

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

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

Penelitian dilakukan di Laboratorium Penyakit Tanaman , Fakultas Pertanian, Universitas Lampung dan penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juni 2014 sampai dengan Agustus 2014.

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

Bahan-bahan yang digunakan adalah aquades, media PDA, antibiotik, ekstrak rimpang jahe, kencur, kunyit, lengkuas, alkohol, NaOCl 0,5%, buah pisang *cavendish* dan biakan murni *C. musae*.

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah cawan petri, bunsen, pinset, korek api, LAF, *haemocytometer*, tabung reaksi, timbangan, gelas ukur, pipet tetes, nampan, alat tulis, jarum ose, mikroskop, oven, *autoclave*, rotamixer, labu erlenmeyer, blender, mikropipet, penggaris, pinset, label, plastik wrapping, dan kaca preparat.

### 3.3 Metode Penelitian

Perlakuan disusun dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri atas 5 perlakuan dan 6 ulangan, yaitu kontrol (P1), ekstrak rimpang jahe (P2), kunyit (P3), kencur (P4), dan lengkuas (P5). Penelitian dilakukan dengan 2 tahap yaitu uji penghambatan pertumbuhan jamur *C. musae* secara *in-vitro* dan uji pengaruh aplikasi ekstrak tanaman jahe, kunyit, kencur dan lengkuas pada buah pisang secara *in-vivo*.

Masing-masing perlakuan menggunakan ekstrak tanaman dengan konsentrasi 10% (v/v). Data yang diperoleh dianalisis dengan sidik ragam kemudian dilanjutkan dengan membandingkan nilai tengah dengan uji beda nyata terkecil (BNT) pada taraf 5%.

### 3.4 Pelaksanaan Penelitian

#### 3.4.1 Pembuatan Media *Potato Dextrose Agar* (PDA)

Dalam satu liter akuades mengandung 200 gr kentang, 20 gr agar, 20 gr *dextrose* dan 1,4 ml asam laktat.

1. Kentang yang sudah dikupas dibersihkan, lalu dipotong dadu kecil dan ditimbang sebanyak 200 gr.
2. Potongan kentang dimasukkan ke dalam panci yang berisi air akuades 1000 ml dan dimasak sampai kentang matang dan lunak, kemudian sari dari kentang

tersebut diambil dan dimasukkan ke dalam *erlenmeyer* hingga mencapai volume 1 liter.

3. *Dextrose* dan agar ditimbang masing-masing 20 gr, lalu dimasukkan ke dalam *erlenmeyer* yang telah berisi sari kentang 1 liter.
4. Larutan tersebut diaduk hingga homogen. Kemudian setelah larutan homogen, dimasukkan 2 tablet Trimizin yang telah digerus halus ke dalam *erlenmeyer* tersebut.
5. Mulut tabung *erlenmeyer* kemudian dibungkus menggunakan kertas alumunium foil sebelum dimasukkan ke dalam autoklaf diikat dengan karet dan dibungkus dengan plastik tahan panas, kemudian *erlenmeyer* disterilkan dengan autoklaf dan dipanaskan selama 20 menit pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  dan 1 atm.
6. Setelah disterilkan, *erlenmeyer* dikeluarkan dari autoklaf dan media PDA siap digunakan

### **3.4.2 Penyiapan biakan murni *C. Musae***

Bagian dari buah pisang yang mempunyai gejala khas penyakit antraknosa pisang yang disebabkan oleh *C.musae* diambil dan diisolasi. Isolasi dilakukan dengan cara sebagai berikut :

1. Bagian buah yang terinfeksi dipotong kecil-kecil ukuran 2 x 2 mm diantara bagian yang sehat dan sakit.
2. Bagian kulit buah terinfeksi yang sudah dipotong kecil-kecil kemudian direndam dalam larutan NaOCl 0,5% selama 1 menit dan diulang sebanyak 2

kali. Setelah itu kulit buah dibilas dengan air steril atau aquades sebanyak 2 kali dan dikeringkan di atas kertas tisu lalu diletakkan pada media PDA.

3. Jamur *C. musae* yang sudah tumbuh di dalam media yang sebelumnya direisolasi ke media PDA yang baru sehingga didapatkan biakan murni.

### **3.4.3 Pembuatan Ekstrak Rimpang Jahe, Kunyit, Kencur, dan Lengkuas**

Rimpang tumbuhan yang akan digunakan sebagai ekstrak terlebih dahulu dicuci dengan air keran lalu dikeringanginkan. Bahan tersebut ditimbang sebanyak 100 gr, lalu diblender dan dihomogenkan dalam 100 ml aquades steril. Cairan yang diperoleh disaring dengan empat lapis kain kasa steril. Cairan didefinisikan sebagai aliquat (larutan standar), semua ekstrak diuji dengan konsentrasi 10% (v/v).

### **3.4.4 Pengujian Ekstrak Tanaman**

#### **3.4.4.1 Pengujian Secara *In-vitro***

Pengujian yang pertama dilakukan uji *in-vitro* penghambatan pertumbuhan *C. musae* pada media PDA. Media PDA dituang kedalam cawan petri sebanyak 9 ml lalu ditambahkan ekstrak tanaman uji sebanyak 1 ml sehingga konsentrasinya 10% (v/v) dan menjadi homogen dalam satu media. Setelah media PDA beku, miselia *C. musae* pada biakan murni diambil dengan bor gabus berdiameter 0,5

cm lalu diletakkan di tengah-tengah cawan petri, kemudian diinkubasi pada suhu kamar.

#### **3.4.4.2 Pengujian Secara *In-vivo***

Pengujian yang kedua yaitu uji *in-vivo* pengaruh aplikasi ekstrak tanaman jahe, kunyit, kencur dan lengkuas pada buah pisang yang diinokulasikan jamur *C. musae*. Buah pisang yang sehat dilukai atau disayat sebanyak  $\pm 50$  sayatan kemudian ekstrak tanaman uji dengan konsentrasi 10% (v/v) dilumurkan pada buah pisang lalu dibiarkan sampai meresap dalam waktu  $\pm 6$  jam setelah itu disemprotkan suspensi inokulum jamur *C. musae* lalu buah pisang pun diinkubasi.

#### **3.4.5 Pengamatan**

##### **3.4.5.1 Pengamatan Uji *In-vitro***

Pengamatan pertumbuhan *C. musae* didapat pada diameter koloni *C. musae*, sedangkan perkembangannya diamati pada kerapatan spora *C. musae*.

Pengamatan untuk menghitung penghambatan pertumbuhan jamur pada cawan petri secara *in-vitro* dilakukan dengan cara mengukur diameter koloni secara tegak lurus antar diameter sehingga diperoleh rata-rata diameter koloni *C. musae*. Data yang diperoleh selanjutnya digunakan untuk menghitung diameter *C. musae* dengan rumus sebagai berikut :

$$D = \frac{D1 - D2}{2}$$

Keterangan: D = Diameter *C. musae* (cm)  
 D1= Diameter *C. musae* arah tegak lurus keatas  
 D2= Diameter *C. musae* arah tegak lurus kesamping

Pengamatan perkembangan jamur *C. musae* pada cawan petri juga diukur dengan melihat kerapatan spora koloni jamur *C. musae*. Adapun kerapatan spora dapat dihitung dengan menggunakan rumus menurut Sudiby (1994) dalam Surtikanti dan Juniarsih (2010) sebagai berikut:

$$K = \text{jumlah spora} \times 0,25 \times 10^6$$

Keterangan : K = kerapatan spora per ml larutan  
 0,25 = faktor koreksi penggunaan kotak sampel skala kecil pada *haemocytometer*

Penghitungan kerapatan spora dilakukan dengan cara spora *C. musae* yang tumbuh pada tiap cawan petri pada tiap ulangan diambil dengan jarum ose lalu dimasukan dalam air aquades steril dalam cawan petri lalu dihomogenkan. Setelah itu suspensi spora *C. musae* diteteskan pada ruang hitung *haemocytometer* lalu ditutup dengan kaca obyek dan jumlah spora dapat dihitung dalam lima kotak sedang di bawah mikroskop dan dilihat rata-ratanya.

### 3.4.5.2 Pengamatan Uji *In-vivo*

Pengamatan untuk pengujian secara *in-vivo* dilakukan setiap hari setelah aplikasi (hsa) dengan melihat gejala antraknosa dan dihentikan apabila pertumbuhan jamur pada perlakuan kontrol sudah menyebabkan gejala bercak yang menyeluruh dan memenuhi permukaan buah. Parameter yang diamati adalah persentase keparahan penyakit berdasarkan luas gejala yang timbul pada permukaan buah pisang. Buah pisang yang menunjukkan gejala bercak, dibungkus rapat dengan plastik wrap bening lalu gejala yang tampak pada buah digambar dengan spidol diatas plastik wrap yang membungkus pisang tadi. Kemudian plastik wrap yang sudah tergambar luas gejala dihitung luas gejalanya (cm) dengan menggunakan kertas milimeter blok. Adapun persentase keparahan penyakit pisang dapat dihitung dengan menggunakan rumus keparahan penyakit sebagai berikut :

$$KP = \frac{\text{Luas daerah yang bergejala}}{\text{Luas permukaan keseluruhan buah pisang}} \times 100 \%$$