

III. BAHAN DAN METODE

3.1. Tempat dan waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Riau kampus Bina Widya Jl. H.R Soebrantas Km 12,5 Simpang Baru Panam Pekanbaru dan di Laboratorium Kimia Organik FMIPA USU Jl. Bioteknologi No.1 Kampus USU Medan, pada bulan September - November 2010.

3.2. Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah: buah Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) yang setengah matang (asal dari daerah Desa Palo Kecamatan Pagar Merbau Kabupaten Deli Serdang), buah cabai varietas TM-999 yang matang dan sehat dengan ukuran panjang ± 12 cm dan diameter $\pm 0,8$ cm (asal dari daerah Jl Amal Ujung Pasir Putih Pekanbaru), buah cabai yang bergejala penyakit antraknosa, aquades steril, NaOCl 10 %, Medium PDA, *aluminium foil*, plastik transparan dan kertas saring.

Alat yang digunakan antara lain: cawan petri berdiameter 9cm, kotak plastik berukuran 30 x 30 x 10 cm, jarum ose, kertas saring, pinset, tabung reaksi, *micro pipet*, *cork borer*, gelas piala 1000 ml, *erlenmeyer* 500 ml, *handsprayer* 250ml, gelas ukur, batang pengaduk kaca, pipet tetes, *laminar air flow cabinet*, otoklaf, inkubator, "*vaccum rotary evaporator*", *rotary shaker*, kompor gas, lampu bunsen, gelas objek, gelas penutup, mikroskop, haemositometer, timbangan analitik, blender, ember plastik, botol kedap dan alat tulis.

3.3. Metode Penelitian

Penelitian dilakukan secara eksperimen menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 5 perlakuan dan 4 ulangan sehingga diperoleh 20 unit percobaan. Penelitian terdiri dari 2 jenis pengujian, yakni uji *In-vitro* penghambatan pertumbuhan jamur *Colletotrichum capsici* dan uji *In-vivo* pengaruh aplikasi ekstrak buah mengkudu pada buah cabai.

Pada uji *in-vitro* penghambatan pertumbuhan jamur *Colletotrichum capsici* digunakan 1 cawan petri per unit percobaan, sedangkan pada uji *in-vivo* pengaruh aplikasi ekstrak buah mengkudu pada buah cabai untuk pengamatan masa inkubasi dan intensitas serangan jamur *Colletotrichum capsici* pada buah cabai, tiap unit percobaan terdiri dari 10 buah cabai sehingga dibutuhkan 200 buah cabai. (Bagan Percobaan dapat dilihat pada Lampiran 2 dan 3).

Perlakuan yang digunakan dalam penelitian ini adalah beberapa konsentrasi ekstrak buah mengkudu (M), sebagai berikut :

$M_0 = 0\%$ (tanpa ekstrak buah mengkudu)

$M_1 = 5\%$ (50 ml ekstrak buah mengkudu / L air)

$M_2 = 10\%$ (100 ml ekstrak buah mengkudu / L air)

$M_3 = 15\%$ (150 ml ekstrak buah mengkudu / L air)

$M_4 = 20\%$ (200 ml ekstrak buah mengkudu / L air)

3.4. Prosedur 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, sehat (tidak ada gejala serangan patogen) dan seragam dengan warna merah seluruhnya dan dipastikan tidak ada penggunaan fungisida sintetis pada buah cabai tersebut. Buah cabai yang akan diambil berukuran relatif sama yaitu berukuran panjang ± 12 cm. Buah cabai diambil satu hari sebelum aplikasi, sebanyak 200 buah.

3.4.2. Ekstraksi Buah Mengkudu

Sebanyak 3 kg buah mengkudu (*Morinda citifolia* L.) yang setengah matang dicuci dengan air mengalir kemudian dikering anginkan, dipotong-potong dan diblender. Kemudian ekstrak tersebut dimasukkan ke dalam ember plastik dan ditambahkan sedikit demi sedikit pelarut metanol, hingga seluruh ekstrak buah mengkudu terendam dengan perbandingan 1 : 3 (w/v) serta 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 kedap. Selanjutnya larutan ekstrak disimpan dalam wadah yang tertutup rapat.

Hasil saringan ekstrak buah mengkudu (filtrat) yang diperoleh, kemudian diuapkan dengan menggunakan mesin penguap listrik atau “*vaccum rotary evaporator*” pada suhu 65°C secara berulang selama 1 minggu sampai didapatkan ekstrak mengkudu murni yang kemudian dijadikan sebagai larutan stok, (Skema Cara Pembuatan Ekstrak Buah Mengkudu dapat dilihat pada Lamp. 4). Larutan ini kemudian diencerkan dengan aquades steril untuk memperoleh konsentrasi masing-masing perlakuan.

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 penanaman jaringan 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, lalu dicuci dengan merendamnya dalam aquades steril dan dilakukan sterilisasi permukaan dengan cara mencelupkan bagian tanaman yang terinfeksi ke dalam NaOCl 10% selama 1 menit dan dibilas dengan cara mencelupkan ke dalam akuades steril sebanyak 2 kali. Kemudian potongan kulit buah diletakkan pada cawan petri yang berisi medium PDA. 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*. Identifikasi mikroskopis jamur *Colletotrichum capsici* dilakukan dengan mengacu pada literatur dari *Illustrated Genera Of Imperfect Fungi* (Barnett dan Hunter, 1972).

3.4.4. Uji Patogenisitas

Pengujian dilakukan setelah hasil identifikasi terhadap jamur *Colletotrichum capsici* sesuai dengan pendapat Barnett dan Hunter (1972). Uji patogenisitas menggunakan beberapa variasi makroskopis dari jamur *Colletotrichum capsici* yang ditemukan dari hasil isolasi kulit buah cabai yang terinfeksi. Beberapa isolat tersebut diinokulasikan pada masing-masing 5 buah sample buah cabai dengan cara pencelupan buah cabai ke dalam suspensi inokulum jamur *Colletotrichum capsici*. Setelah 8 hari inokulasi varian jamur *Colletotrichum capsici*, dilakukan pengamatan persentase serangannya yang dapat menyebabkan intensitas serangan >50% kemudian digunakan sebagai sumber inokulum dalam penelitian selanjutnya.

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

Pengujian dilakukan dengan menumbuhkan inokulum (miselium) biakan murni jamur *Colletotrichum capsici* pada media PDA yang telah dicampur dengan larutan ekstrak buah mengkudu 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 ke dalam cawan petri. Kemudian 10 ml larutan ekstrak buah mengkudu (sesuai konsentrasi perlakuan) dicampurkan ke dalam cawan petri. Selanjutnya cawan petri digoyang secara memutar dengan tangan agar tercampur merata dengan larutan ekstrak buah mengkudu dan didiamkan hingga padat. Miselium *C. 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 ekstrak buah mengkudu tepat di bagian tengah cawan petri, kemudian diinkubasikan 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 aquades 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 aquades. 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 dengan mikroskop untuk memastikan karakteristik *Colletotrichum 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 secara bertahap sampai pada pengenceran 10^{-8} hingga diperoleh kepadatan spora pada suspensi yaitu $1,25 \times 10^6$ konidia/ml yang dihitung dengan menggunakan haemasitometer (Rahman, 2009).

Sebelum kegiatan inokulasi jamur *Colletotrichum capsici* dilakukan sterilisasi permukaan pada sampel buah cabai dengan membilas dalam aquades dan dicelupkan ke dalam NaOCl 10% selama 3 menit. Kemudian buah dibilas dengan merendamnya dalam aquades steril dengan cara direndam selama 3 menit sebanyak dua kali.

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 kering selama 5 menit dan diletakkan dalam wadah kotak plastik.

3.4.7. Aplikasi Ekstrak Buah Mengkudu Pada Buah Cabai (*in-vivo*)

Buah cabai yang telah dicelupkan dalam inokulum jamur *Colletotrichum capsici* dengan kepadatan $1,25 \times 10^6$ konidia/ml dibiarkan selama 5 menit dan dimasukkan ke dalam larutan ekstrak buah mengkudu sesuai dengan masing-masing konsentrasi perlakuan 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

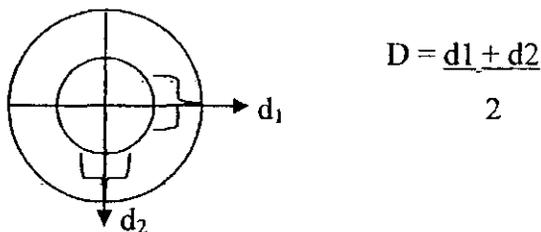
10 sampel buah cabai yang disusun secara terpisah. Untuk menjaga kelembaban dalam wadah dilakukan penyemprotan dengan aquades steril dengan *handsprayer* 250 ml dengan volume semprot yang relatif sama. Kotak-kotak plastik disusun di atas meja pada suhu ruangan.

3.5. Pengamatan

3.5.1. Pengamatan Secara *In-vitro*

3.5.1.1. Diameter Koloni jamur *Colletotrichum capsici* pada Medium PDA (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 berdasarkan rumus berikut :



Gambar 1. Cara pengukuran diameter koloni pada cawan petri.

Keterangan : D = diameter jamur *Colletotrichum capsici*
 d_1 = diameter vertikal koloni jamur *Colletotrichum capsici*
 d_2 = diameter horizontal koloni jamur *Colletotrichum capsici*

3.5.1.2. Persentase Penghambatan Ekstrak Buah Mengkudu Secara *In-vitro* Terhadap Jamur *Colletotrichum capsici* pada Medium PDA (%)

Persentase penghambatan pertumbuhan koloni jamur *Colletotrichum capsici* pada cawan sepetri 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* tanpa perlakuan ekstrak buah mengkudu
- b = diameter koloni jamur *Colletotrichum capsici* pada perlakuan

Persentase penghambatan dihitung dari diameter koloni setiap hari hingga koloni jamur memenuhi cawan petri.

3.5.2. Pengamatan Secara *In-vivo*

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

Pengamatan masa inkubasi dilakukan dengan mencatat lama waktu munculnya gejala awal setelah inokulasi patogen dan aplikasi ekstrak buah mengkudu. 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 buah mengkudu pada buah cabai, ditandai dengan timbulnya bercak coklat kehitaman pada permukaan kulit buah.

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

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

Rumus intensitas serangan yang digunakan adalah sebagai berikut:

$$I = \frac{\sum_i^n n_i \times v_i}{Z \times N} \times 100\%$$

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 *C. capsici* dapat dilihat pada Lamp. 3.

3.6. Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis secara statistik dengan analisis ragam dan diuji lanjut dengan Uji *Duncan's New Multiple Range Test* (DNMRT) pada taraf 5%.

Model matematis dari analisis statistik rancangan yang digunakan adalah :

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

Keterangan:

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

μ = Nilai tengah umum.

α_i = pengaruh perlakuan konsentrasi ekstrak buah mengkudu

ϵ_{ij} = galat percobaan pada perlakuan konsentrasi ekstrak buah mengkudu ke-I dan ulangan ke-j