

### **III. BAHAN DAN METODE**

#### **3.1 Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Ilmu Penyakit Tanaman Fakultas Pertanian Universitas Lampung. Pelaksanaan penelitian dimulai dari September 2014 sampai dengan Maret 2015.

#### **3.2 Bahan dan Alat**

Bahan-bahan yang digunakan yaitu daun sirih hijau, daun babadotan, biakan *Colletotrichum capsici*, metanol teknis, klorok 1%, arang aktif, dan media PSA (*Potato Sucrosa Agar*) (1000 ml aquades, 200 gram kentang, 20 gram agar, dan 20 gram gula pasir).

Alat-alat yang digunakan adalah alat ekstraksi sederhana, cawan petri, gelas ukur, labu erlenmeyer, autoklaf, plastik tahan panas, *aluminium foil*, nampan plastik, plastik *wrap*, tisu, mikropipet, bunsen, pinset, jarum *ose*, *haemocytometer*, mikroskop majemuk, kaca preparat, spatula, dan bor gabus.

### 3.3 Metode Penelitian

Perlakuan pada penelitian ini disusun dalam rancangan acak lengkap (RAL) tersarang dengan dua faktor. Faktor pertama adalah jenis ekstrak tanaman yaitu fraksi ekstrak air daun sirih hijau (T1) dan fraksi ekstrak metanol daun babadotan (T2). Faktor kedua tingkat konsentrasi jenis ekstrak tanaman yang digunakan yaitu 0 ppm (P0), 500 ppm (P1), 1.000 ppm (P2), 1.500 ppm (P3), dan 2.000 ppm (P4). Setiap perlakuan diulang lima kali sehingga terdapat 50 satuan percobaan. Perlakuannya adalah sebagai berikut:

1. fraksi ekstrak air daun sirih hijau dengan konsentrasi 0 ppm (T<sub>1</sub>P<sub>0</sub>),
2. fraksi ekstrak air daun sirih hijau dengan konsentrasi 500 ppm (T<sub>1</sub>P<sub>1</sub>),
3. fraksi ekstrak air daun sirih hijau dengan konsentrasi 1.000 ppm (T<sub>1</sub>P<sub>2</sub>),
4. fraksi ekstrak air daun sirih hijau dengan konsentrasi 1.500 ppm (T<sub>1</sub>P<sub>3</sub>),
5. fraksi ekstrak air daun sirih hijau dengan konsentrasi 2.000 ppm (T<sub>1</sub>P<sub>4</sub>),
6. fraksi ekstrak metanol daun babadotan dengan konsentrasi 0 ppm (T<sub>2</sub>P<sub>0</sub>),
7. fraksi ekstrak metanol daun babadotan dengan konsentrasi 500 ppm (T<sub>2</sub>P<sub>1</sub>),
8. fraksi ekstrak metanol daun babadotan dengan konsentrasi 1.000 ppm (T<sub>2</sub>P<sub>2</sub>),
9. fraksi ekstrak metanol daun babadotan dengan konsentrasi 1.500 ppm (T<sub>2</sub>P<sub>3</sub>),
10. fraksi ekstrak metnol daun babadotan dengan konsentrasi 2.000 ppm (T<sub>2</sub>P<sub>4</sub>).

Data hasil pengamatan dianalisis dengan sidik ragam (*Anova*) dan dilanjutkan dengan perbandingan polinomial ortogonal.

### 3.4 Pelaksanaan Penelitian

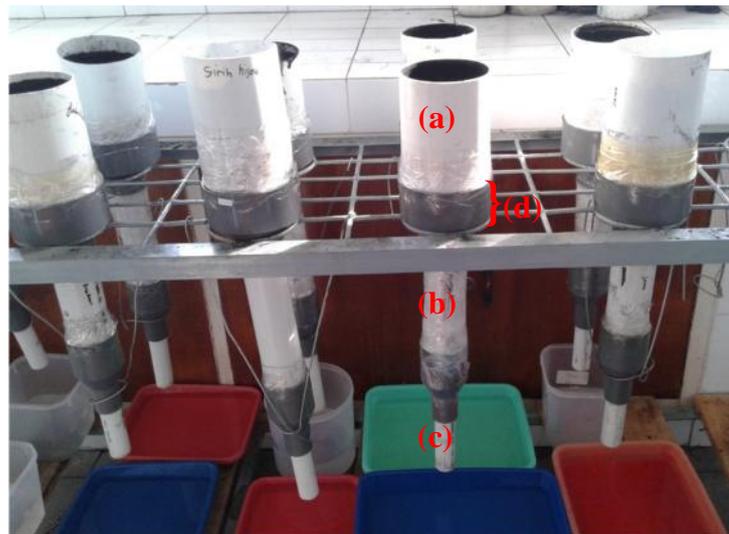
#### 3.4.1 *Pembuatan ekstrak daun sirih hijau dengan pelarut air dan ekstrak daun babadotan dengan pelarut metanol*

Pembuatan ekstraksi daun sirih hijau dan metanol daun babadotan dengan cara daun tanaman yang diuji diproses melalui ekstraksi bertingkat (fraksinasi), dengan menggunakan daun sirih hijau dan daun babadotan yang masih segar. Daun sirih hijau didapat dari kota Bandar Lampung, daun sirih yang digunakan yaitu semua bagian daun kecuali pucuk. Daun babadotan didapat dari kecamatan Natar, Lampung Selatan, daun babadotan yang digunakan yaitu semua daun kecuali pucuk.

Alat fraksinasi sederhana dibuat sendiri menggunakan paralon dengan tiga ukuran diameter yang berbeda. Ukuran diameter paralon yang digunakan yaitu 4 inci, 2 inci, dan 1 inci. Pada setiap sambungan paralon diberi satu lapis kain kasa yang berfungsi sebagai penyaring. Pada kain kasa sambungan paralon yang berukuran 4 inci diisi dengan arang aktif yang telah dihaluskan setinggi  $\pm 5$  cm dari permukaan kain kasa yang telah dipadatkan, fungsinya sebagai filter senyawa-senyawa polar dan nonpolar pada masing-masing tanaman uji (Gambar 4).

Daun sirih hijau dan daun babadotan sebanyak 200 gram dicuci dengan air hingga bersih lalu dikeringanginkan. Daun sirih hijau sebanyak 200 gram ditambah air 1.000 ml lalu diblender hingga halus kemudian dimasukkan kedalam alat fraksinasi dan hasilnya ditampung dalam nampan dikeringanginkan pada suhu ruang. Langkah-langkah yang sama dilakukan untuk mengekstraksi daun babadotan. Tetapi, setelah ekstrak daun babadotan yang menggunakan air tidak

menetes lagi pada nampan, maka ekstraksi dilanjutkan dengan menambahkan pelarut metanol sebanyak 1.000 ml ke dalam alat fraksinasi. Hasil fraksinasi dengan pelarut metanol ini ditampung dalam nampan dan dikeringanginkan pada suhu ruang. Kemudian hasil fraksinasi yang telah kering digunakan sebagai perlakuan.



Gambar 4. Alat fraksinasi sederhana

Keterangan: (a) paralon berukuran 4 inci, (b) paralon berukuran 2 inci, (c) paralon berukuran 1 inci, (d) sambungan paralon berukuran 4 inci.

#### 3.4.2 Pembuatan media pembiakan

Media yang digunakan untuk membiakkan jamur *C. capsici* adalah media *Potato Sucrosa Agar* (PSA). Untuk membuat 1.000 ml media PSA bahan-bahan yang diperlukan yaitu 200 gram kentang, 20 gram agar, dan 20 gram gula pasir.

Kentang dikupas dan dicuci hingga bersih lalu dipotong-potong berbentuk dadu. Kentang yang telah dipotong direbus menggunakan air 1 liter hingga mendidih dan kentang lunak. Setelah itu, sari kentang dimasukkan ke dalam labu *Erlenmeyer* berukuran 1.000 ml kemudian ditambahkan gula pasir dan agar lalu

diaduk hingga homogen. Media PSA kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C pada tekanan 1 atmosfer selama  $\pm$  20 menit.

#### 3.4.3 *Penyiapan isolat C. capsici*

Jamur yang diduga *C. capsici* diisolasi dari buah cabai yang bergejala antraknosa. Isolasi dilakukan dengan cara mengambil jaringan buah cabai pada perbatasan yang bergejala dan tidak bergejala berukuran  $\pm$  5 mm, kemudian dicelupkan ke dalam larutan klorok 1% selama  $\pm$  30 detik lalu dibilas dengan air steril dan dikeringanginkan. Selanjutnya jaringan buah cabai ditanam pada media PSA yang telah dituangkan pada cawan petri selama 7 hari. Jamur yang tumbuh dimurnikan dan diidentifikasi untuk melihat ciri-ciri jamur tersebut menggunakan mikroskop majemuk. Identifikasi mengacu pada buku *Introductory Mycology* (Alexopoulos dan Mims, 1979).

#### 3.4.4 *Penyiapan media uji*

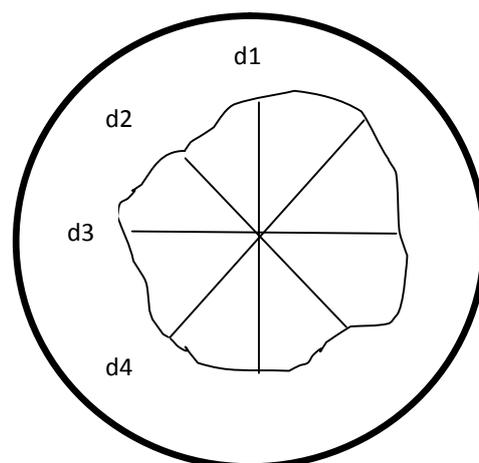
Media PSA yang telah di sterilkan dimasukkan kedalam labu *Erlenmeyer* yang berukuran 100 ml. Untuk menyiapkan fraksi ekstrak uji dengan berbagai taraf konsentrasi yang berbeda maka didalam 100 ml media PSA ditambahkan fraksi ekstrak yang akan diuji masing-masing sebanyak 0,05 gram, 0,10 gram, 0,15 gram, dan 0,20 gram sesuai konsentrasi perlakuan (500 ppm, 1.000 ppm, 1.500 ppm, dan 2.000 ppm). Pencampuran fraksi dilakukan pada saat media masih panas (cair). Media yang telah diberi perlakuan dituangkan ke dalam cawan petri untuk digunakan sebagai media pertumbuhan *C.capsici*.

### 3.4.5 Uji penghambatan pertumbuhan *C. capsici*

Uji penghambatan pertumbuhan *C. capsici* dilakukan dengan teknik makanan beracun. Uji dilakukan dengan cara menginokulasi isolat jamur *C. capsici* ke media uji yang telah dicampur fraksi kering dari masing-masing ekstrak daun dengan konsentrasi yang berbeda-beda sesuai perlakuan. Hasil inokulasi diinkubasi selama 15 hari pada suhu ruang dan diamati pertumbuhan vegetatifnya setiap hari.

### 3.4.6 Pengamatan

Pengamatan hasil inokulasi dilakukan setiap hari selama 15 hari. Peubah yang diamati adalah diameter koloni jamur dan kerapatan spora. Pengukuran diameter koloni jamur dilakukan untuk mengetahui pertumbuhan vegetatif jamur *C. capsici* pada media PSA. Ukuran diameter koloni jamur adalah nilai rata-rata diameter jamur yang diukur dari empat arah yang berbeda. Berikut adalah ilustrasi pengukuran diameter koloni *C. capsici*.



Gambar 5. Ilustrasi pengukuran diameter koloni *C. capsici*.

Penghitungan kerapatan spora dilakukan pada 15 hari setelah inokulasi. Pada cawan petri yang berisi biakan *C. capsici* berumur 15 hari dituangkan air sebanyak 10 ml kemudian miselium *C. capsici* dikerok menggunakan kaca preparat dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu dirotamikser sampai homogen. Kerapatan spora dihitung menggunakan alat *Haemocytometer*.

Penghitungan spora dilakukan pada lima kotak sedang dan diulang sebanyak tiga kali lalu dirata-ratakan. Volume kotak sedang adalah 0,000004 ml (= 0,2 mm x 0,2 mm x 0,1 mm), Jadi kerapatan spora dalam suspensi dapat dihitung menggunakan persamaan  $C = c \times 10^n$ . C adalah kerapatan spora pada suspensi, c adalah kerapatan spora per ml, dan n adalah tingkat pengenceran ( Lomer dan Lomer, 2004).