

### **III. TATA CARA PENELITIAN**

#### **A. Rencana Tempat dan Waktu Penelitian**

Kegiatan penelitian ini dilakukan di Laboratorium Proteksi dan Agrobioteknologi Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Penelitian ini dilakukan pada bulan Maret – Juni 2018.

#### **B. Bahan dan Alat Penelitian**

Bahan-bahan yang digunakan adalah aquades, media PDA, umbi bawang dayak yang diambil dari Cangkringan, Sleman, Yogyakarta, alcohol 70%, spiritus, pelarut n-heksana (non polar), etil asetat (semi polar), metanol (polar), fungisida berbahan aktif mankozeb, HCl 1%, dan isolat murni jamur *Fusarium spp.* dari Laboratorium Agrobioteknologi Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah cawan petri, bunsen, pinset, korek api, LAF, *haemocytometer*, tabung reaksi, timbangan digital Ohaus, gelas ukur, pipet tetes, nampan, alat tulis, jarum ose, mikroskop binokuler, oven, autoclave, vortex, labu erlenmeyer, blender, mikropipet, pinset kertas, label, *plastic wrap*, kertas whatman No. 1 dan kaca preparat.

#### **C. Metode Penelitian**

Penelitian dilakukan menggunakan metode eksperimen yang disusun dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktor tunggal. Penelitian ini menggunakan 3 jenis pelarut untuk ekstraksi yaitu methanol, n heksana dan etil asetat yang masing-masing perlakuan diberikan konsentrasi 20%, 40%, 60% dan 80% sehingga

diperoleh 12 perlakuan sedangkan untuk pembandingan menggunakan kontrol dan fungisida sintetik. Setiap perlakuan diulang sebanyak tiga kali.

Masing-masing perlakuannya yaitu :

1. A = metanol + ekstrak bawang dayak 20%
2. B = metanol + ekstrak bawang dayak 40%
3. C = metanol + ekstrak bawang dayak 60%
4. D = metanol + ekstrak bawang dayak 80%
5. E = etil asetat + ekstrak bawang dayak 20%
6. F = etil asetat + ekstrak bawang dayak 40%
7. G = etil asetat + ekstrak bawang dayak 60%
8. H = etil asetat + ekstrak bawang dayak 80%
9. I = n heksana + ekstrak bawang dayak 20%
10. J = n heksana + ekstrak bawang dayak 40%
11. K = n heksana + ekstrak bawang dayak 60%
12. L = n heksana + ekstrak bawang dayak 80%
13. Kontrol = Tanpa perlakuan
14. FS = Fungisida sintetik (bahan aktif: mankozeb)

Layout penelitian dilampirkan pada Lampiran 1.

## **D. Cara Penelitian**

### **1. Sterilisasi Alat dan Bahan**

Seluruh alat yang akan digunakan pada penelitian ini dicuci terlebih dahulu hingga bersih, kemudian dikeringkan dan dibungkus dengan kertas kemudian

disterilisasi di dalam autoclave selama 30 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm.

## **2. Pembuatan Media PDA**

Dalam 1 liter aquades mengandung 200 g kentang, 15 g agar dan 15 g dextrose. Cara pembuatan yaitu kentang yang sudah dikupas dibersihkan lalu dipotong dadu kecil dan ditimbang 200 g. Potongan kentang dimasukkan ke dalam panci yang berisi air aquades 1000 ml dan dimasak sampai kentang matang dan lunak, kemudian sari dari kentang tersebut diambil dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer hingga mencapai volume 1 liter. Dextrose dan agar ditimbang masing-masing 15 g lalu dimasukkan ke dalam erlenmeyer yang telah berisi sari kentang 1 liter. Larutan tersebut diaduk hingga homogen. Kemudian setelah larutan homogen. Mulut tabung Erlenmeyer kemudian dibungkus menggunakan kertas aluminium foil sebelum dimasukkan ke dalam autoklaf diikat dengan karet dan dibungkus dengan plastik tahan panas, kemudian Erlenmeyer disterilkan dengan autoklaf dan dipanaskan selama 20 menit pada suhu 121°C dan dengan tekanan 1 atm. Setelah disterilkan, Erlenmeyer dikeluarkan dari autoklaf dan media PDA siap digunakan. Simpan pada lemari pendingin.

## **3. Penyediaan Jamur *Fusarium spp.***

Langkah awal dalam penyediaan jamur *Fusarium spp.* yaitu dengan membiakkan jamur *Fusarium spp.* Isolat *Fusarium spp.* didapat dari biakan murni di Laboratorium Agrobioteknologi Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Yogyakarta kemudian diremajakan dan diperbanyak lagi

menggunakan media PDA. Perbanyak jamur *Fusarium spp.* yaitu dengan mengambil isolat *Fusarium spp.* dari biakan murni ke dalam agar miring PDA pada tabung reaksi setelah itu diinkubasi pada suhu kamar yang sesuai selama 7 hari. Setelah selesai diinkubasi diidentifikasi kembali untuk memastikan adanya jamur *Fusarium spp.* (Oktavia, 2014).

#### **4. Identifikasi Jamur *Fusarium spp.***

Setelah didapatkan biakan murni pada media agar miring dilakukan pengamatan dengan menggunakan mikroskop untuk melihat beberapa karakter yang menunjukkan ciri khusus jamur *Fusarium spp.* Identifikasi jamur dilakukan secara makroskopis dan mikroskopis menggunakan kunci determinasi jamur sampai tingkat jenis. Secara makroskopis karakter-karakter yang diamati meliputi warna koloni, bentuk koloni, permukaan koloni, pola pertumbuhan koloni, dan diameter koloni. Sedangkan pengamatan mikroskopis karakter-karakter yang diamati meliputi bentuk makrokonidia dan mikrokonidia serta ada tidaknya chlamydospora miselium, hifa bersekat atau tidak. Identifikasi mengacu pada buku Barnett dan Hunter (1972).

#### **5. Persiapan Simplisia**

Bahan yang digunakan yaitu umbi bawang dayak yang telah berumur 3-4 bulan pasca tanam atau yang sudah mengeluarkan bunga, umbi berbentuk bulat telur memanjang, berwarna merah, terdiri dari  $\pm 5$  lapisan, dengan panjang  $\pm 5$  cm dan diameter  $\pm 3$  cm. Pemilihan bahan uji pada kondisi tersebut karena produksi metabolit sekunder diharapkan sudah maksimal dengan kadar yang seragam. Apabila pemanenan dilakukan terlalu awal akan berakibat pada

produksi metabolit tanaman yang rendah dan kandungan bahan aktifnya juga rendah. Jika pemanenan dilakukan terlalu lambat, maka dapat mengakibatkan mutu yang rendah, karena pemanenan akan berpengaruh terhadap kualitas dan kuantitas suatu tanaman.

Umbi bawang dayak yang akan digunakan sebagai ekstrak dicuci terlebih dahulu dengan air kran lalu dirajang dengan ketebalan 2 mm kemudian dikeringanginkan. Bahan tersebut diblender dan diayak sampai mendapat serbuk halus. Sebelum pembuatan ekstrak serbuk halus tadi disterilkan terlebih dahulu untuk agar tidak terkontaminasi oleh mikroorganisme lain.

## **6. Pembuatan Ekstrak Umbi Bawang Dayak**

Serbuk simplisia yang telah didapatkan lalu dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer dan ditambahkan pelarut yang berbeda yaitu metanol, etil asetat dan heksana, dengan perbandingan bahan dengan pelarut (1:4 b/v) (Akbar, 2006). timbang sebanyak 100 gram serbuk dan rendam dalam pelarut 400 ml sehingga sampel terendam sempurna lalu ditutup dengan *aluminium foil* dan disimpan di dalam *shaker* selama 24 jam. Setelah diekstraksi lalu didiamkan semalam, baru kemudian disaring dengan kertas saring biasa (berupa lembaran) sehingga diperoleh filtrat umbi bawang dayak dan ampas umbi bawang dayak. Hasil filtrat tersebut dievaporasi dengan alat *Rotavapor (rotary evaporator)* pada suhu 50° sehingga pelarut tadi menguap dan terpisah dari filtrat, dan dari proses tersebut dihasilkan ekstrak umbi bawang dayak.

## 7. Pembuatan Larutan Ekstrak

Pada penelitian ini menggunakan empat taraf konsentrasi larutan ekstrak yaitu 20%, 40%, 60% dan 80%. Untuk membuat membuat konsentrasi tersebut maka umbi yang telah diekstrak diencerkan dengan cara sebagai berikut :

- 1) Konsentrasi 20% = 2 ml ekstrak + 8 ml aquades
- 2) Konsentrasi 40% = 4 ml ekstrak + 6 ml aquades
- 3) Konsentrasi 60% = 6 ml ekstrak + 4 ml aquades
- 4) Konsentrasi 80% = 8 ml ekstrak + 2 ml aquades

Untuk larutan uji fungisida sintetik dibuat dengan mencampurkan 0,01 g/ 10 ml sedangkan kontrol menggunakan aquades steril (Wulandari, 2015).

## 8. Analisis Senyawa Flavonoid

Analisis senyawa flavonoid ini dianalisis secara kuantitatif yang dilakukan berdasarkan Harborne (1987):

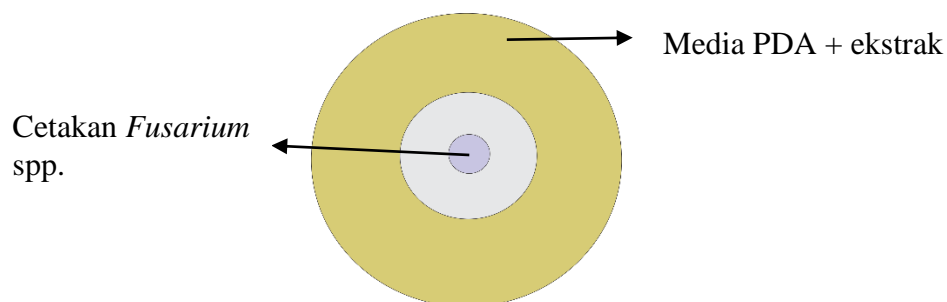
Larutan standar dibuat 100 ppm kemudian masing-masing diencerkan dengan pelarut metanol 70% dalam labu takar 25 mL sampai tanda dan diaduk hingga homogen. Blanko yang digunakan adalah metanol 70% murni.. Masing-masing larutan tersebut disaring menggunakan kertas saring Whatman. Setelah itu, filtrat larutan baku pembanding diukur kedalam sistem Spektrofotometer UV-Vis.

## 9. Pengujian Ekstrak Antifungi

Cara pengujian daya antifungi ekstrak umbi bawang dayak terhadap jamur *Fusarium* spp. dilakukan secara *in vitro* dengan dua cara yaitu :

1) Pengujian secara *in vitro* dengan teknik peracunan media

Media PDA yang telah dibuat dituang ke tabung reaksi sebanyak 9 ml, masing-masing perlakuan menyiapkan 1 tabung reaksi kemudian ditambahkan ekstrak umbi bawang dayak sebanyak 1 ml kemudian dihomogenkan menggunakan vortex. Kemudian media tersebut dituang ke dalam cawan petri. Setelah media beku, miselia jamur *Fusarium* spp. pada biakan murni diinokulasikan pada dalam media dengan menggunakan sedotan pengganti *cork borer* (bor gabus) berdiameter 5 mm lalu diletakkan di tengah-tengah cawan petri kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 1 minggu. Masing-masing percobaan diulang sebanyak 3 kali.

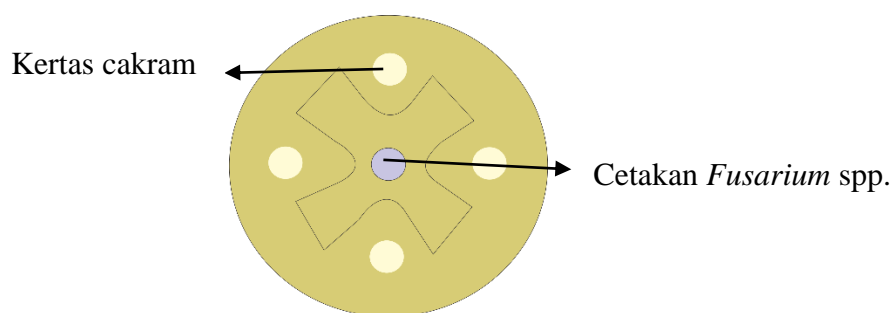


Gambar 2. Teknik pengujian dengan metode peracunan media

2) Pengujian secara *in vitro* menggunakan kertas cakram

Pengujian kedua ekstrak bawang dayak yaitu menggunakan kertas cakram. Kertas cakram dengan diameter 5 mm yang telah disterilisasi dimasukkan ke dalam seluruh beaker glass yang berisi larutan ekstrak, masing-masing konsentrasi perlakuan sebanyak 4 lembar kertas cakram. Rendam selama 15 menit hingga larutan ekstrak tersebut terhisap sempurna oleh kertas cakram. Kemudian disusun ke dalam cawan petri berisi PDA 10 ml. Penyusunan kertas cakram pada bagian pinggir cawan petri. Selanjutnya membuat

cetakan pada biakan murni koloni *Fusarium* spp. berbentuk bulat menggunakan bor gabus berdiameter 5 mm, cetakan tersebut diinokulasikan ke dalam cawan petri pada bagian tengah PDA yang telah diisi kertas cakram dengan masing-masing perlakuan. Inkubasi cawan petri perlakuan dan control pada suhu 27-30°C selama 1 minggu. Masing-masing percobaan diulang sebanyak 3 kali.



Gambar 3. Teknik pengujian dengan metode kertas cakram

## E. Parameter yang Diamati

### 1. Hasil Rendemen Total Ekstrak Umbi Bawang Dayak

Rendemen adalah presentase produk yang didapatkan dari membandingkan berat awal bahan dengan berat akhir. Sehingga dapat diketahui kehilangan beratnya selama proses pengolahan. Rendemen didapatkan dengan cara (menghitung) menimbang berat akhir bahan yang dihasilkan dari proses dibandingkan dengan berat bahan awal sebelum mengalami proses (Depkes RI, 2000).

Rendemen ekstrak umbi bawang dayak total dihitung dengan membandingkan berat awal serbuk simplisia dengan berat akhir ekstrak umbi bawang dayak total yang diperoleh (Depkes, 2002)



% Rendemen =  $\frac{\text{bobot ekstrak total yang diperoleh}}{\text{Bobot serbuk simplisia yang diekstraksi}} \times 100\%$

Bobot serbuk simplisia yang diekstraksi

## 2. Hasil Uji Senyawa Flavonoid

Pengamatan hasil uji fitokimia ini bertujuan untuk mengetahui senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak bawang dayak dengan membandingkan besarnya kandungan senyawa metabolit sekunder tiap sampel ekstrak bawang dayak terhadap pelarut yang digunakan. Pengujian ini sebagai langkah awal untuk mengetahui jenis komponen bioaktif yang terkandung pada masing-masing ekstrak sehingga dapat dimanfaatkan lebih lanjut. Hasil pengujian dinyatakan secara kuantitatif untuk membuktikan keberadaan senyawa kimia aktif tertentu yang dapat dideteksi dalam ekstrak sampel.

## 3. Makroskopis biakan jamur

Pengamatan makroskopis biakan jamur dilakukan secara tampak atas dan tampak bawah. Untuk tampak atas dilihat penyebaran koloni miselia, warna koloni miselia, struktur koloni miselia, arah pertumbuhan koloni miselia dan kerapatan miselia. Untuk tampak bawah dilihat warna koloni miselia jamur *Fusarium* spp.

## 4. Mikroskopis biakan jamur

Pengamatan secara mikroskopis meliputi bentuk makrokonidia, mikrokonidia, hifa bersekat atau tidak.

## 5. Pertumbuhan *Fusarium* spp.

### a. Pengukuran diameter koloni *Fusarium* spp.

Pengamatan pertumbuhan *Fusarium* spp. didapat pada diameter koloni *Fusarium* spp. Pengamatan untuk menghitung penghambatan pertumbuhan jamur pada cawan petri secara *in vitro* dilakukan dengan cara mengukur diameter koloni secara tegak lurus antar diameter sehingga diperoleh rata-rata diameter koloni *Fusarium* spp. Pengamatan ini dilakukan setiap hari setelah inokulasi selama 7 hari. Data yang diperoleh selanjutnya digunakan untuk menghitung diameter *Fusarium* spp. dengan rumus sebagai berikut :

$$D = \frac{D1+D2}{2}$$

Keterangan :

D : diameter *Fusarium* spp. (cm)

D1: diameter arah tegak lurus keatas

D2: diameter arah tegak lurus kesamping

### b. Persentase Penghambatan

Persentase penghambatan dilakukan setiap hari setelah inokulasi selama 7 hari.

Daya hambat dihitung dengan rumus (Mori *et al.*, 1997) sebagai berikut:

$$P = \frac{\text{diameter kontrol} - \text{diameter perlakuan}}{\text{diameter kontrol} - \text{koloni jamur awal (cm)}} \times 100\%$$

Kategori aktivitas antijamur menurut Kartika, *et al.* (2003) dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Tingkat Aktivitas Antijamur

No	Aktivitas Penghambatan	Tingkat Aktivitas
1	$P > 75\%$	Sangat kuat
2	$50\% < P < 75\%$	Kuat
3	$25\% < P < 50\%$	Sedang
4	$0\% < P < 25\%$	Lemah
5	0	Tidak aktif

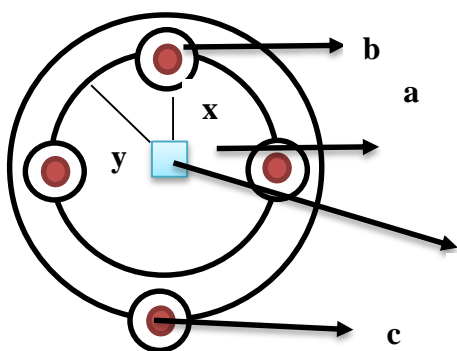
Keterangan :

P : Persentase aktivitas antijamur

### c. Zona Hambat

Zona hambat jamur dihitung pada hari terakhir pengamatan. Aktivitas antijamur dinyatakan terhambat apabila terbentuk zona bening disekeliling kertas cakram. Aktivitas antifungi ditentukan dengan rumus uji antagonis yaitu (Suryanto, 2011):

Zona hambat = jari-jari hifa normal – jari jari hifa yang terhambat oleh ekstrak



Keterangan :

a : pertumbuhan koloni jamur

b : zona hambat ekstrak bawang dayak terhadap jamur

c : kertas cakram yang telah terisi ekstrak

d : letak koloni jamur yang ditanam

x : koloni jamur yang terhambat pertumbuhannya (cm)

y : koloni jamur yang pertumbuhannya normal (cm)

$y - x$  : jari-jari zona hambat (cm)

Gambar 4. Pengukuran zona hambat

### d. Luas koloni

Pengamatan dilakukan setiap hari mulai dari hari pertama setelah inokulasi sampai cawan petri kontrol penuh ditumbuhi jamur (1 minggu).

Penentuan luas koloni jamur *Fusarium* spp. berdasarkan jari-jari ( $r$ ) koloni jamur. Pengukuran jari-jari dilakukan pada keempat sisi koloni jamur tiap perlakuan. Keempat jari-jari kolon jamur lalu dijumlahkan dan hasilnya dibagi empat untuk diketahui rata-rata jari-jarinya. Luas lingkaran koloni jamur dihitung menggunakan rumus ( $A = r^2$ ) dan masukkan rata-rata jari-jari koloni jamur yang telah diukur (Mahartha, 2013).

**6. Biomassa koloni jamur *Fusarium* spp.**

**a. Berat basah koloni jamur *Fusarium* spp.**

Berat basah koloni jamur dihitung pada hari terakhir pengamatan dengan cara menambahkan 10 ml HCl 1% pada cawan petri perlakuan kemudian dipanaskan hingga agarnya larut. Selanjutnya disaring menggunakan corong dan kertas whatman No. 1 sampai tidak ada lagi tetesan air yang tersisa dikertas whatman kemudian ditimbang menggunakan timbangan analitik sehingga didapat berat awal. Kemudian berat basah didapat dari berat awal dikurangi dengan berat kertas whatman.

**b. Berat kering koloni jamur *Fusarium* spp.**

Miselia jamur yang dibungkus dengan kertas whatman dimasukkan kembali ke dalam cawan kemudian dibungkus dengan kertas dan dioven pada suhu 60°C selama 2 hari (sampai beratnya konstan). Selanjutnya ditimbang beratnya dengan timbangan analitik. Berat kering didapat dari berat awal dikurangi dengan berat kertas *whatman*.

## 7. Kerapatan spora

Pengamatan perkembangan jamur *Fusarium* spp. pada cawan petri juga diukur dengan melihat kerapatan spora koloni jamur *Fusarium* spp. Adapun kerapatan spora dapat dihitung dengan menggunakan rumus (Gabriel & Riyatno, 1989) :

$$C = \frac{t}{n \times 0,25} \times 10^6$$

Keterangan :

- C = kerapatan spora per ml larutan
- t = jumlah total spora dalam kotak sampel yang diamati
- n = jumlah kotak sampel
- 0,25 = faktor koreksi penggunaan kotak sampel skala kecil pada *Haemocytometer*

Penghitungan kerapatan spora dilakukan dengan spora *Fusarium* spp. yang tumbuh pada tiap cawan petri pada tiap ulangan diambil dengan jarum ose lalu dimasukkan dalam air aquades steril dalam cawan petri lalu dihomogenkan. Setelah itu suspensi spora *Fusarium* spp. diteteskan pada ruang hitung *haemocytometer* lalu ditutup dengan kaca obyek dan jumlah spora dapat dihitung dalam lima kotak sedang dibawah mikroskop dan dilihat rata-ratanya.

## F. Analisis Data

Data hasil pengamatan dianalisis dengan menggunakan uji F taraf 5%. Apabila diperoleh hasil beda nyata antara perlakuan yang dicobakan maka dilakukan uji lebih lanjut dengan DMRT (*Duncan Multiple Range Test*) dan untuk mengetahui pengaruh antar kelompok perlakuan dilakukan Uji Kontras (Uji Beda Rerata Grup Perlakuan).