

III. METODOLOGI

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan Laboratorium Mikologi Jurusan HPT Fakultas Pertanian dan Laboratorium Instrumentasi Kimia Jurusan Kimia Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya, Malang. Penelitian dilaksanakan mulai bulan Maret sampai bulan Agustus 2013.

3.2 Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun jagung manis, daun sirih, media PDA, n-hexane, metanol, aquades, alkohol, khlorox, spiritus, jamur *E. turcicum*.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat tulis, kamera, timbangan digital, kapas, tisu, cawan petri, gelas ukur, pisau, pipet, pinset, bunsen, autoklaf, oven, kertas saring, kompor listrik, *haemocytometer*, *sprayer*, *baker glass*, *vacuum rotary evaporator*, erlenmeyer, *orbital shaker*, corong pisah dan GC-MS merk Shimadzu QC 2010.

3.3 Metode Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dengan dua tahapan pengujian yaitu,

1. Pengujian ekstrak daun sirih secara *in vitro* terhadap pertumbuhan jamur *E. turcicum* pada cawan petri.
2. Pengujian ekstrak daun sirih secara *in vivo* terhadap perkembangan jamur *E. turcicum* pada daun jagung.

3.4 Persiapan Penelitian

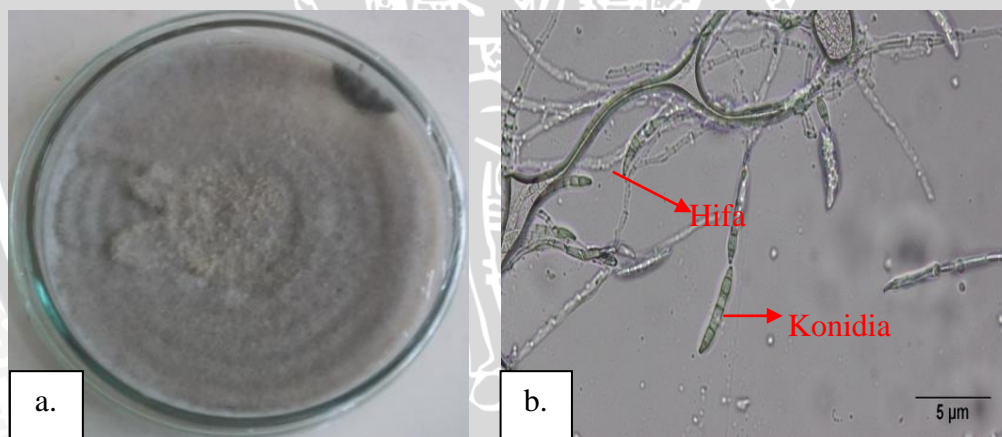
3.4.1 Persiapan dan Perbanyak Isolat Jamur *E. turcicum*

Jamur *E. turcicum* yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari daun jagung sakit (Gambar 7) yang diperoleh dari lahan milik petani di Desa Gunungsari, Kecamatan Bumiaji, Batu.



Gambar 1. Daun Jagung yang Terserang Jamur *E. turcicum*

Perbanyak isolat pada media PDA (*Potato Dextrose Agar*). Langkah awal perbanyak isolat jamur *E. turcicum* yaitu dari daun yang berpenyakit diisolasi dengan cara dipotong sebesar 0.5 cm daun sakit dan 0.5 cm daun sehat. Daun yang telah dipotong di sterilkan menggunakan khlorox, alkohol, dan aquades. Daun ditiriskan kemudian diinokulasikan pada cawan petri berisi media PDA. Jamur yang tumbuh kemudian diidentifikasi secara makroskopis (Gambar 8a) dan mikroskopis (Gambar 8b). Dalam identifikasi ini jamur yang tumbuh adalah jamur *E. turcicum*. Setelah itu jamur *E. turcicum* dipurifikasi dan diperbanyak pada media PDA.



Gambar 2. Kenampakan Makroskopis (a) dan Mikroskopis (b) Jamur *E. turcicum*

3.4.2 Pembuatan Fungisida Nabati

Daun sirih segar yang telah diidentifikasi spesiesnya didapatkan dari Desa Capang Kecamatan Purwodadi, Pasuruan (Lampiran 7). Daun sirih sebanyak 3 kg kemudian dibersihkan dan dikering anginkan selama \pm 7 hari. Daun yang telah kering kemudian dihaluskan dengan blender sampai menjadi tepung sebanyak 400 g. Tepung daun sirih yang didapat dicampur dengan pelarut metanol 80% dalam

erlenmeyerukuran 500 ml dengan perbandingan 1:3. Langkah selanjutnya yaitu diaduk dengan *orbitalshaker* kecepatan 150 rpm selama 24 jam sebanyak 3 kali. Setelah didapatkan ekstrak daun sirih kemudian dipekatkan menggunakan *vacuum rotary evaporator* (Riki *et al.*, 2012). Ekstrak pekat metanol yang didapatkan kemudian dipartisi atau dipisahkan dari sisa-sisa lemak yang masih ada menggunakan n-heksana.

Ekstrak pekat metanol dipisahkan (fraksinasi) dengan n-heksana 80% (1:1) menggunakan corong pisah. Corong pisah yang telah diisi ekstrak pekat metanol dan n-heksana dikocok sebentar, setelah itu dibiarkan sampai terbentuk 2 lapisan yaitu lapisan n-heksana dan lapisan metanol. Filtrat metanol dikeluarkan kemudian dimasukkan dalam gelas ukur, begitu juga filtrat n-heksana. Filtrat metanol dimasukkan kembali dalam corong pisah kemudian ditambahkan n-heksana baru. Perlakuan diulang 3 kali sehingga diperoleh ekstrakn-heksana dan ekstrak metanol. ekstrakn-heksana dipekatkan menggunakan *vacuum rotary evaporator*. N heksana pekat ditimbang kemudian dibuat konsentrasi.

3.4.4 Pembuatan Formulasi Konsentrasi Ekstrak Daun Sirih

Pembuatan formulasi untuk diujikan secara *in vitro* dimulai dengan membuat larutan stok. Ekstrak pekat n-heksana ditimbang 7 g (konsentrasi tertinggi) kemudian dimasukkan pada *baker glass* ukuran 50 ml dan dicampur dengan 10 ml aquades steril, tween 80 sebagai pengemulsi satu tetes (0.2 ml) dan agristik sebagai perekat. Diaduk hingga menjadi larutan. Larutan ekstrak tersebut kemudian ditambahkan pada 990 ml aquades steril sampai tanda batas dan didapatkan larutan induk 7 g/l. Dari larutan induk 7 g/l dibuat konsentrasi yaitu 0.1 g/l, 2.5 g/l, 4 g/l, dan 7 g/l. Setiap konsentrasi tersebut diencerkan dalam gelas ukur 50 ml sampai tanda batas. Larutan ini akan langsung diaplikasikan pada media PDA.

Ekstrak pekat n-heksan untuk pengujian secara *in vivo* ditimbang sesuai konsentrasi yaitu 0.1 gr, 2.5 gr, 4 gr, dan 7 gr. Setelah ditimbang semua konsentrasi ditambahkan dengan tween 80, agristik, dan 1 liter aquades. Larutan ekstrak daun sirih berbagai konsentrasi diambil secukupnya untuk merendam daun jagung.

3.4.5 Penyiapan Daun jagung sebagai bahan penelitian

Daun jagung yang digunakan sebagai bahan penelitian adalah daun jagung manis yang diperoleh dari lahan petani di Karangploso, Malang. Tanaman jagung manis berumur ± 30 hari atau mencapai masa generatif diambil daun pada bagian bawah yang sehat.

3.5 Pelaksanaan Penelitian

3.5.1 Uji senyawa menggunakan GC-MS

Ekstrak daun sirih dengan pelarut n heksana diambil satu tetes (0.2 ml) kemudian di suntikkan pada *injection system* pada GC-MS yang telah siap digunakan. Oven pada GC-MS digunakan untuk memanaskan kolom pada temperature tertentu sehingga mempermudah proses pemisahan komponen sample. Komponen tersebut dibaca di *detector* dan direkam dalam *recorder* berupa *peak area* (%). *Peak area* (%) didapatkan pembacaan grafik setiap komponen pada rentang waktu tertentu menunjukkan kecepatan migrasi komponen. Waktu untuk mencapai *peak* kemudian di cocokkan dengan literatur yg tersimpan dalam perangkat GC – MS.

3.5.2 Pengujian ekstrak daun sirih secara *in vitro* terhadap pertumbuhan jamur *E. turcicum* pada cawan petri

Pengujian terhadap penghambatan pertumbuhan jamur *E. turcicum* oleh ekstrak daun sirih berbagai konsentrasi menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 5 perlakuan dan 5 ulangan. Perlakuan-perlakuan yang diujikan, yaitu :

1. Jamur *E. turcicum* pada media PDA tanpa perlakuan ekstrak daun sirih (kontrol)
2. Jamur *E. turcicum* pada media PDA dengan perlakuan ekstrak daun sirih pada konsentrasi 0.1g/l
3. Jamur *E. turcicum* pada media PDA dengan perlakuan ekstrak daun sirih pada konsentrasi 2.5 g/l
4. Jamur *E. turcicum* pada media PDA dengan perlakuan ekstrak daun sirih pada konsentrasi 4 g/l

5. Jamur *E. turcicum* pada media PDA dengan perlakuan ekstrak daun sirih pada konsentrasi 7 g/l

3.5.1.1 Aplikasi fungisida nabati ekstrak sirih

Aplikasi fungisida nabati pada cawan petri dilakukan dengan mencampur 2 ml ekstrak sirih berbagai konsentrasi dengan media PDA cair sampai 10 ml kemudian dituangkan dalam cawan petri dan didiamkan sampai media padat.

3.5.1.2 Inokulasi patogen *E.turcicum*

Patogen *E. turcicum* didapatkan dari biakan murni yang telah dibuat sebelumnya. Diambil satu *corkborrer* koloni *E. turcicum* dari biakan murni pada bagian tepi cawan petri kemudian diinokulasikan pada cawan petri berisi media PDA baik tanpa maupun dengan campuran fungisida nabati sirih berbagai konsentrasi. Pengamatan dilakukan setiap hari sampai salah satu cawan berisi jamur *E. turcicum* memenuhi cawan petri.

3.5.3 Pengujian ekstrak daun sirih secara *in vivo* terhadap perkembangan jamur *E. turcicum* pada daun jagung.

Pengujian ekstrak daun sirih secara *in vivo* untuk mengetahui perkembangan jamur *E. turcicum* pada daun jagung secara langsung setelah diberi fungisida nabati ekstrak daun sirih berbagai tingkat konsentrasi. Pengujian menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 5 perlakuan dan 5 ulangan. Perlakuan-perlakuan yang diujikan :

1. Daun jagung manis pada cawan petri tanpa perlakuan ekstrak daun sirih (kontrol)
2. Daun jagung manis pada cawan petri dengan perlakuan ekstrak daun sirih pada konsentrasi 0.1g/l
3. Daun jagung manis pada cawan petri dengan perlakuan ekstrak daun sirih pada konsentrasi 2.5 g/l
4. Daun jagung manis pada cawan petri dengan perlakuan ekstrak daun sirih pada konsentrasi 4 g/l
5. Daun jagung manis pada cawan petri dengan perlakuan ekstrak daun sirih pada konsentrasi 7 g/l

3.5.2.1 Aplikasi fungisida nabati ekstrak sirih

Daun jagung manis yang digunakan adalah daun bagian bawah yang sehat dan dipotong 8 cm. Permukaan daun disterilkan dengan khlorox, alkohol dan aquades untuk membilas. Daun yang sudah steril ditiriskan. Langkah selanjutnya yaitu inokulasi dan pemberian perlakuan ekstrak daun sirih pada daun.

Daun jagung yang telah tiris diinokulasi suspensi jamur *E. turcicum* dengan cara direndam. Daun jagung hasil rendaman suspensi ditiriskan, kemudian direndam dengan ekstrak daun sirih sesuai perlakuan. Daun yang telah tercampur dengan jamur dan ekstrak sirih diletakkan dalam cawan petri yang telah diberi alas kapas basah agar tidak mudah kering. Pengamatan dilakukan sampai gejala pertama muncul.

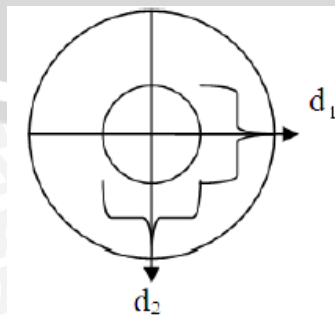
3.6 Parameter Pengamatan

3.6.1 Penghambatan pertumbuhan koloni berbagai konsentrasi

Daya hambat ekstrak daun sirih terhadap pertumbuhan jamur *E. turcicum* dihitung berdasarkan hasil pengukuran diameter koloni jamur *E. turcicum*. Pengukuran diameter koloni jamur *E. turcicum* dilakukan pada saat koloni jamur pada medium tanpa perlakuan (kontrol) ekstrak daun sirih telah memenuhi cawan petri. Penghitungan diameter koloni dilakukan dengan cara membuat garis vertikal dan horizontal berpotongan tepat pada titik tengah koloni jamur di bagian luar alas cawan petri. Cara pengukurannya menurut Riki, Ali, dan Venita (2012) adalah berdasarkan pada rumus dan gambar berikut:

$$D = \frac{d_1 + d_2}{2} \dots \dots \dots 1)$$

Keterangan : D = diameter koloni jamur, d₁ = diameter vertikal koloni jamur yang diamati, d₂ = diameter horizontal koloni jamur yang diamati



Gambar 3. Cara Pengukuran Diameter Koloni Jamur pada Media PDA

Setelah diketahui diameter koloni pada setiap perlakuan dan ulangan kemudian dihitung presentase penghambatan masing-masing konsentrasi dengan rumus menurut Ahmad dan Ido (2009) :

$$P = \frac{D1 - D2}{D1} \times 100\% \dots \dots 2)$$

Keterangan: P= Persentase penghambatan, D1= Diameter *E. turcicum* pada kontrol (mm), D2= Diameter *E. turcicum* pada setiap perlakuan (mm)

3.6.2 Berat Kering (biomassa) Miselium *E. turcicum*

Berat kering (biomassa) miselium jamur digunakan untuk mengetahui jamur *E. turcicum* pertumbuhannya terhambat oleh ekstrak daun sirih melalui bobotnya. Rumus berat kering (biomassa) menurut Hariyono (2007) yaitu,

$$M = (m1 - m0) + k \dots \dots 3)$$

Keterangan : M = massa miselium *E. turcicum*, m0 =berat kertas saring kosong, m1 = berat kertas saring + miselia *E. turcicum*, dan k = koreksi (kalibrasi)

Prosedur penimbangan berat kering (biomassa) miselia *E. turcicum* menurut Hariyono (2007) yaitu :

1. Kertas saring digunting bentuk bundar dengan diameter 9 cm sebanyak 15 lembar dan 3 lembar sebagai faktor koreksi. Ditimbang dengan timbangan analitik. Kertas saring 15 lembar ditimbang untuk berat awal (m0) dan kertas saring ini juga digunakan untuk menimbang berat miselium (m1).
2. Media PDA yang tidak ditumbuhi jamur dipisahkan dengan cara memotong media pada bagian yang kosong.
3. Bagian media yang ditumbuhi jamur dilarutkan dengan cara menuangkan HCL 10% dalam cawan petri, ditunggu 10 menit sambil digoyang goyang dan dihangatkan di atas lampu bunsen agar media benar-benar larut.
4. Miselium dipisahkan dari media dengan cara disaring menggunakan kertas saring yang sebelumnya sudah ditimbang (langkah 1) setelah media benar-benar larut.
5. Miselium pada kertas saring dikeringkan dalam oven pada suhu 70°C selama 1 jam-1,5 jam.

6. Penimbangan menggunakan neraca digital setelah pengeringan selesai. Didapatkan berat miselium dan kertas saring (m1).
7. Kertas saring kosong juga mendapatkan perlakuan 2-6 untuk mengetahui penurunan dan penambahan akibat pengaruh HCL. Berat kertas saring kosong digunakan untuk koreksi.
8. Perhitungan menggunakan rumus pada persamaan (3).

3.6.3 Gejala Serangan dan Masa inkubasi penyakit

Masa inkubasi penyakit dilakukan dengan cara mengamati daun jagung pada perlakuan kontrol atau dengan pemberian ekstrak daun sirih dalam cawan petri. Pengamatan dilakukan setiap hari sampai gejala pertama pada daun jagung muncul. Hal ini dilakukan untuk mengetahui berapa lama waktu yang dibutuhkan patogen *E. turcicum* untuk menyebabkan daun sakit. Gejala serangan jamur *E. turcicum* dapat dilihat dari banyaknya lesio/bercak pada daun jagung.

3.7 Analisis Data

Data yang diperoleh diuji dengan menggunakan uji F taraf 5% dan apabila dalam pengujian sidik ragam diperoleh pengaruh perlakuan berbeda nyata, maka dilanjutkan dengan Uji Beda Nyata Terkecil 5% (BNT 0,05).