

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

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

Percobaan dilakukan di Laboratorium Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Lampung. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan September sampai dengan Desember 2014.

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

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun sirih merah, daun babadotan, daun gulma siam, fungisida berbahan aktif propineb 70%, surfaktan, arang aktif, kain kasa, air steril, metanol teknis, etil asetat teknis, n-heksana teknis, klorok 1%, aquades, alkohol 70%, biakan murni *Colletotrichum capsici*, dan media PSA (*potato sucrose agar*).

Alat-alat yang digunakan antara lain paralon dengan 3 ukuran diameter yang berbeda (4 inci, 2 inci, dan 1 inci), penyambung paralon, mistar, gelas ukur, blender, nampan, timbangan, cawan petri, autoklaf, *laminar air flow* (LAF), labu erlenmeyer, plastik tahan panas, *plastic wrap*, *aluminium foil*, tisu, bunsen, pinset, jarum ose, *cutter*, *haemocytometer*, *drigalsky glass*, *rotamixer*, bor gabus, mikroskop majemuk, kaca preparat dan kaca penutup.

### 3.3 Metode Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dengan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL). Pada penelitian ini terdapat tiga percobaan. Pertama, pengaruh ekstrak daun sirih merah terhadap pertumbuhan dan perkembangan *C. capsici* secara *in vitro*.

Kedua, pengaruh ekstrak daun babadotan terhadap pertumbuhan dan perkembangan *C. capsici* secara *in vitro*. Ketiga, pengaruh ekstrak daun gulma siam terhadap pertumbuhan dan perkembangan *C. capsici* secara *in vitro*.

Terdapat 6 perlakuan dan 5 ulangan pada masing-masing subpercobaan. Keenam perlakuan tersebut adalah ekstrak tanaman uji dengan pelarut air (P1), ekstrak tanaman uji dengan pelarut metanol teknis (P2), ekstrak tanaman uji dengan pelarut etil asetat teknis (P3), ekstrak tanaman uji dengan pelarut n-heksana (P4), fungisida sintetik dengan berbahan aktif propineb 70% (P5), dan air (P6).

Masing-masing konsentrasi fraksi ekstrak tanaman uji sebesar 1000 ppm dan dosis fungisida yang digunakan adalah 1 g/l. Data pengamatan yang diperoleh dianalisis menggunakan sidik ragam Anova.

### 3.4 Pelaksanaan Penelitian

#### 3.4.1 Pembuatan fraksi ekstrak daun sirih merah, babadotan, dan gulma siam dengan pelarut air, metanol teknis, etil asetat teknis, dan n-heksana teknis.

Daun sirih merah, babadotan, dan gulma siam yang digunakan diambil dari lapang dalam kondisi segar, dan tidak berpenyakit. Daun yang diekstrak adalah seluruh daun kecuali daun pucuk. Daun sirih merah diperoleh dari pekarangan rumah di Way Halim, Bandar Lampung. Daun babadotan diperoleh dari pekarangan kosong Natar, Lampung Selatan. Daun gulma siam diperoleh dari tepi jalan

Natar, Lampung Selatan. Daun yang digunakan sebanyak 100 g untuk masing-masing daun. Lalu dicuci bersih dengan air yang mengalir dan dikering anginkan. Kemudian masing-masing daun tersebut diblender hingga halus dengan menggunakan air sebanyak 1 liter. Setelah itu masing-masing tanaman uji yang telah halus diekstraksi secara bertingkat. Ekstraksi ini menggunakan alat fraksinasi yang dibuat sendiri (Gambar 5) dengan menggunakan empat pelarut yaitu air, metanol teknis, etil asetat teknis, dan n-heksana teknis.



Gambar 5. Alat fraksinasi sederhana

Alat fraksinasi sederhana terdiri dari paralon dengan tiga ukuran diameter yang berbeda. Pada tingkat pertama menggunakan paralon dengan diameter 4 inci kemudian 2 inci, dan 1 inci (1 inci = 2,54 cm). Diantara bagian sambungan pertama dan kedua diletakkan kain kasa yang berfungsi sebagai penyaring. Kemudian pada bagian sambungan pertama diisi dengan arang aktif yang halus dengan ketebalan  $\pm 5$  cm dari permukaan kain kasa. Penggunaan arang aktif ini sebagai penyaring (*filter*) senyawa-senyawa nonpolar dari masing-masing tanaman uji.

Setelah alat untuk fraksinasi sudah siap, proses fraksinasi dilakukan sebagai berikut: daun sirih merah yang telah diblender menggunakan air 1 liter dimasukkan ke dalam alat fraksinasi. Kemudian hasil penyaringan ditampung pada nampan plastik dan dikering anginkan. Ekstrak yang sudah kering dikeruk dan disimpan di dalam cawan petri. Hasil yang diperoleh disebut sebagai fraksi ekstrak pelarut air. Ekstrak kasar yang tertinggal di alat fraksinasi selanjutnya diberi pelarut kedua yaitu metanol teknis sebanyak 900 ml. Hasil yang diperoleh dari penyaringan ditampung di dalam nampan plastik dan dikering anginkan. Selanjutnya ekstrak yang sudah kering dikeruk dan disimpan di dalam cawan petri. Ekstrak kering yang diperoleh disebut sebagai fraksi ekstrak pelarut metanol teknis. Hal yang sama dilakukan untuk pelarut ketiga (etil asetat) dan pelarut keempat (n-heksana). Fraksinasi daun babadotan dan gulma siam dilakukan dengan cara yang sama, untuk digunakan pada percobaan kedua dan ketiga. Dalam proses fraksinasi ini digunakan bahan daun tanaman uji yang sama sehingga diperoleh empat fraksi ekstrak setiap tanaman uji antara lain fraksi air, metanol, etil asetat dan n-heksana.

#### 3.4.2 *Penyiapan isolat C. capsici*

*C. capsici* diisolasi dari buah cabai yang menunjukkan gejala penyakit antraknosa. Bagian buah yang bergejala dipotong pada perbatasan bagian yang sehat dan yang sakit sebesar  $\pm 5$  mm. Bagian buah yang telah dipotong tersebut disterilkan dengan cara direndam dalam klorok 0,5% selama 30 detik, kemudian dibilas dengan aquades dan diletakkan pada tisu. Setelah itu potongan buah cabai dimasukkan dalam cawan berisi media PSA dan diinkubasi selama 3 hari pada

suhu ruangan. Jamur yang tumbuh diidentifikasi dengan mengacu pada literatur *Introductory Mycology* (Alexopoulos & Mims, 1997). Apabila jamur yang diperoleh benar *C. capsici*, maka jamur tersebut dimurnikan dan diperbanyak dalam media yang sama.

### 3.4.3 *Penyiapan media uji*

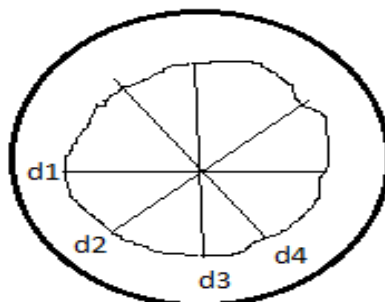
Media yang digunakan untuk pengujian perkembangan *C. capsici* adalah media *potato sucrose agar* (PSA). Bahan yang digunakan untuk membuat 1 liter media PSA adalah kentang 200 g, gula pasir 20 g, dan agar batang 20 g. Pertama, kentang dikupas dan dicuci bersih. Kemudian dipotong seperti dadu dan ditimbang. Setelah itu kentang direbus dengan air sebanyak 1 liter sambil diaduk. Kemudian air rebusan kentang tersebut dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer lalu ditambahkan gula dan agar batang sambil diaduk sampai larutan tercampur rata. Setelah itu media PSA disterilisasi menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C dan tekanan 1 atm selama  $\pm$  20 menit. Dimasukkan 100 ml media yang telah steril ke dalam erlenmeyer kemudian dilarutkan ekstrak tanaman uji sebanyak 100 mg dengan konsentrasi 1000 ppm dari masing-masing ekstrak tanaman uji. Pencampuran ini dilakukan saat media masih dalam keadaan panas dan cair. Media PSA yang telah dicampur dengan ekstrak tanaman uji ini yang akan digunakan sebagai media uji pertumbuhan *C. capsici* secara *in vitro*.

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

Dalam pengujian penghambatan pertumbuhan *C. capsici* menggunakan metode teknik makanan beracun (*poisoned food-base techniq*). Media PSA yang akan digunakan dicampurkan dengan ekstrak tanaman dan ditambahkan surfaktan. Penambahan surfaktan ini bertujuan agar ekstrak tanaman yang akan dicampurkan ke dalam media PSA menjadi homogen. Media PSA dalam cawan petri yang telah dicampur dengan ekstrak tanaman uji digunakan untuk menumbuhkan biakkan *C. capsici*. Biakan murni *C. capsici* dipotong dengan bor gabus dengan diameter  $\pm 5$  mm lalu diletakkan di bagian tengah cawan petri. Inkubasi dilakukan selama 7 hari pada suhu ruangan.

### 3.5 Pengamatan

Peubah yang diamati adalah diameter koloni dan kerapatan spora *C. capsici*. Pengamatan diameter koloni jamur dilakukan untuk mengetahui pertumbuhan vegetatif jamur. Pengukuran diameter koloni jamur dilakukan dengan cara mengukur koloni dari empat garis diagonal yang berbeda kemudian dirataratakan. Pengukuran dilakukan pada hari ke 2 sampai hari ke 9 setelah inokulasi (Gambar 6).



Gambar 6. Cara pengukuran diameter koloni jamur

Penghitungan kerapatan spora dilakukan pada hari ke-14 setelah inokulasi menggunakan alat *haemocytometer*. Pertama, biakan jamur digenangi dengan aquades sebanyak 10 ml. Kemudian aquades diratakan pada permukaan media sehingga semua spora terlepas dari permukaan media dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 90 ml aquades lalu dihomogenkan menggunakan *rotamixer*. Suspensi yang diperoleh digunakan sebagai pengenceran awal ( $10^0$ ). Kemudian diambil 1 ml suspensi spora dengan menggunakan mikropipet lalu diletakkan pada kaca preparat *haemocytometer* hingga suspensi mengalir ke bawah kaca objek dan memenuhi ruang hitung pada kaca preparat *haemocytometer*. Kerapatan spora dihitung dengan menggunakan rumus Gabriel dan Riyatno, 1989 dalam Herlinda dkk. (2006) :

$$S = \frac{t}{(n \times 0,25)} \times 10^6$$

Keterangan:

S : jumlah spora per ml larutan

t : jumlah total spora dalam kotak sampel yang diamati

0,25 : konstanta (faktor koreksi penggunaan kotak sampel skala kecil pada *haemocytometer*)

n : jumlah kotak sampel yang diamati