu. Kemudian potongan tersebut diinokulasi dalam media PSA dan diinkubasikan dengan suhu ruang selama 7 hari. Jamur yang tumbuh kemudian dimurnikan dan diidentifikasi lagi untuk memastikan bahwa jamur yang dimurnikan benar *C. capsici*. Identifikasi mengacu pada literatur yang disusun Barnet dan Hunter (1972) dan Semangun (2004).

3.4.4 Uji Penghambatan Pertumbuhan *C. capsici*

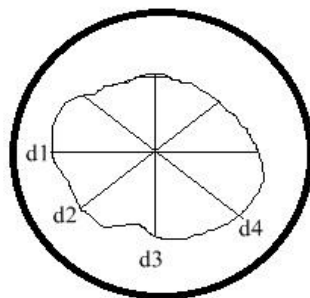
Uji penghambatan pertumbuhan *C. capsici* yang digunakan dalam percobaan ini adalah teknik makanan beracun (*Poisoned Food Technique*). Pengujian dilakukan dengan menginokulasikan jamur *C. capsici* dalam media yang telah dicampur dengan ekstrak tanaman uji. Isolat *C. capsici* diambil dengan menggunakan bor gabus yang berdiameter ± 5 mm. Potongan biakan murni *C.*

Capsici diletakkan pada bagian tengah cawan pada media PSA yang telah dicampur dengan ekstrak tanaman uji. Hasil inokulasi *C. capsici* pada media kemudian diinkubasikan pada suhu kamar selama 15 hari.

3.5 Pengamatan

3.5.1 Pengukuran Diameter Koloni

Pengamatan diameter koloni jamur dilakukan untuk mengetahui pertumbuhan vegetatif jamur. Nilai diameter koloni jamur adalah nilai rata-rata pengukuran diameter dari empat arah yang berbeda (Gambar 4). Pengukuran dilakukan pada hari ke 2 sampai dengan ke-15 hari setelah inokulasi.



Gambar 4. Ilustrasi pengukuran diameter koloni jamur *C. capsici*.

3.5.2 Kerapatan Spora

Kerapatan spora dihitung dengan menggunakan alat *haemocytometer*. Jumlah spora dihitung dengan cara mengambil miselium jamur yang tumbuh di setiap cawan petri kemudian menambahkan 10 ml air steril pada cawan petri kemudian miselium *C. capsici* dikeruk dengan drigalski. Setelah semua miselium *C. capsici* terlepas, semua miselium dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan di *rotamixer* sampai homogen. Selanjutnya mengambil suspensi sebanyak 1 ml kemudian

diteteskan pada *haemocytometer* dan ditutup dengan kaca obyek, sehingga suspensi mengalir ke bawah kaca obyek mengisi ruang hitung. Laju jumlah spora dihitung dalam lima sampel kotak sedang dibawah mikroskop dan dihitung rata-ratanya. Kerapatan spora per ml dihitung dengan rumus menurut Syahnen dkk. (2014):

$$S = R \times K \times F$$

Keterangan

S = Jumlah spora

R = Jumlah rata-rata spora pada 5 bidang pandang haemocytometer

K = Konstanta koefisien alat ($0,25 \times 10^6$)

F = Faktor pengenceran yang dilakukan

Perhitungan jumlah spora dilakukan sebanyak lima kali ulangan pada setiap perlakuan.