

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah eksperimen laboratorium dengan memakai RAL (Rancangan Acak Lengkap) dengan 4 perlakuan dan 3 kali ulangan, sehingga menghasilkan 12 unit percobaan.

B. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada tanggal 8 Juli sampai tanggal 2 Agustus di laboratorium MIPA IAIN Ambon dan pengambilan sampel cabai besar diambil di Desa Waiheru.

C. Variabel Penelitian

- 1) variabel bebas X : konsentrasi larutan daun mimba 10%, daun gamal 10%, dan daun sirih hutan 10%.
- 2) variabel terikat Y : zona hambat jamur *Colletotrichum capsici*.

D. Rancangan Penelitian

Dalam rancangan penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL)

Tabel 3.1
Rancangan yang digunakan dalam penelitian

Perlakuan	Ulangan			Total	Rata-rata
	1	2	3		
P0	P1,1	P1,3	P3,1		
P1	P0,2	P2,3	P3,3		
P2	P3,2	P1,2	P2,1		
P3	P0,3	P0,1	P2,2		
Total	...	...	...		

Keterangan:

P0: Kontrol (tanpa perlakuan)

P1: 10% ekstrak daun mimba

P2: 10% ekstrak daun gamal
P3: 10% ekstrak daun sirih hutan

E. Alat dan Bahan Penelitian

Tabel 3.2
Alat yang digunakan dalam penelitian

No	Alat	Fungsi
1.	Blender	Untuk menghaluskan sampel
2.	Hotplate magnetic stirrer	Untuk memanaskan atau menghangatkan sekaligus mencampurkan larutan kimia
3.	Incubator	Untuk menginkubasi biakan
4.	Tabung reaksi	Untuk menampung reaksi kimia
5.	Cawan petri	Untuk membiakkan (kultivasi) mikroorganisme
6.	Pipet tetes	Untuk memindahkan larutan.
7.	Beaker glass	Untuk mengaduk, mencampurkan, dan memanaskan cairan
8.	Mikroskop	Untuk memperbesar obyek.
9.	Bor gabus	Untuk memindahkan sekaligus memotong mikroba
10.	Timbangan	Untuk mengukur massa benda
11.	Spatula	Untuk mengambil bahan kimia padat saat ditimbang
12.	Autoklaf	Untuk mensterilkan wadah sampel
13.	Erlenmeyer	Untuk mengukur volume bahan kimia cair dengan ketelitian rendah
14.	Mikrofilter	Untuk menyaring partikel kecil sesuai ukuran micron
15.	Gunting	Untuk memotong buah cabai
16.	Laminar air flow	Untuk menjaga kualitas udara dalam ruangan dan untuk mencegah kontaminasi dari lingkungan luar
17.	Pinset	Untuk memindahkan atau memanipulasi sampel mikroskopis, mengambil sebuah preparat, dan mencegah kontaminasi pada objek yang diteliti
18.	Bunsen	Untuk proses pembakaran dan pemanasan bahan atau sampel
19.	Alumunium foil	Untuk mengemas dan menyimpan sampel/bahan untuk waktu yang lama karena sifatnya yang tidak tembus air
20.	Saringan kain	Untuk membersihkan kotoran/organisme kecil
21.	Jarum inokulum	Untuk mentransfer jamur cabai terinfeksi ke media kultur.
22.	Tabung reaksi	Untuk mencampur, menampung dan memanaskan bahan kimia
23.	Stapless	Untuk menyatukan dua atau beberapa bahan
24.	Kaca preparat	Untuk tempat objek yang akan diamati di mikroskop

Tabel 3.3
Bahan yang digunakan dalam penelitian

No	Bahan	Fungsi
1.	Daun sirih hutan	Bahan untuk pembuatan pestisida nabati
2.	Daun mimba	Bahan untuk pembuatan pestisida nabati
3.	Daun gamal	Bahan untuk pembuatan pestisida nabati
4.	Cabai yang terinfeksi jamur	Sebagai sampel penelitian
5.	Cabai yang sehat	Sebagai sampel pembanding
6.	Air	Sebagai pelarut
7.	Kapas	Untuk menutupi tabung reaksi dan Erlenmeyer
8.	Tissue	Untuk mengeringkan alat penelitian
9.	Aquades	Untuk membersihkan alat-alat media
10.	Alkohol	Untuk mensterilkan alat dan bahan

F. Prosedur Penelitian

1. Pembuatan Media PDA

Ditimbang 39 gr PDA (*Potato Dextrose Agar*) kemudian dimasukkan ke dalam Erlenmeyer yang diberi akuades 1000 ml, untuk media PDA streptomycin, ditimbang 9,75 gr PDA dan 0,4 gr streptomycin kemudian dimasukkan kedalam Erlenmeyer dan diberi 250 ml akuades. Kedua campuran kemudian dididihkan di atas hotplate magnetic stirrer dengan bantuan pengaduk batang magnet (stir bar) hingga merata.

2. Sterilisasi Alat dan Bahan Penelitian

Alat dan bahan disterilkan sebelum digunakan dengan cara dibungkus dengan kertas dan plastik, kemudian dimasukkan ke dalam autoklaf pada suhu 121 °C dengan tekanan 15 psi selama 15 menit. Setelah alat dan bahan telah steril, kemudian diletakkan kedalam laminar air flow untuk pengerjaan selanjutnya.

3. Isolasi Jamur *Collectotrichum capsici*

Media PDA streptomycin yang telah steril kemudian dituangkan kedalam cawan petri sebanyak 5 cawan dan dibiarkan hingga mengeras. Jamur *C. capsici* diisolasi dari tanaman buah cabai besar yang bergejala *C. capsici* dengan cara sampel buah cabai besar dicuci dengan menggunakan air mengalir (akuades) kemudian dikering anginkan dan setelah itu dilap dengan kapas yang sudah diberi alkohol, sampel buah cabai besar yang terkena penyakit dipotong dengan ukuran 1 cm² menggunakan gunting dan pinset. Potongan buah cabai besar yang bergejala dikultur ke dalam cawan petri yang telah berisi media PDA. Selanjutnya biakkan dalam cawan petri dan diinkubasi dalam suhu kamar. Hifa *Collectotrichum capsici* yang tumbuh pada media PDA diidentifikasi secara makrokopis.

4. Reisolasi Jamur *Collectotrichum capsici* (pemurnian jamur)

Jamur *C. capsici* dimurnikan kembali dengan cara dikultur, yaitu Media PDA yang telah steril kemudian dituangkan kedalam cawan petri sebanyak 5 cawan dan dibiarkan hingga mengeras, kemudian ambil jamur yang teridentifikasi jamur *C. capsici* menggunakan jarum inokulum kemudian diletakkan kedalam cawan petri

yang telah berisi media PDA. Selanjutnya dibiakkan dengan diinkubasi dalam suhu kamar.

5. Pengujian *Postulat Koch* pada Buah Cabai Besar yang Sehat

Sampel buah cabai besar yang sehat dicuci dengan air mengalir dan dikering anginkan, setelah itu sampel tersebut dilap menggunakan tisu yang sudah diberi alkohol. Sampel yang telah steril, dilukai menggunakan pinset dan diberi jamur *C. capsici* kemudian sampel tersebut dimasukkan ke dalam plastik dan ditutup rapat menggunakan staples. Selanjutnya dibiakkan kembali dengan diinkubasi dalam suhu kamar selama 7 hari.

6. Pembuatan Slide Kultur

Penyiapan 10 cawan petri yang diberi lipatan tisu steril dan diatasnya diletakkan kaca preparat dengan cover glass dan 1 cawan petri untuk paper disk kemudian semua dibungkus menggunakan kertas, setelah itu disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C. setelah steril, masukkan paper disk kedalam cawan yang sudah diberi media PDA. Masukkan 1 paper disk diatas kaca preparat di setiap cawan kemudian letakkan jamur *C. capsici* diatas paper disk dan ditutup dengan cover glass. Selanjutnya dibiakkan dengan diinkubasi selama 7 hari. Setelah 7 hari masa pembiakkan, slide kultur kemudian diamati menggunakan mikroskop dan diidentifikasi.

7. Pembuatan Pestisida Nabati dan Pengujian In Vitro.

Media PDA yang telah dibuat dipanaskan kembali menggunakan hotplate, setelah mendidih media PDA didiamkan hingga hangat dan kemudian dimasukkan

kedalam 32 tabung reaksi. Setiap tabung reaksi diberi 9 ml media PDA dan ditutup menggunakan kapas dan aluminium foil, kemudian disterilkan menggunakan autoklaf bersama dengan tip mikropipet selama 15 menit dengan suhu 121 °C. Bahan daun mimba, daun gamal dan daun sirih hutan dicuci dengan air mengalir, dikeringkan, dan ditimbang. Ekstrak bahan pestisida diperoleh melalui proses mencampurkan bahan dengan akuades dan diblender dengan perbandingan 1:1. Hasil ekstrak bahan pestisida disimpan kedalam cawan petri dan diberi label.

Media PDA yang sudah diisi pada tabung reaksi kemudian dituangkan kedalam cawan petri dan diberi pestisida nabati 1 ml menggunakan mikropipet dan dihomogenkan kemudian diberi label dan untuk perlakuan kontrol, tuangkan media PDA kedalam cawan petri dan diberi akuades 1 ml. Setelah semua media mengeras, ambil jamur *C. capsici* menggunakan jarum ose dan tempatkan cork borer diatas media PDA yang sudah diberi perlakuan untuk mendapatkan jamur yang berdiameter sama. Selanjutnya diinkubasi selama 3 hari dan diukur diameter jamur *C. capsici* pada media yang telah dicampurkan dengan ekstrak pestisida nabati. Setelah masa inkubasi, jamur yang tumbuh diukur dengan cara diukur dari 4 sudut lingkaran kemudian dijumlah dan dibagi 4 untuk memperoleh nilai rata-rata.

G. Teknik Analisis Data

Hasil pengukuran daya hambat pestisida nabati terhadap jamur *C. capsici* yang diperoleh, dianalisis menggunakan uji ANOVA (*One Way Anova*), dan apabila hasil menunjukkan perlakuan berbeda nyata maka dilakukan uji perbandingan lanjut, analisis dilakukan pada selang kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$) menggunakan program IBM SPSS Statistics 23.