

III. BAHAN DAN METODE

3.1. Tempat dan waktu

Penelitian ini telah dilaksanakan di Laboratorium Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian dan di Laboratorium Organik Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Riau kampus Bina Widya Jalan H.R Soebrantas Km 12,5 Simpang Baru Panam Pekanbaru, dimulai pada bulan November 2008 sampai Januari 2009.

3.2. Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah: daun mimba, buah cabai varietas TM-999 yang matang dan sehat dengan ukuran panjang lebih kurang 13 cm dan diameter lebih kurang 1 cm, buah cabai yang bergejala penyakit antraknosa, sabun krim, akuades steril, alkohol 70%, Potato Dextrose Agar instant, Amoksilin, *aluminium foil*, plastik transparan, tissue gulung.

Alat yang digunakan antara lain: cawan petri, kotak plastik berukuran 30 x 30 x 10 cm, jarum oose, kertas saring, pinset, tabung reaksi, *micro pipet*, *cork borer*, gelas piala 1000 ml, *erlenmeyer* 500 ml, gelas ukur, batang pengaduk kaca, pipet tetes, *laminar air flow cabinet*, otoklaf, inkubator, "*rotary vaccum evaporator*", *rotary shaker*, *automatic mixer*, kompor gas, lampu spirtus, gelas objek, gelas penutup, mikroskop, haemasitometer, timbangan analitik, blender, ember plastik, botol plastik dan alat tulis.

3.3. Metode Penelitian

3.3.1. Uji *in-vitro* Penghambatan Pertumbuhan *C. capsici* dan Uji *in-vivo* Pengaruh Ekstrak Daun Mimba Pada Buah Cabai

Penelitian dilakukan secara eksperimen menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 6 perlakuan dan 5 ulangan sehingga terdapat 30 unit percobaan.



Perlakuan yang diaplikasikan dalam penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak daun mimba sebagai berikut:

$$M_0 = 0 \%$$

$$M_1 = 1 \%$$

$$M_2 = 5 \%$$

$$M_3 = 10 \%$$

$$M_4 = 15 \%$$

$$M_5 = 20 \%$$

Pada uji penghambatan patogen secara *in-vitro* terhadap jamur *Colletotrichum capsici* tiap unit percobaan terdiri dari 2 cawan petri. Sedangkan untuk uji *in-vivo* aplikasi ekstrak mimba pada buah cabai untuk pengamatan masa inkubasi dan intensitas serangan *Colletotrichum capsici* pada buah cabai, tiap unit percobaan terdapat 8 buah cabai sehingga dibutuhkan 240 buah cabai. (Bagan percobaan dapat dilihat pada Lampiran 2 dan 3).

Data yang diperoleh dianalisis secara statistik dengan analisis ragam dan diuji lanjut dengan Uji *Duncan's New Multiple Range Test* (DNMRT) pada taraf 5%. Persamaan linier sidik ragamnya adalah sebagai berikut:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \epsilon_{ij}$$

Keterangan:

Y_{ij} = Hasil pengamatan pada satu unit percobaan pada perlakuan konsentrasi ekstrak daun mimba ke-i ulangan ke-j.

μ = Nilai tengah umum.

α_i = pengaruh perlakuan konsentrasi ekstrak daun mimba

ϵ_{ij} = galat percobaan pada perlakuan konsentrasi ekstrak daun mimba ke-i dan ulangan ke-j

3.4. Pelaksanaan Penelitian

3.4.1. Penyiapan Buah Cabai

Buah cabai yang akan digunakan dalam penelitian ini diambil dari pertanaman cabai di daerah Kartama Kecamatan Marpoyan Damai. Buah cabai yang diambil



adalah buah yang siap panen dengan kriteria: buah cabai telah matang secara fisiologis, sehat (tidak ada gejala serangan patogen) dan seragam dengan warna merah seluruhnya. Buah cabai yang akan diambil berukuran relatif sama yaitu berukuran panjang \pm 13 cm. Buah cabai diambil satu hari sebelum digunakan sebanyak 240 buah.

3.4.2. Ekstraksi daun mimba

Sebanyak 500 g daun mimba dicuci dengan air mengalir kemudian dikering anginkan dan diblender. Kemudian dimasukkan ke dalam ember plastik. Kemudian ke dalamnya dimasukkan sedikit demi sedikit pelarut metanol, hingga seluruh daun mimba terendam dengan perbandingan 1 : 4 (w/v) dan diaduk sebanyak 20 kali menggunakan batang pengaduk kaca. Lama perendaman adalah 3 x 24 jam. Setelah itu larutan ekstraksi disaring dengan kain halus. Hasil saringan tersebut dimasukkan ke dalam botol plastik. Selanjutnya larutan ekstrak disimpan dalam wadah yang tertutup rapat.

Ekstrak daun mimba yang diperoleh, selanjutnya dipekatkan menggunakan "rotary vaccum evaporator" pada suhu 40°C secara berulang hingga diperoleh larutan ekstrak (larutan stok). Larutan ini kemudian diencerkan dengan aquades steril untuk memperoleh konsentrasi masing-masing perlakuan (lihat Lampiran 4.).

3.4.3. Isolasi *Colletotrichum capsici*

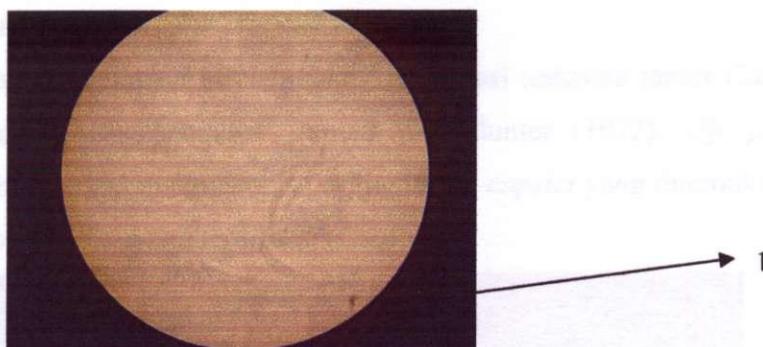
Isolat *Colletotrichum capsici* diperoleh dengan cara mengisolasi patogen dari buah cabai yang menunjukkan gejala serangan patogen antraknosa. Tahap awal proses isolasi adalah membuat *moist chamber* yang bertujuan untuk menumbuhkan miselium dari bagian yang terserang. Kulit buah dipotong setengah bagian yang sakit dan setengah bagian yang sehat dengan ukuran 1 x 1 cm dimasukkan dalam akuades steril dan dilakukan sterilisasi permukaan dengan cara mencelupkan bagian tanaman yang terinfeksi ke dalam alkohol 70% selama 1 menit dan dibilas dengan cara mencelupkan ke dalam akuades steril sebanyak 2 kali. Kemudian potongan kulit buah diletakkan pada cawan petri yang telah dilapisi kertas saring steril sebanyak 3 lapis

dan dibasahi dengan akuades stereril hingga lembab. Tiap cawan petri terdapat 5 potongan kulit buah cabai yang disusun terpisah. Cawan Petri tersebut diinkubasi dalam inkubator pada suhu kamar selama 3 hari.

Miselium jamur yang tumbuh dari kulit buah diisolasi kembali pada media PDA dan diinkubasi selama 1 minggu. Kegiatan isolasi dilakukan di dalam *laminar air flow cabinet* untuk mencegah kontaminasi pada biakan jamur.

Hasil dari isolasi ini kemudian diidentifikasi secara makroskopis dan mikroskopis untuk memastikan isolat yang didapat benar merupakan jamur *Colletotrichum capsici*. Ciri-ciri dari jamur *Colletotrichum capsici* dapat dilihat pada Gambar 2 dan Gambar 3.

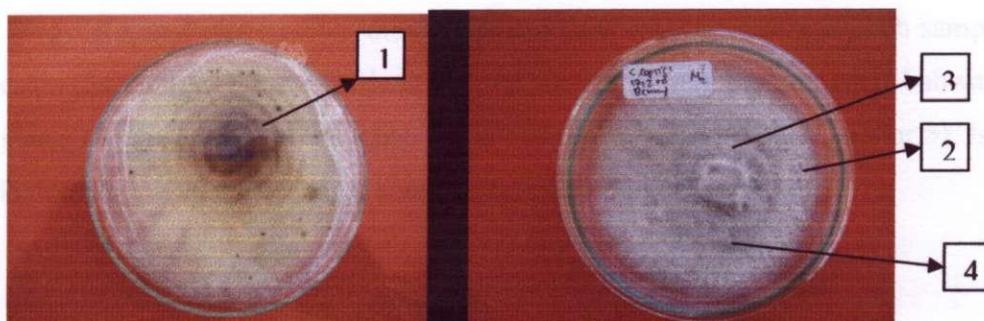
Gambar 2. Identifikasi jamur *Colletotrichum capsici* secara mikroskopis



Keterangan:

1. Spora jamur *Colletotrichum capsici* yang berbentuk bulan sabit (perbesaran 10 x 40).

Gambar 3. Identifikasi jamur *Colletotrichum capsici* secara makroskopis



Gambar. 3a

Gambar. 3b

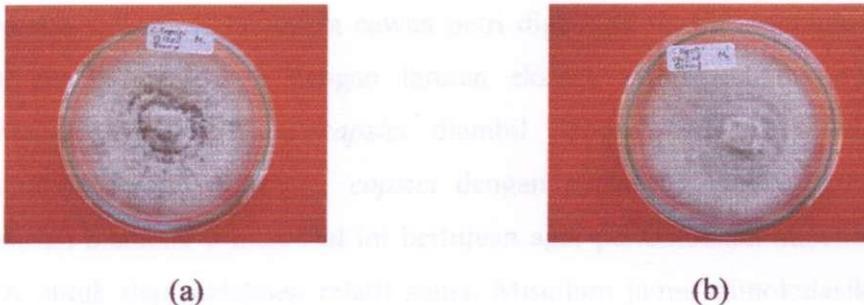
Keterangan:

1. Jamur membentuk garis lingkaran pada cawan petri bagian bawah (Gambar 3a) yang berwarna kehitaman.
2. Miselium jamur *Colletotrichum capsici* tumbuh ke arah samping (Gambar 3b).
3. Miselium menebal yang dimulai dari bagian tengah (Gambar 3b).
4. Miselium yang menebal berwarna keabu-abuan (Gambar 3b).

Identifikasi mikroskopis jamur *Colletotrichum capsici* dilakukan dengan mengacu pada literatur dari Illustrated Genera Of Imperfect Fungi (Barnett dan Hunter, 1972).

3.4.4. Uji Patogenesitas

Pengujian dilakukan setelah hasil identifikasi terhadap jamur *Colletotrichum capsici* sesuai dengan pendapat Barnett dan Hunter (1972). Uji patogenesitas menggunakan 2 variasi makroskopis dari jamur *C. capsici* yang ditemukan dari hasil isolasi pada buah cabai yang terinfeksi (Gambar 4).



(a)

(b)

Gambar 4. Variasi jamur *Colletotrichum capsici*, (a) C1 (M1) dan (b) C2 (M2)

Kedua isolat tersebut diinokulasikan pada masing-masing 8 buah sample buah cabai. Setelah 8 hari variasi jamur *C. capsici* (C1) memberikan hasil bahwa isolate jamur *C. capsici* dapat menyebabkan intensitas serangan >50% (Gambar 5). Isolat ini kemudian digunakan sebagai sumber inokulum dalam penelitian.



Gambar 5. Hasil uji patogenesis variasi *C. Capsici* (C1)

3.4.5. Uji *in-vitro* Penghambatan Pertumbuhan *C. capsici*

Pengujian dilakukan dengan menumbuhkan inokulum (miselium) biakan murni jamur *Colletotrichum capsici* pada media PDA yang telah dicampur dengan larutan ekstrak mimba sesuai konsentrasi perlakuan. Inokulasi patogen pada PDA dilakukan di dalam *laminar air flow cabinet*.

PDA cair dengan suhu $\pm 40^{\circ}\text{C}$ dituangkan sebanyak 10 ml dituangkan dalam cawan Petri. Kemudian larutan ekstrak mimba dicampurkan ke dalam cawan petri sebanyak 0,5 ml. Selanjutnya cawan petri digoyang secara memutar dengan tangan agar tercampur merata dengan larutan ekstrak mimba, diamkan hingga padat. Miselium *Colletotrichum capsici* diambil dengan cara memotong PDA yang ditumbuhi biakan murni *C. capsici* dengan pemotong media PDA (*cork borer*) seukuran diameter 5 mm. Hal ini bertujuan agar pertumbuhan miselium pada media PDA untuk tiap perlakuan relatif sama. Miselium jamur diinokulasikan pada PDA yang telah dicampur dengan larutan mimba tepat di bagian tengah cawan petri, kemudian dilakukan inkubasi dengan memasukkan cawan petri ke dalam inkubator pada suhu kamar dan diamati setiap hari.

3.4.6. Persiapan Inokulasi Jamur *Colletotrichum capsici* pada buah cabai

Inokulum jamur *Colletotrichum capsici* yang digunakan adalah hasil isolasi pada media PDA. Miselium jamur yang tumbuh pada permukaan media PDA dicuci dengan akuades steril sebanyak 10 ml. Proses pencucian dibantu dengan kuas kecil

steril agar miselium dan spora yang terdapat pada permukaan media dapat lepas dan terbawa bersama akuades. Air cucian ditampung dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu diaduk dengan *rotary shaker* selama 5 menit agar spora dapat terlepas dan menyebar dalam suspensi, kemudian diamati dibawah mikroskop untuk memastikan karakteristik *C. capsici* sehingga dapat dijadikan sebagai sumber inokulum. Kemudian dari larutan induk tersebut dilakukan pengenceran 10^{-1} dengan cara mengambil 1 ml untuk dicampurkan ke dalam aquades sebanyak 9 ml dan diaduk dengan *rotary shaker* 5 menit. Pengenceran dilakukan sampai pada pengenceran 10^{-8} . Kepadatan spora pada suspensi inokulum *C. capsici* yang didapat adalah $1,25 \times 10^6$ konidia/ml yang dihitung dengan menggunakan haemasitometer (Syamsudin, 2003).

Sebelum kegiatan inokulasi jamur *Colletotrichum capsici* dilakukan sterilisasi permukaan pada sampel buah cabai dengan membilas dalam akuades dan dicelupkan ke dalam alkohol 70% selama 3 menit. Kemudian buah dibilas dalam akuades steril dengan cara direndam selama 3 menit.

Aplikasi inokulasi jamur *Colletotrichum capsici* dilakukan dengan mencelupkan buah cabai yang menjadi sampel ke dalam suspensi inokulum jamur *Colletotrichum capsici* dengan kepadatan $1,25 \times 10^6$ konidia/ml selama 3 menit. Setelah dicelup di dalam suspensi jamur *Colletotrichum capsici* buah tersebut dibiarkan selama 5 menit.

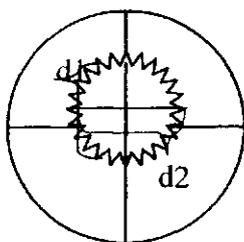
3.4.6. Aplikasi Ekstrak Daun Mimba Pada Buah Cabai (*in vivo*)

Buah cabai yang telah dicelupkan dalam 1 l suspensi inokulum jamur *Colletotrichum capsici* dibiarkan selama 5 menit dan dimasukkan ke dalam larutan ekstrak daun mimba sesuai dengan masing-masing konsentrasi selama 5 menit. Buah cabai yang telah diberi perlakuan dimasukkan ke dalam wadah kotak plastik yang telah diberi alas terlebih dulu dengan kertas saring lembab kemudian ditutup rapat. Tiap kotak plastik berisi 8 sampel buah cabai yang disusun secara terpisah. Untuk menjaga kelembaban dalam wadah dilakukan penyemprotan dengan aquades steri dengan alat penyemprot yang terbuat dari plastik. Kotak-kotak plastik disusun di atas meja pada suhu ruangan (Lampiran 2).

3.5. Pengamatan

3.5.1. Diameter Koloni jamur *Colletotrichum capsici* pada Cawan Petri (mm)

Pengamatan dilakukan setiap hari terhadap koloni jamur yang tumbuh pada cawan petri untuk tiap unit percobaan. Pengukuran diameter koloni dilakukan mulai pertama kali jamur tumbuh setelah inokulasi hingga koloni pada tanpa perlakuan (M_0) memenuhi cawan petri. Alat yang digunakan dalam pengukuran adalah kertas milimeter. Cara penghitungan diameter koloni dilakukan dengan membuat garis vertikal dan horizontal yang berpotongan tepat pada titik tengah koloni jamur pada cawan petri. Garis dibuat di bagian bawah cawan petri yang berfungsi untuk mempermudah perhitungan diameter koloni. Cara pengukuran pada cawan petri adalah sebagai berikut:



Gambar 6. Cara pengukuran pada cawan petri.

Rumus untuk menghitung diameter koloni adalah:

$$D = \frac{d1 + d2}{2}$$

Keterangan:

d1 = diameter vertikal koloni jamur *Colletotrichum capsici*

d2 = diameter horizontal koloni jamur *Colletotrichum capsici*

D = diameter koloni jamur *Colletotrichum capsici*

3.5.2. Persentase Penghambatan Ekstrak Daun Mimba Terhadap Jamur *Colletotrichum capsici* Pada Cawan Petri (%)

Persentase penghambatan pertumbuhan koloni jamur *Colletotrichum capsici* pada cawan petri dihitung menurut rumus Pandey *et al*, (1982) dalam Noveriza dan Tombe, (2003). Rumus persentase penghambatan adalah sebagai berikut:

$$P = \frac{a - b}{a} \times 100\%$$

Keterangan:

P = persentase penghambatan

a = diameter koloni jamur *Colletotrichum capsici* pada tanpa perlakuan

b = diameter koloni jamur *Colletotrichum capsici* pada perlakuan

Persentase penghambatan dihitung diamati dari diameter koloni setiap 1 hari hingga hari ke-6 koloni jamur memenuhi cawan petri.

3.5.3. Masa Inkubasi Jamur *Colletotrichum capsici* Pada Buah Cabai (hari)

Pengamatan masa inkubasi dilakukan dengan melihat lama waktu munculnya gejala awal setelah inokulasi patogen dan aplikasi ekstrak daun mimba. Pengamatan dilakukan setiap hari pada tiap unit percobaan hingga semua unit percobaan menunjukkan gejala awal serangan patogen. Timbulnya gejala awal pada uji pengaruh aplikasi ekstrak daun mimba pada buah cabai, ditandai dengan timbulnya bercak coklat kehitaman pada permukaan kulit buah.

3.5.4. Intensitas Serangan *Colletotrichum capsici* Pada Buah cabai (%)

Penghitungan intensitas serangan dilakukan mulai saat pertama muncul gejala sampai didapat nilai intensitas serangan > 50 % pada perlakuan (konsentrasi) dengan interval pengamatan 2 hari. Intensitas serangan pada buah cabai dihitung dengan rumus gejala bervariasi (Natawigena, 1990 dalam Elvina dan Puspita, 2005).

Rumus intensitas serangan untuk gejala bervariasi adalah sebagai berikut:

$$I = \frac{\sum n_i \times v_i}{Z \times N} \times 100\%$$



Keterangan :

I = intensitas serangan

n_i = banyak buah atau bagian buah yang diamati tiap kategori serangan.

v_i = nilai skala kerusakan dari tiap kategori serangan

Z = nilai skala kerusakan tertinggi dari tiap kategori serangan

N = banyak buah atau bagian buah yang diamati

Kategori serangan ditetapkan melalui skoring modifikasi dari Hayati (2005) dalam Pamekas (2007) sebagai berikut:

Skala 0 = tidak ada bercak atau gejala

Skala 1 = luas bercak, 0-10%

Skala 2 = luas bercak, >10%-20%

Skala 3 = luas bercak, >20%-30%

Skala 4 = luas bercak, >30%-40%

Skala 5 = luas bercak, >40%-50%

Skala 6 = luas bercak, >50%

Gambar dari masing-masing kategori serangan dapat dilihat pada Lampiran 3.