

### III. BAHAN DAN METODE

#### 3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Penyakit Tanaman Jurusan Agroteknologi Fakultas Pertanian Universitas Lampung pada September 2014 sampai dengan April 2015.

#### 3.2 Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang digunakan yaitu akuades, alkohol 70%, arang aktif, asam laktat, biakan *C. capsici*, daun saliera (*L. camara*) asal Lampung Selatan, daun tagetes (*T. erecta*) asal Lampung Barat, klorok 1%, media PSA (*Potato Succrose Agar*), metanol teknis, spiritus, dan surfaktan (bahan aktif alkilaril poliglikol eter 360 g/l).

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu *aluminium foil*, *autoklaf*, ayakan tepung, *blender*, bor gabus, botol (volume 140 ml), bunsen, cawan petri (diameter 9 cm), gelas ukur (volume 10 ml), gunting, *haemocytometer*, jarum *ose*, kaca preparat, kaca penutup, kain sifon, labu erlenmeyer (volume 1.000 ml), LAF (*Laminar Air Flow*), lem paralon, mikropipet (volume 100  $\mu$ l – 1.000  $\mu$ l), mikroskop majemuk, mistar, nampan plastik, paralon 3 ukuran ( 4 inci, 2 inci, dan

1 inci ), penyambung paralon, pinset, pisau, plastik tahan panas, plastik *wrap*, *rotamixer*, spatula, timbangan elektrik, dan tisu.

### 3.3 Metode Penelitian

Metode penelitian ini merupakan percobaan Rancangan Acak Lengkap (RAL)

Tersarang. Konsentrasi tersarang pada ekstrak tanaman uji. Ekstrak tanaman uji

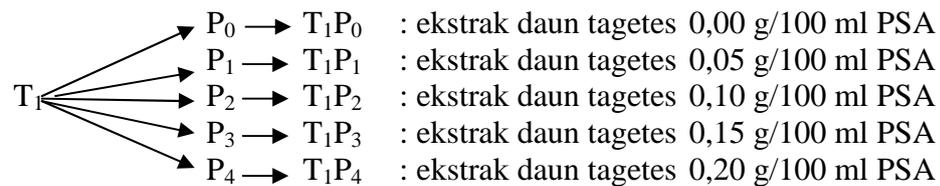
(T) terdiri dari: ekstrak daun saliera ( $T_1$ ) dan tagetes ( $T_2$ ). Konsentrasi (P) terdiri

dari: 0,00 g/100 ml (0 ppm) ( $P_0$ ), 0,05 g/100 ml (500 ppm) ( $P_1$ ), 0,10 g/100 ml

(1.000 ppm) ( $P_2$ ), 0,15 g/100 ml (1.500 ppm) ( $P_3$ ), dan 0,20 g/100 ml (2.000 ppm)

( $P_4$ ). Setiap perlakuan diulang sebanyak 5 kali sehingga diperoleh 50 satuan

percobaan. Perlakuan tersebut adalah sebagai berikut:



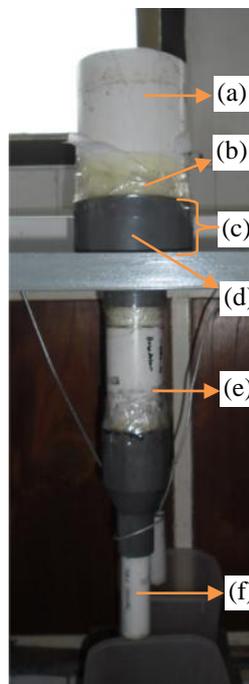
Data pengamatan dianalisis ragam dan jika perlakuan menunjukkan pengaruh

yang nyata maka dilanjutkan dengan uji polinomial ortogonal pada taraf 5%.

### 3.4 Pelaksanaan Penelitian

#### 3.4.1 Pembuatan Fraksi Ekstrak Daun Tanaman Uji

Pembuatan ekstrak daun *T. erecta* dilakukan menggunakan alat fraksinasi sederhana (Gambar 4). Alat fraksinasi sederhana terdiri dari tiga paralon dengan ukuran diameter yang berbeda. Pada tingkat pertama menggunakan paralon berdiameter 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  $\pm 5$  cm dari permukaan kain sifon. Arang aktif digunakan sebagai penyaring.



Gambar 4. Alat fraksinasi : (a) paralon 4 inci; (b) kain sifon (berada di dalam (pada bagian bawah paralon 4 inci)); (c) arang aktif  $\pm 5$  cm; (d) penyambung paralon; (e) paralon 2 inci; (f) paralon 1 inci.

Ekstrak daun *T. erecta* dibuat dari daun yang segar. Tahap pertama yang dilakukan pada pembuatan ekstrak daun *T. erecta* yaitu 200 g daun *T. erecta* dicuci dengan air bersih kemudian dikeringanginkan. Tahap kedua, daun yang sudah dikeringanginkan ( $\pm 20$  menit) dihaluskan menggunakan *blender* dengan penambahan air 1.000 ml. Tahap ketiga yaitu memasukkan daun yang sudah halus ke dalam alat fraksinasi, hasil ekstraksi ditampung dalam nampan. Setelah tetesan hasil ekstrak daun tersebut berhenti menetes ( $\pm 24$  jam) dilanjutkan dengan memasukkan metanol teknis 1.000 ml ke dalam alat fraksinasi tersebut dan hasil fraksinasi ditampung dengan nampan. Setelah diperoleh ekstrak daun *T. erecta*, ekstrak dikeringanginkan ( $\pm 13$  hari) kemudian dikeruk, dimasukkan ke dalam cawan, dan ditimbang untuk disimpan sebelum menyiapkan media uji. Dari ekstrak 200 g daun tumbuhan diperoleh 3 g formula. Pembuatan fraksi ekstrak daun *L. camara* sama seperti tahapan pembuatan fraksi ekstrak *T. erecta*.

#### **3.4.2 Penyiapan Media PSA (*Potato Succrose Agar*) dan Media Uji**

Media perbanyakan isolat *C. capsici* dan uji penghambatan pertumbuhan dan perkembangan *C. capsici* yang digunakan adalah PSA. PSA sebanyak 1 liter dibuat dengan 200 g kentang, 20 g gula pasir, dan 20 g agar batang. Air rebusan semua bahan dimasukkan ke dalam tabung erlenmeyer kemudian ditutup dengan *aluminium foil*, dan dimasukkan ke dalam plastik tahan panas. Setelah itu, media PSA disterilisasi menggunakan *autoklaf* dengan suhu 121°C dan tekanan 1 atm selama  $\pm 20$  menit. Media yang telah steril kemudian ditambahkan asam laktat sebanyak 1,4 ml lalu media dibagi ke dalam 5 botol (volume 140 ml), setiap botol diisi media sebanyak 100 ml. Botol pertama yang berisi 100 ml media (TPO),

botol kedua ditambahkan ekstrak tumbuhan uji sebanyak 0,05 g (TP1), botol ketiga ditambahkan ekstrak tumbuhan uji sebanyak 0,10 g (TP2), botol keempat ditambahkan ekstrak tumbuhan uji sebanyak 0,15 g (TP3), dan botol keempat ditambahkan ekstrak tumbuhan uji sebanyak 0,20 g (TP4). Kemudian masing-masing botol ditambahkan larutan surfaktan 0,002% (2 ml surfaktan/ 1.000 ml akuades) sebanyak 50 µl. Pencampuran ekstrak tanaman uji ke dalam media PSA ketika media bersuhu  $\pm 40^{\circ}\text{C}$ . Media PSA inilah yang digunakan dalam percobaan terhadap pengujian pertumbuhan *C. capsici* secara *in vitro*.

### **3.4.3 Penyiapan Isolat *C. capsici***

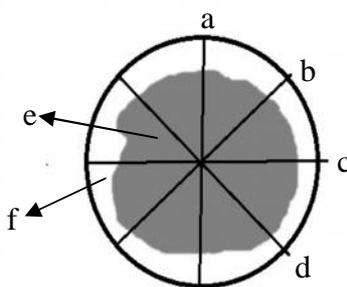
Penyiapan isolat *C. capsici* dimulai dengan mengumpulkan buah cabai yang diduga bergejala antraknosa. Bagian permukaan buah cabai yang bergejala antraknosa diambil sporanya kemudian diletakkan pada kaca preparat dan diamati di bawah mikroskop untuk melihat morfologinya, lalu dibandingkan dengan literatur. Apabila sesuai dengan morfologi *C. capsici* bagian buah cabai yang bergejala tersebut dipotong kecil antara bagian yang sehat dan yang bergejala dengan ukuran  $\pm 5$  mm. Potongan tersebut kemudian didesinfeksi dalam klorok 1 % selama 30 detik lalu dibilas dengan aquades dan dikeringanginkan di atas tisu. Kemudian potongan tersebut diinokulasi dalam media PSA dan diinkubasikan dengan suhu kamar 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 & Hunter (1987) dan Semangun (2004).

### 3.4.4 Uji Penghambatan Pertumbuhan *C. capsici*

Uji penghambatan yang digunakan dalam percobaan ini adalah teknik makanan beracun (*poisoned food technique*). Pengujian dilakukan dengan menginokulasikan biakan *C. capsici* dalam media yang telah dicampur dengan ekstrak tanaman uji. Biakan *C. capsici* diambil dengan menggunakan bor gabus yang berdiameter  $\pm 5$  mm untuk diinokulasikan pada media.

### 3.4.5 Pengamatan

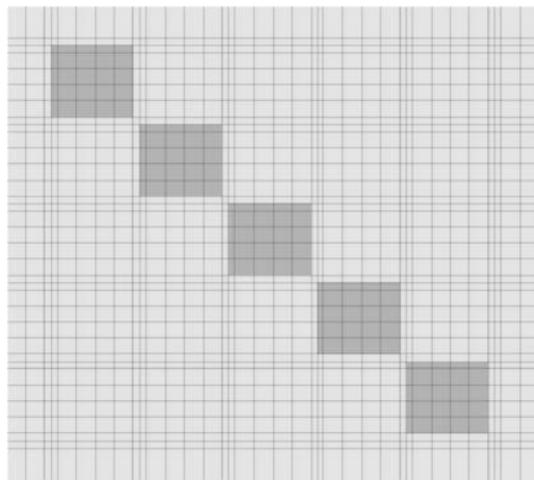
Pengamatan dilakukan terhadap dua variabel, yaitu diameter koloni dan kerapatan spora *C. capsici*. Pengamatan diameter koloni jamur dilakukan untuk mengetahui laju pertumbuhan vegetatif jamur. Nilai diameter jamur adalah nilai rata-rata pengukuran diameter dari empat arah yang berbeda. Cara mengukur koloni jamur dilakukan dengan menarik garis dari empat arah yang berbeda pada media biakan (Gambar 5). Pengukuran dilakukan pada hari ke 2 sampai ada salah satu diameter koloni jamur mencapai 9 cm (memenuhi cawan) dari semua perlakuan.



Gambar 5. Ilustrasi pengukuran diameter koloni *C. capsici* : (a, b, c, & d) diameter koloni, (e) koloni *C. capsici*, (f) media PSA.

Kerapatan spora dihitung menggunakan alat *haemocytometer*. Sebelum menghitung kerapatan spora, dituangkan air ke dalam cawan petri berisi biakan

*C. capsici* sebanyak 10 ml kemudian permukaan koloni sampai dasar koloni *C. capsici* dikeruk dengan kaca preparat. Setelah semua bagian (miselium & spora) *C. capsici* terlepas (suspensi), suspensi tersebut dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan dihomogenkan menggunakan *rotamixer* (Pengenceran  $10^1$ ). Selanjutnya suspensi diambil sebanyak 0,1 ml (100  $\mu$ l) kemudian diteteskan pada parit kaca *haemocytometer* dan dibiarkan menyebar. Kemudian, ditutup dengan kaca penutup. Bidang pengamatan pada *haemocytometer* yang digunakan adalah bidang kotak sedang. Panjang dan lebar masing-masing bidang yaitu 0,2 mm, kedalaman 0,1 mm, dan bervolume 0,004 mm<sup>3</sup> atau setara dengan 0,000004 ml ( $4 \times 10^6$  ml) (Gambar 6).



Gambar 6. Bidang pengamatan pada *haemocytometer*  
(Sumber : Lomer & Lomer, 2004)

Kerapatan spora pada kotak sedang dihitung dengan menggunakan rumus

Sudibyo (1994) dalam Majid dkk. (2014):

$$K = \frac{T}{N} \times 2,5 \times 10^5$$

Keterangan:

K : kerapatan spora per ml larutan

T : jumlah total spora dalam kotak sampel yang diamati  
(kotak sedang)

N : jumlah kotak sampel yang diamati

$2,5 \times 10^5$  : konstanta (faktor koreksi penggunaan kotak sampel skala sedang  
pada *haemocytometer*)