

## BAB IV METODELOGI PENELITIAN

### 4.1 Waktu dan tempat pelaksanaan

Penelitian dilakukan di Laboratorium Penelitian Kimia dan Laboratorium Teknologi Farmasi Universitas Islam Indonesia. Waktu penelitian dimulai dari bulan Desember 2018 sampai dengan Juli 2019. Analisis uji antijamur dilakukan di Laboratorium Mikologi Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada.

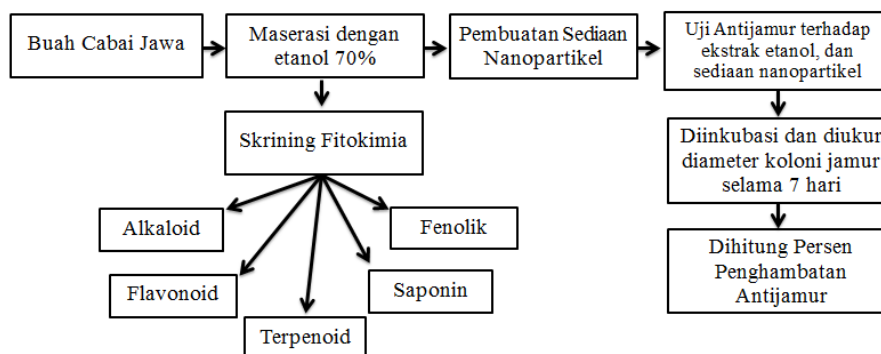
### 4.2 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah seperangkat alat gelas (*pyrex*), pinset, bunsen, kompor listrik, vial, neraca analitik (Fujitsu), *autoclave*, incubator, lemari es, blender (*phillips*), sendok sungu, spatula, pengaduk kaca, autoklaf, skalpel/pisau kecil, ose, botol semprot, plastik wrap, aluminium foil, rak tabung reaksi, *rotary evaporator* (Heidolph Laborata 4000 efficient), sonikator (Ultrasonic Homogenizer Model 150 VT Biologics, USA), *Particle Size Analyzer* (Horiba Scientific, Nano Particle Analyzer SZ-100), *Laminar Air Flow (LAF)*, Vortex (IKA Genius 3).

### 4.3 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat jamur (*Colletotrichum sp*), akuades, etanol 96%, etanol teknis 70%, kertas saring, Tween 80, *polyethylene glycol (PEG)*, capryol, reagen *dragendrof*,  $FeCl_3$ , serbuk Mg, HCl pekat, *dextrose*, agar, kentang dan buah cabai jawa.

### 4.4 Tahap Penelitian



**Gambar 6.** Kerangka konsep penelitian

## **4.5 Cara Kerja Penelitian**

### **4.5.1 Pembuatan ekstrak buah cabai jawa**

Bahan yang digunakan pada proses maserasi ini adalah buah cabai jawa dan etanol teknis 70%. Buah cabai jawa yang digunakan sudah dalam keadaan kering dan ditumbuk atau diblender sampai halus. Kemudian ditimbang sebanyak 350 gram. Simplisia dimasukkan ke dalam gelas beker 1000 mL, kemudian dimasukkan etanol teknis 70% hingga simplisia terendam semua. Ditungkup gelas beker menggunakan plastik wrap dan dipastikan tertutup rapat sehingga tidak ada celah etanol untuk menguap. Selanjutnya didiamkan hingga terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan diluar sel dan didalam sel yang ditandai dengan terjadinya perubahan warna menjadi pekat pada cairan penyari. Kemudian disaring simplisia yang telah dimaserasi dengan menggunakan penyaring vakum.

Selanjutnya larutan hasil maserasi dimasukkan ke dalam labu evaporator, kemudian dilakukan pemanasan dengan suhu 70 °C. Proses evaporasi dihentikan apabila etanol telah habis menguap, sehingga diperoleh ekstrak kasar dalam bentuk kental.

### **4.5.2 Skrinning Fitokimia**

Skrining fitokimia dilakukan untuk mengetahui kandungan metabolit sekunder dari ekstrak buah cabai jawa secara kualitatif. Kandungan metabolit sekunder diujikan diujikan kepada ekstrak untuk menguji keberadaan senyawa alkaloid, flavonoid dan saponin, fenolik dan terpenoid.

#### **a. Uji alkaloid**

Pengujian identifikasi alkaloid digunakan pereaksi dragendrof. Sebanyak 0,5 gram ekstrak diambil dalam tabung reaksi dilarutkan dengan etanol 96%, selanjutnya kedalam tabung reaksi di tambahkan 3 tetes pereaksi dragendroff kemudian dipanaskan hingga membentuk endapan. Hasil uji positif dengan pereaksi dragendrof bila terdapat endapan berwarna jingga (Grag dkk., 2013).

#### **b. Uji flavonoid**

Sebanyak 0.5 gram ekstrak dilarutkan dalam 1 mL etanol 96% dan ditambahkan 0,1 gram serbuk Mg dan 5 tetes asam klorida pekat. Jika terbentuk warna merah jingga sampai merah ungu, menunjukkan adanya flavonoid.

c. Uji saponin

Sebanyak 0.5 gram ekstrak ditambahkan 10 mL air kedalam tabung reaksi dan dikocok kuat-kuat selama 10 menit. Ekstrak dikatakan mengandung saponin jika terbentuk buih yang cukup banyak dengan terbentuknya buih setinggi 1 sampai 10 cm (Tiwari dkk., 2011).

d. Uji fenolik

Sebanyak 0,5 gram ekstrak dilarutkan dalam 1 mL etanol 96% ditambah 2 tetes  $\text{FeCl}_3$ . Terbentuknya warna hijau, merah, ungu, biru atau hitam pekat menunjukkan hasil positif fenolik (Kadji dkk, 2013).

e. Uji Terpenoid

Sebanyak 0,5 gram ekstrak dilarutkan dalam 1 mL etanol 96% dan ditambahkan 0,5 mL asam asetat anhidrat. Selanjutnya ditambahkan asam sulfat pekat setetes demi setetes sebanyak 0,2 mL. Terjadinya perubahan warna menjadi warna ungu menandakan bahwa positif mengandung terpenoid.

#### **4.5.3 Pembuatan nanopartikel ekstrak buah cabai jawa dengan metode SNEDDS 2%; 4%; 8%; 12% (b/v)**

Ekstrak buah cabai jawa sebanyak 0,05 gram; 0,1 gram; 0,3 gram dan 0,5 gram. Masing-masing dimasukkan kedalam vial, kemudian ditambahkan Tween 80 sebanyak 1,25 mL dan disonikasi selama 2x2 menit. Setelah itu ditambahkan capryol sebanyak 0,75 mL, dan disonikasi selama 2x2 menit. Selanjutnya ditambahkan PEG sebanyak 0,5 mL lalu disonikasi kembali selama 2x2 menit.

#### **4.5.4 Analisis Ekstrak nanopartikel dengan *Particles Sized Analyzer* (PSA)**

Ekstrak nanopartikel dipipet sebanyak 1 mL, kemudian diencerkan 100x menggunakan akuades pada labu ukur 100 mL. Setelah itu dihomogenkan dengan cara digojog. Selanjutnya dianalisis menggunakan *Particles Sized Analyzer* (PSA).

#### **4.5.5 Persiapan Uji Fungisida**

Persiapan uji fungisida dilakukan dengan cara sebagai berikut :

a. Sterilisasi Alat

Alat-alat gelas (tabung reaksi, erlenmeyer, cawan petri) dicuci bersih. Alat-alat tersebut didiamkan sampai kering. Kemudian dibungkus dengan kertas dan

disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 30 menit (pemanasan basah). Setelah itu didiamkan sampai benar-benar kering. Ose dan skalpel/pisau kecil disterilkan dengan cara dicelupkan kedalam alkohol 96% dan dibakar diatas bunsen. Alat yang telah disterilkan dapat langsung dipakai atau disimpan untuk digunakan lain waktu tetapi harus dalam keadaan tertutup rapat.

b. Pembuatan Media PDA (*Potato Dextrose Agar*)

Pembuatan media PDA menggunakan 200 gram kentang yang telah dipotong-potong kecil dan dimasukkan kedalam erlenmeyer 1000 mL, ditambahkan akuades sebanyak 1000 mL. Erlenmeyer ditutup menggunakan plastik dan dimasukkan pengaduk kaca. Dipanaskan dipanci yang berisikan air sampai  $\pm$  15 menit. Sese kali diaduk. Disaring kentang dan filtratnya. Filtrat kentang ditambahkan 20 gram dextrose agar dan 20 gram agar. Ditambahkan dengan akuades sampai volumenya 1000 mL. Dipanaskan dipanci yang berisikan air sampai  $\pm$  15 menit. Sese kali diaduk. Diperoleh PDA (*Potato Dextrose Agar*). PDA disimpan dalam masing-masing erlenmeyer 250 mL dan ditutup rapat menggunakan aluminium foil dan kertas. Selanjutnya PDA disterilkan pada *autoclave* selama 20 menit.

c. Peremajaan Jamur

Jamur *Colletotrichum sp* diperoleh dari Laboratorium Mikologi Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada. Jamur diinokulasi sebanyak 1 ose ke dalam cawan petri yang terdapat PDA, dengan cara meletakkan jamur di tengah. Selanjutnya diinkubasi selama masa pertumbuhan jamur yang dibutuhkan.

d. Pembuatan Seri Konsentrasi

Larutan induk ekstrak kasar dan nanopartikel ekstrak buah cabe jawa dibuat seri konsentrasi 0,1%; 0,2%; 0,3% (b/v). Pembuatan seri dilakukan dengan cara membuat larutan induk ekstrak buah cabai jawa. Ditimbang sebanyak 0,3 gram ekstrak buah cabai jawa. ditambahkan 1,25 ml Tween 80 dan diencerkan dengan akuades pada labu ukur 50 ml sampai tanda batas. Digojog labu ukur sampai homogen. Pada pembuatan larutan induk nanopartikel ekstrak buah cabai jawa dibuat dengan diencerkan nanopartikel ekstrak buah cabai jawa dengan akuades kedalam labu ukur 50 ml sampai tanda batas. Digojog labu sampai homogen.

#### 4.5.6 Uji Aktivitas Fungisida

Ekstrak etanol dan sediaan nanopartikel ekstrak yang dihasilkan, dilakukan uji aktivitas fungisida pada jenis jamur *Colletotrichum sp.* Dimasukkan media PDA yang masih dalam keadaan hangat atau dengan suhu 50°C kedalam cawan petri dengan perbandingan sesuai konsentrasi yaitu untuk konsentrasi 0,1% sebanyak 8,3 mL PDA dan 1,7 mL ekstrak etanol, konsentrasi 0,2% sebanyak 6,7 mL PDA dan 3,3 mL ekstrak etanol dan konsentrasi 0,3% sebanyak 5 mL PDA dan 5 mL ekstrak etanol. Perlakuan untuk nanopartikel ekstrak buah cabai jawa sama dengan ekstrak etanol sesuai konsentrasi dan perbandingannya. Setiap perlakuan dilakukan dengan teliti dan steril agar mengurangi terjadinya kontaminasi di dalam laminar dan ruang inkubator. Selanjutnya didiamkan media hingga padat lalu dimasukkan cakram jamur kedalam media dengan posisi ditengah. Setelah itu diinkubasi selama 7 hari untuk melihat uji hambat fungisida terhadap jamur *Colletotrichum sp.* Lamanya inkubasi ini dinyatakan sebagai waktu efektif untuk uji aktivitas fungisida untuk sampel buah cabai jawa selama 7 hari. Hal ini dilakukan karena berdasarkan pada penelitian Sudirga (2016) yang melakukan isolasi dan identifikasi terhadap jamur *Colletotrichum sp* yang diinkubasi selama 7 hari. Lamanya inkubasi jamur tersebut berdasarkan pada pertumbuhan jamur *Colletotrichum sp* yang memiliki aktivitas pertumbuhan yang lambat yaitu 3-6  $\mu\text{m}$  per hari.

#### 4.5.7 Kontrol

a. Kontrol positif

Kontrol positif dibuat dengan ditimbang 0,3 gram fungisida sintetis dengan merek antracol. Diencerkan dengan akuades kedalam labu ukur 50 mL sampai tanda batas. Digojog sampai homogen.

b. Kontrol negatif

Kontrol negatif yang digunakan ada dua macam, yang pertama kontrol negatif pengemulsi dibuat dengan campuran 1,25 mL tween 80, ditambahkan 0,75 mL capryol dan 0,5 mL PEG. Diencerkan dengan akuades kedalam labu ukur 100 mL sampai tanda batas. Digojog sampai homogen. Kemudian dipipet dari larutan induk sebanyak 24 ml dan diencerkan lagi kedalam labu ukur 100 mL sampai

tanda batas. Digojog sampai homogen. Kemudian yang kedua kontrol negatif Tween 80 dibuat dengan 0,5 mL Tween 80 yang diencerkan dengan akuades sebanyak 50 mL.

#### **4.6 Analisis Data**

Analisis statistik digunakan pada pengolahan data diameter pertumbuhan koloni jamur *Colletotricum sp* dan persentase aktivitas penghambatan pertumbuhan jamur yang dianalisis menggunakan *Analysis of Variance* (ANOVA). Dalam analisis ANOVA,  $H_0$  menunjukkan tidak ada perbedaan yang nyata dan  $H_a$  menunjukkan adanya perbedaan yang nyata. Analisis yang terakhir dilakukan uji Duncan dengan taraf kepercayaan 95% untuk melihat kehomogen dari suatu data yang diperoleh. Analisis statistik ini diolah menggunakan aplikasi SPSS 22.0.