

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium penelitian kimia dan Laboratorium Teknologi Farmasi Universitas Islam Indonesia. Uji antijamur dilakukan di Laboratorium Mikologi Fakultas Pertanian UGM.

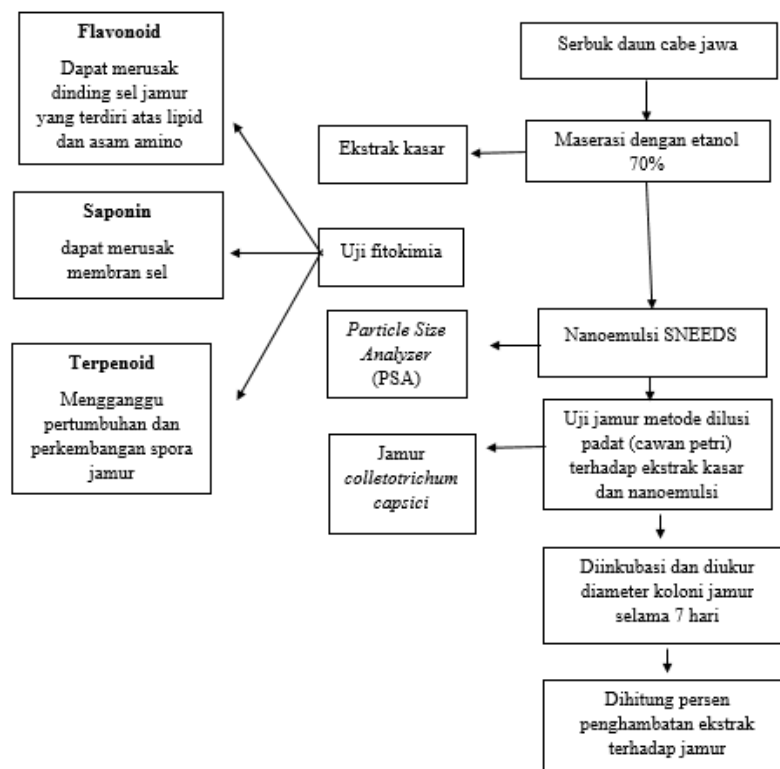
4.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu: *blender*, gelas beker, batang pengaduk, neraca analitik, sendok sungsung, corong gelas, botol sampel, *rotary evaporator*, *vacum*, spatula, pipet ukur, pipet tetes, propipet, gelas ukur, tabung reaksi, rak tabung reaksi, kaca arloji, sonikator, labu ukur, cawan petri, kompor, penangas, autoklaf, *Laminar Air Flow* (LAF) bunsen, labu *erlenmeyer*, micropipet, aluminium foil, *plastic wrap*, kertas saring, kapas, instrumen *Particle Size Analyzer* (PSA) dan lemari es.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu: isolat jamur *Colletotrichum* sp, sampel daun cabe jawa, etanol teknis 70%, etanol teknis 96%, tween 80, Poli Etilen Glikol (PEG), capryol, kentang, *dextrose*, agar, reagen dragendorff, FeCl₃, serbuk Mg, HCl pekat, H₂SO₄ pekat, Amonia Anhidrat, antracol dan akuades.

4.3 Rancangan penelitian

Penelitian ini bersifat deskriptif, kualitatif dan kuantitatif. Pada penelitian ini terdiri dari 3 tahap. Tahap pertama tujuannya untuk mengetahui pengaruh dari ekstrak dan nanoemulsi dari daun cabe jawa terhadap aktivitas pertumbuhan jamur *Colletotrichum* sp. Tahap kedua tujuannya yaitu untuk mengetahui pengaruh variasi konsentrasi dari ekstrak dan nanoemulsi terhadap aktivitas pertumbuhan jamur *Colletotrichum* sp. Pada tahap ini menggunakan 3 variasi konsentrasi pada ekstrak nanoemulsi serta 2 variasi konsentrasi kontrol. Setiap variasi konsentrasi dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali. Pada tahap ketiga tujuannya untuk mengetahui golongan metabolit sekunder yang terkandung didalam ekstrak daun cabe jawa.



Gambar 6. Kerangka konsep penelitian

4.4 Prosedur Kerja

4.4.1 Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Cabe Jawa

Proses maserasi ini menggunakan pelarut etanol teknis 70%. Daun cabe jawa yang telah dikeringkan dan dihaluskan ditimbang sebanyak 200 gram kemudian dimaserasi dengan menggunakan etanol teknis 70% sampai seluruh bagian terendam oleh pelarut kemudian ditutup dengan menggunakan *plastic wrap* dimaserasi selama 24 jam dan dilakukan remaserasi sebanyak 3 kali. Setelah dilakukan maserasi selama 24 jam kemudian disaring dengan menggunakan kertas saring untuk memisahkan antara filtrat dan residu serbuk daun cabe jawa. Filtrat hasil maserasi dipekatkan menggunakan alat *rotary evaporator* untuk menghilangkan pelarut etanol sehingga diperoleh ekstrak kental daun cabe jawa.

4.4.2 Uji fitokimia

Uji fitokimia digunakan untuk mengetahui metabolit sekunder yang terdapat didalam ekstrak daun cabe jawa. Uji fitokimia ini meliputi uji alkaloid, flavonoid, saponin, fenolik dan terpenoid.

1. Uji Alkaloid

Pengujian identifikasi alkaloid digunakan pereaksi Dragendrof. Sebanyak 0,5 gram ekstrak diambil dalam tabung reaksi dilarutkan dengan etanol 70%, 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).

2. Uji flavonoid

Sebanyak 0,5 gram ekstrak dilarutkan dalam 1 mL etanol 70% dan ditambahkan 0,1 gram serbuk Mg da 5 tetes asam klorida pekat. Jika terbentuk warna merah jingga sampai merah ungu, menunjukkan adanya flavonoid.

3. Uji saponin

Sebanyak 0,5 gram ekstrak ditambahkan 10 mL akuades 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).

4. Uji Fenolik

Sebanyak 0,5 gram ekstrak dilarutkan dalam 1 mL etanol 70% ditambah 2 tetes FeCl_3 . Terbentuknya warna biru-hitam, hijau atau biru hijau dan endapan menunjukkan positif fenolik.

5. Uji Terpenoid

Sebanyak 0,5 gram ekstrak dilarutkan dalam 1 mL etanol 70% 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 merah atau ungu menandakan bahwa positif mengandung terpenoid.

4.4.3 Pembuatan Nanoemulsi Ekstrak Daun Cabe Jawa

Ekstrak daun cabe jawa sebanyak 0,05 gram; 0,1 gram; 0,3 gram dan 0,5 gram, masing-masing dimasukkan ke dalam vial, kemudian ditambahkan tween 80 sebanyak 1,25 mL lalu disonikasi selama 2x2 menit. Setelah itu ditambahkan PEG 0,5 mL dan disonikasi kembali selama 2x2 menit. Selanjutnya ditambahkan capryol sebanyak 0,75 mL lalu disonikasi selama 2x2 menit.

4.4.4 Persiapan Uji Fungisida

4.4.4.1 Sterilisasi Alat

Alat-alat gelas (tabung reaksi, cawan petri, labu erlenmeyer) dicuci bersih. Alat-alat tersebut harus dalam keadaan kering dan tidak terdapat titik air agar tidak timbul noda yang sulit hilang setelah disterilkan. Kemudian dikeringkan, dibungkus kertas dan disterilkan dengan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 30 menit (pemanasan basah). Ose disterilkan dengan cara dibakar. Alat yang telah disterilkan dapat langsung dipakai atau disimpan untuk digunakan lain waktu tetapi harus dalam keadaan tertutup rapat.

4.4.4.2 Pembuatan Media PDA (*Potato Dextrose Agar*)

Pembuatan PDA menggunakan kentang yang telah dikupas dan dipotong kecil-kecil sebanyak 200 gram dimasukkan kedalam erlenmeyer 1000 mL. Kemudian ditambah akuades sampai 1000 mL dan dipanaskan di atas penangas ± 1 jam. Setelah itu disaring dan filtratnya ditambah dextrose sebanyak 20 gram, agar sebanyak 20 gram, akuades sampai 1000 mL dan dipanaskan kembali ±15 menit. Kemudian dipindahkan kedalam erlenmeyer kecil dan ditutup dengan alumunium foil. Selanjutnya PDA yang telah jadi disterilkan pada autoklaf selama 20 menit.

4.4.4.3 Peremajaan Jamur

Jamur *Colletotrichum sp* diinokulasi sebanyak 1 ose kedalam cawan petri yang berisi PDA, dengan cara meletakkan jamur dengan 1 titik. Selanjutnya diinkubasi pada suhu kamar selama masa pertumbuhan jamur yang dibutuhkan.

4.4.4.4 Pembuatan Seri Konsentrasi

Larutan stok ekstrak daun cabe jawa dan nanoemulsi ekstrak daun cabe jawa dibuat seri konsentrasi 0,05%; 0,025%; 0,0125%. Pembuatan seri pada konsentrasi ekstrak daun cabe jawa diambil 0,05 gram ekstrak daun cabe jawa ditambah tween 80 hingga larut dan ditambah akuades dalam labu ukur 50 mL sampai tanda batas. Pembuatan seri pada konsentrasi nanoemulsi ekstrak daun cabe jawa yaitu dengan mengencerkan nanoemulsi yang telah diperoleh dengan akuades dalam labu ukur 50 mL.

4.4.5 Uji Aktivitas fungisida

Ekstrak daun cabe jawa dan nanoemulsi ekstrak daun cabe jawa dilakukan uji efek fungisida pada jenis jamur *Colletotrichum sp.* Perlakuan untuk nanoemulsi ekstrak daun cabe jawa yaitu dimasukkan media PDA yang masih dalam keadaan hangat atau dengan suhu 50 °C ke dalam tabung reaksi dengan perbandingan sesuai konsentrasi yaitu untuk konsentrasi 0,05% sebanyak 5 mL PDA dan 5 mL nanoemulsi ekstrak daun cabe jawa, konsentrasi 0,025% sebanyak 7,5 mL PDA dan 2,5 mL nanoemulsi ekstrak daun cabe jawa dan konsentrasi 0,0125% sebanyak 8,75 mL PDA dan 1,25 mL nanoemulsi ekstrak daun cabe jawa kemudian masing-masing dihomogenkan menggunakan vortex kemudian dituang ke dalam petri. Perlakuan ekstrak daun cabe jawa sama seperti perlakuan pada nanoemulsi ekstrak daun cabe jawa. Setiap perlakuan dilakukan dengan teliti dan steril agar mengurangi terjadinya kontaminasi di dalam lemari inkubator. Selanjutnya didiamkan media hingga padat lalu dimasukkan cakram jamur kedalam media dengan posisi ditengah. Setelah itu diinkubator selama 7 hari untuk melihat uji hambat fungisida terhadap jamur *Colletotrichum sp.*

4.4.6 Kontrol

Kontrol dibuat untuk membandingkan hasil uji hambat yang dilakukan. Kontrol negatif yang digunakan yaitu kontrol negatif tween 0,5% dan kontrol negatif emulgator 2,5%. Kontrol negatif tween 0,5% yaitu memasukkan media PDA yang masih dalam keadaan hangat ke dalam cawan petri sebanyak 5 mL dan tween 80 1% sebanyak 5 mL kemudian di tambahkan jamur *Colletotrichum*

sp dengan media cakram di tengah. Kontrol negatif emulgator 2,5% yaitu dengan memasukkan media PDA yang masih dalam keadaan hangat kedalam cawan petri sebanyak 5 mL dan campuran tween 80, capryol dan PEG konsentrasi 5% sebanyak 5 mL kemudian di tambahkan jamur *Colletotrichum* sp dengan media cakram di tengah. Diinkubasi selama 7 hari dan dilihat pertumbuhannya. Dilakukan hal yang serupa untuk kontrol positif yang menggunakan bahan antracol.

4.5 Analisis Data

Data diameter koloni jamur *Colletotrichum* sp dan persentase aktivitas penghambatan pertumbuhan jamur dianalisis dengan menggunakan Analysis of Variance (ANOVA).kemudian dilakukan uji Duncan dengan taraf kepercayaan 95% untuk melihat kehomogen dari suatu data. Analisis statistik ini diolah menggunakan SPSS 22.0.