

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian dasar dengan menggunakan metode eksperimen yaitu penelitian dengan mengadakan manipulasi terhadap objek penelitian serta adanya kontrol (Nazir, 2003).

B. Desain Penelitian

Penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan empat perlakuan dan enam kali pengulangan. Adapun pengulangan yang dilakukan, mengacu pada rumus (Gomez, 1995):

$t(r - 1) \geq 20$ $4(r - 1) \geq 20$ $r \geq 24$ $r \geq 6$	Dimana: t = perlakuan r = pengulangan
---	--

Dengan perlakuan yang diberikan yaitu:

A: Ekstrak sederhana *Piper betle*

B: Ekstrak minyak atsiri *Piper betle*

C: Ekstrak air sisa perkolasi minyak atsiri *Piper betle*

D: Kontrol

Konsentrasi masing-masing ekstrak *Piper betle* adalah 2%; 4%; 6%; 8%; dan 10% (v/v) (Yuharmen *et al.*, 2002).

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi : Buah cabai merah jenis TW yang ada di pasar Induk Caringin
2. Sampel : Seratus sembilan puluh dua buah cabai merah jenis TW yang digunakan dalam penelitian dengan panjang rata-rata 13 cm.

D. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan laboratorium PGSM Universitas Pendidikan Indonesia (UPI). Penelitian mulai dilaksanakan pada bulan September 2007 sampai dengan bulan Februari 2008.

E. Alat dan Bahan

1. Alat

No.	Nama Alat	Spesifikasi	Jumlah
1.	Alumunium foil	-	1 gulung
2.	Autoklaf	Merek EYELA model HL36AE	1 buah
3.	Batang pengaduk	-	2 buah
4.	Botol sampel	-	2 buah
5.	Botol semprot	-	1 buah
6.	Box plastik	Ukuran 25 x 20 x 5 cm	10 buah
7.	Cawan Petri	Diameter 9 cm	24 buah
8.	Corong	-	1 buah
9.	Gelas kimia	Pyrex	2 buah
10.	Gelas ukur	Pyrex	2 buah
11.	Hot plate with magnetic stirrer	-	1 unit
12.	Inkubator	-	1 unit
13.	Jarum ose	Ujung bulat dan	2 buah

		lurus	
14.	Kain penyaring	-	1 buah
15.	Kamera digital	-	1 unit
16.	Kertas label	-	1 bungkus
17.	Laminar air flow	-	1 unit
18.	Lumpang dan Alu	-	1 buah
19.	Mikropipet 200 μm	Merek eppendorf	1 buah
20.	Mikroskop	-	1 unit
21.	Objek gelas dan penutup gelas	-	5 pasang
22.	Pembakar spirtus	-	1 buah
23.	Penggaris	-	1 buah
24.	Pipet tetes	-	9 buah
25.	Plastik buram/bening	-	1 pak
25.	Rak tabung	-	1 buah
26.	Tabung reaksi	Pyrex	50 buah
27.	Timbangan analitik	-	1 unit
28.	Tissue	-	1 gulung

2. Bahan

No.	Nama Bahan	Spesifikasi	Jumlah
1.	Alkohol	70 %	500 ml
2.	Aquades	-	Secukupnya
3.	Cabai merah besar	Varietas TW	5 kg
4.	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	-	2 tabung agar miring
5.	<i>Piper betle</i>	Daun	3 kg

F. Prosedur Penelitian

Penelitian ini dibagi menjadi dua tahapan:

1. Tahap Persiapan, meliputi:
 - a. Penentuan waktu dan tempat penelitian
 - b. Persiapan alat dan bahan yang digunakan
 - c. Pembuatan medium pertumbuhan jamur *Colletotrichum gloeosporioides* (Lampiran 5)
 - d. Sterilisasi alat dan Bahan
2. Tahap Pelaksanaan Penelitian, meliputi:
 - a. Pemiakan jamur *Colletotrichum gloeosporioides*
 - b. Jamur yang digunakan untuk penelitian adalah jamur yang berumur 8 hari (fase logaritmik) (Noveriza dan Tombe, 2003; BALITSA, 2004)
 - c. Penghitungan jumlah spora jamur *Colletotrichum gloeosporioides*, jumlah spora $1,2 \times 10^6$ (Hidayat *et al.*, 2004).
 - d. Pencucian cabai yang akan digunakan hingga bersih
 - e. Pembuatan larutan ekstrak *Piper betle* dengan berbagai macam ekstrak, yaitu ekstrak sederhana, ekstrak minyak atsiri, dan ekstrak air sisa perkolasi minyak atsiri dengan konsentrasi untuk setiap ekstrak adalah 2%; 4%; 6%; 8%; dan 10% (v/v) (Yuharmen, 2002)
 - f. Analisis ekstrak dengan GCMS
 - g. Perlakuan dengan larutan ekstrak *Piper betle* dan inokulasi jamur *C. Gloeosporioides* terhadap buah cabai merah

- h. Pengukuran faktor klimatik (temperatur dan kelembaban), di ukur pada hari ke-4; 6; 8; dan 10 hari setelah inokulasi (HSI) pada pagi, siang dan sore hari dengan 3 kali pengulangan
- i. Pengukuran panjang dan lebar berdasarkan lesio cabai merah pada hari ke-4; 6; 8; dan 10 hari setelah inokulasi (HSI), untuk mengetahui konsentrasi efektif berbagai macam ekstrak *Piper betle* dalam menekan penyakit antraknosa pada buah cabai merah (*Capsicum annuum* L.).

G. Cara Kerja

1. Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang akan digunakan disiapkan terlebih dahulu lalu dibersihkan. Bahan-bahan yang akan digunakan ditimbang terlebih dahulu sesuai dengan kebutuhan. Setelah itu, alat dan bahan disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 1,5 atm (Syulamsi, *et al.*, 2005).

2. Pembuatan Medium Pertumbuhan Jamur

Medium yang digunakan untuk jamur *Colletotrichum gloeosporioides* adalah *Potato Dextrose Agar* (PDA). Pembuatan PDA adalah sebagai berikut: 200 gram kentang dikupas kemudian dicuci bersih dan dipotong kecil-kecil lalu dimasukan ke dalam *beaker glass* yang telah berisi aquades 1000 ml dan

didihkan selama 1 jam. Kemudian airnya disaring lalu ditambahkan dekstrosa sebanyak 20 gram dan didihkan kembali beberapa saat. Setelah itu ditambahkan 15 gram agar sambil diaduk-aduk hingga larut dengan sempurna dan medium berwarna bening lalu diangkat dan biarkan agak dingin. Lalu medium dituang ke labu Erlenmeyer/ tabung reaksi kemudian ditutup rapat dan disterilisasi dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 1,5 atm (Syulasmı, *et al.*, 2005).

3. Penghitungan Jumlah Spora *Colletotrichum gloeosporioides*

Metode yang dilakukan dengan menambahkan 10 ml NaCL 0,85% ke dalam biakan murni PDA miring, kemudian tabung reaksi di vorteks agar konidia lepas dan larut dalam NaCL. Kemudian suspensi tersebut dipindahkan ke dalam tabung reaksi lain yang steril dan di vorteks kembali supaya homogen. Suspensi tersebut diambil dengan mikropipet dan diteteskan satu tetes ke dalam *Haemocytometer Improved Neubauer* untuk menghitung jumlah konidia dengan bantuan mikroskop menggunakan perbesaran 40x. Setelah diketahui konsentrasinya, dilakukan penghitungan suspensi konidia sampai konsentrasi 10^6 (Hidayat *et al.*, 2004).

4. Pencucian Cabai yang akan digunakan

Cabai yang memiliki varietas dan umur yang sama, dicuci di bawah air mengalir, kemudian direndam dalam larutan bayclin 10% (bahan aktif natrium

hipoklorit 5,25%) selama 10 menit dan selanjutnya cuci dengan aquades hingga bersih dan dikeringkan.

5. Pembuatan Ekstrak *Piper betle*:

a. Ekstrak Sederhana *Piper betle*

Sebanyak 50 gram daun sirih segar dicuci kemudian keringkan (di angin-anginkan). Daun sirih yang sudah kering, dipotong-potong kemudian dihaluskan lalu direndam dalam aquadest sebanyak 1 liter selama 24 jam kemudian di tutup. Untuk mendapatkan ekstrak yang siap digunakan, maka ekstrak tersebut disaring dengan kertas saring (<http://database.deptan>).

b. Ekstrak Minyak Atsiri dan Air Sisa Perkolasi Minyak Atsiri *Piper betle*

Daun sirih segar, dicuci hingga bersih. Kemudian diangin-anginkan selama dua minggu untuk mendapatkan daun sirih kering. Setelah sirih tersebut kering, lalu dihaluskan dan timbang sebanyak 312,6 gram. Sirih tersebut dimasukkan ke dalam labu perkolasi rendam dengan 1 liter aquades. Kemudian nyalakan alat perkolasi dan amati selama 6 jam. Setelah 6 jam suhu mencapai 97°C, dan didapatkan minyak sirih sebanyak 1,6 ml yang sudah terpisah dari air sisa perkolasi. Alat perkolasi dimatikan dan tunggu hingga temperatur dari alat perkolasi menurun. Minyak atsiri dan air sisa perkolasi yang didapatkan dipisahkan dalam tabung yang berbeda. Air sisa perkolasi berwarna bening dengan bau sirih yang khas, sedangkan minyak sirih yang diperoleh dibebaskan dari sisa-sisa air

dengan menggunakan Na_2SO_4 anhidrat, minyak sirih ini memiliki bau khas sirih yang lebih menyengat dan berwarna kuning dibandingkan dengan air sisa perkolasi.

6. Penentuan konsentrasi Ekstrak *Piper betle* yang paling Efektif

Dilakukan inokulasi terhadap buah cabai merah yang telah dicuci bersih, dengan menggunakan jarum inokulasi yang steril kemudian ditetaskan ekstrak *Piper betle* dengan konsentrasi 2%; 4%; 6%; 8%; dan 10% (v/v) dari masing-masing ekstrak *Piper betle* yang digunakan selanjutnya diamati panjang serta lebar lesio pada hari ke-4; 6; 8; dan 10 hari setelah inokulasi (HSI), untuk menentukan konsentrasi yang paling efektif dari berbagai macam ekstrak *Piper betle* dalam menekan penyakit antraknosa pada buah cabai merah.

Cabai merah yang sudah disiapkan, kemudian diberi pelukaan pada bagian tengah tubuh cabai tersebut (dengan cara menusuk), menggunakan jarum inokulasi yang sudah steril. Setelah itu ditetaskan sebanyak satu tetes ekstrak *Piper betle* dan satu tetes inokulum jamur antraknosa (konsentrasi spora sebanyak $1,2 \times 10^6$ / ml) pada pelukaan yang sama. Cabai yang telah diberi perlakuan tersebut, disusun di atas stirofoam dalam box plastik berukuran 25 x 20 x 5 cm yang di alasi kertas tissue basah steril. Kotak kemudian ditutup dengan plastik. (Asian Vegetable Research and Development Center, 1986).

7. Analisis Hasil GCMS (Gas Chromatography-Mass Spektrometer)

Secara Konvensional analisa ekstrak dapat diisolasi dengan menggunakan teknik sederhana, tetapi ternyata tidak memberikan hasil yang memuaskan. Namun semakin pesatnya teknologi instrumentasi, analisa dapat dilakukan dengan alat GCMS, yaitu suatu alat yang dihubungkan dengan suatu interfase. Kromatografi gas ini berfungsi sebagai alat pemisah berbagai komponen campuran dalam sampel, sedangkan spektrometer massa berfungsi untuk mendeteksi masing-masing molekul komponen yang telah dipisahkan dalam sistem kromatografi gas.

a. Ekstrak Sederhana

Senyawa yang dikandung oleh tanaman ini antara lain profenil fenol, gula, amilum/ pati, enzim katalase, vitamin A, B, dan C, serta kavaryl (<http://database.Deptan.2007>).

b. Minyak Atsiri

Hasil analisis dengan GCMS menunjukkan bahwa minyak atsiri memiliki spektra GC dengan 33 puncak, yang berarti dalam minyak atsiri terdapat 33 komponen senyawa. Masing-masing puncak memiliki spektra massa dan waktu retensi yang berbeda-beda. Senyawa-senyawa yang kemungkinan terkandung dalam minyak atsiri adalah 3-Cyclohexen-1-ol (4-terpinoel) dengan nilai SI (Similarity Index) sebesar 95%, kavikol dengan nilai SI sebesar 93%, eugenol

dengan nilai SI sebesar 86%, dan fenol dengan nilai SI sebesar 95% (Lampiran 9).

c. Air Sisa Perkolasi

Analisis GCMS pada air sisa perkolasi terlihat bahwa, senyawa yang diduga terkandung dalam ekstrak ini adalah senyawa asam benzoat dengan nilai SI sebesar 79% (lampiran 9).

8. Pengukuran Faktor Klimatik

Faktor klimatik yang diukur adalah suhu dan kelembaban pada hari ke-4; 6; 8; dan 10 HSI, pada pagi, siang dan sore hari dengan 3 kali pengulangan.

9. Pengamatan Daya Hambat Ekstrak *Piper betle* pada Buah Cabai Merah

Pengamatan dilakukan dengan mengukur panjang dan lebar lesio pada hari ke-4; 6; 8; dan 10 hari setelah inokulasi (HSI) untuk masing-masing ekstrak *Piper betle* pada konsentrasi 2%; 4%; 6%; 8%; dan 10% (v/v) dan kontrol (aquadest). Sehingga didapatkan konsentrasi efektif dari masing-masing ekstrak *Piper betle* yang dapat menghambat penyakit antraknosa pada buah cabai merah.

H. Alur Penelitian

Alur penelitian dapat dilihat pada gambar dibawah ini:

1. Tahap Persiapan

Penentuan waktu dan tempat penelitian



Penyiapan alat dan bahan



Pembuatan medium pertumbuhan jamur
Colletotrichum gloeosporioides



Sterilisasi alat dan bahan

2. Tahap Penelitian

Pembiakan jamur *Colletotrichum gloeosporioides*



Penghitungan jumlah spora *Colletotrichum gloeosporioides*



Pencucian cabai yang akan digunakan



Pembuatan larutan ekstrak *Piper betle* dengan konsentrasi 2%; 4%; 6%; 8%; dan 10% (v/v).



Perlakuan:

Penetasan larutan ekstrak *Piper betle* terhadap buah cabai merah yang telah dilukai, dimana

ekstraknya adalah

- Ekstrak sederhana
- Ekstrak minyak atsiri
- Ekstrak air sisa perkolasi minyak atsiri
- Aquadest/ kontrol



Tunggu kering, lalu inokulasikan antraknosa pada tempat yang sama



Inkubasi cabai dalam box plastik, diatas styrofoam yang dialasi kertas tisu basah, simpan dalam suhu kamar



Pengamatan dan pengukuran lesio panjang dan lebar dari buah cabai merah pada hari ke-4; 6; 8; dan 10 HSI dengan konsentrasi 2%; 4%; 6%; 8%; dan 10% (v/v) dari masing-masing ekstrak



Analisis data:

Diameter lesio: (panjang + lebar /2) (Hidayat *et. al.*, 2004)

Uji Homogenitas

Analisis varians (ANAVA), jika berbeda nyata dilanjutkan dengan uji Duncan Multiple Range

Test (DMRT), dengan menggunakan SPSS

11.5.

Kesimpulan:

Penentuan ekstrak dan konsentrasi efektif dari berbagai macam ekstrak *Piper betle* dalam menekan penyakit antraknosa dibandingkan dengan kontrol (aquadest).