

### III. METODOLOGI

#### 3.1 Waktu dan tempat

Penelitian ini dilaksanakan di kebun percobaan milik PT BISI International, Tbk Desa Kambingan, Kecamatan Pagu, Kabupaten Kediri, Jawa Timur. Daerah tersebut memiliki suhu 28° - 33 °C dan kelembaban nisbi per tahun rata-rata 74-86%. Penelitian untuk mengamati jamur endofit akar di Laboratorium Penyakit II, Jurusan Hama penyakit Tumbuhan, Universitas Brawijaya. Waktu pelaksanaan dimulai November 2016 sampai dengan Juli 2017.

#### 3.2 Alat dan Bahan Penelitian

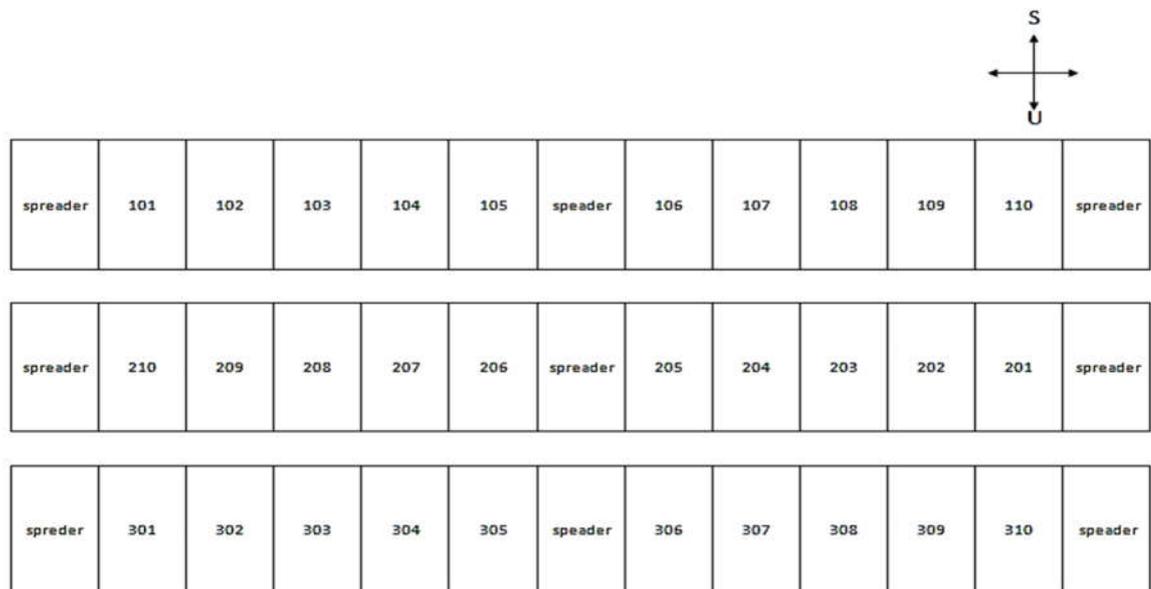
Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu buku pengamatan dan alat tulis, meteran, timbangan duduk analitik dan timbangan gantung. Alat yang digunakan dalam penelitian eksplorasi jamur endofit daun meliputi : *autoclave*, kapas steril, *aluminium foil*, cutter, kantong plastik, botol media, cawan petri, *L AFC*, jarum ose, gunting steinlis, pinset, *object glass*, *cover glass*, mikroskop dan kamera.

Bahan yang digunakan meliputi, benih lima varietas jagung hibrida baru (BMD57, BMD58, BMD59, BMD60 DAN TF8016) dan benih lima varietas jagung hibrida komersial sebagai pembandingan (BISI 18, DK95, P35, NK6326 dan Pertiwi 2), pupuk NPK majemuk (15-15-15) dan pupuk urea. Sedangkan untuk penelitian jamur endofit bahan yang dibutuhkan meliputi, daun dari 5 varietas jagung yang di uji dan memiliki ketahanan sangat tahan dan sangat peka, kentang, dekstrose (gula), agar, *chloramphenicol*, dan aquades steril, natrium hipoklorit (NaOCl), alcohol 70%, kapas steril, tisu steril, air.

#### 3.3 Metode Penelitian

Percobaan di lapang dilakukan menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) dengan 10 varietas dan tiga kali ulangan. Plot masing-masing berukuran 14 m<sup>2</sup> yang terdiri dari 4 baris dengan jarak antar baris 70 cm dan jarak tanaman dalam baris 20 cm, panjang baris 5 m. Pada saat pengamatan dan panen, data yang digunakan berasal dari data yang di ambil melalui metode diagonal dengan 5 titik pengambilan pada masing-masing plot. Sedangkan metode yang digunakan dalam eksplorasi jamur endofit pada setiap varietas menggunakan metode acak

terpilih. Pengacakan varietas dalam setiap ulangannya tersaji dalam denah plot dan tabel acakan dibawah ini:



Gambar 5. Denah plot

Keterangan: angka dalam gambar menunjukkan label perlakuan.

Tabel 1. Daftar tanaman jagung pipil yang diujikan serta penempatan pada masing-masing plot

No.	Varietas	Ulangan		
		1	2	3
1	BMD57	101	208	302
2	BMD58	103	209	306
3	BMD59	105	201	303
4	BMD60	109	207	304
5	TF8016	110	202	309
6	BISI 18	102	206	307
7	DK 95	107	203	308
8	P35	106	205	310
9	NK 6326	108	204	305
10	PERTIWI 2	104	210	301

Keterangan: Angka dalam tabel menunjukkan perlakuan. 10 varietas

### 3.4 Pelaksanaan Penelitian di Lapangan

Teknologi budidaya yang diterapkan merupakan paket teknologi yang sesuai dengan anjuran yang diberikan oleh PT. BISI INTERNATIONAL, Tbk., meliputi:

#### 3.4.1 Persiapan Lahan dan Penanaman

Persiapan lahan dilakukan beberapa hari menjelang penanaman dengan cara membajak tanah dua kali, dilanjutkan dengan meratakan tanah menggunakan garu. Penanaman dilakukan dengan menggunakan tugal dengan jarak tanam

antar baris 70 cm dan dalam baris 20 cm. Setiap perlakuan (varietas) ditanam 4 baris, dengan panjang 5 m masing-masing baris. Setiap lubang ditanami 2 biji. Upaya untuk menghindari serangan hama terutama lalat bibit pada perkecambahan benih dan tanaman muda, maka pada setiap lubang diberi sedikit insektisida berbahan aktif imidakloprid (6-8 kg/ha/aplikasi).

Sebelum dilakukan penanaman tanaman uji, di sekeliling petak percobaan ditanami tanaman penular yakni F1 BISI 16 dan benih induk RD09 yang rentan bulai, masing-masing 2 baris. Tanaman dirawat seperti jagung biasa. Setelah tanaman penular terserang bulai lebih dari 75%, tanaman uji di tanam.

#### **3.4.2 Pembuatan dan Penyemprotan Larutan Spora Bulai**

Proses penyebaran spora bulai keseluruh tanaman penular (spreader) dibantu dengan penyemprotan larutan yang mengandung spora. Pembuatan larutan spora menurut Burhanuddin (2010) sebagai berikut: mencari daun yang terserang bulai yang masih segar pada pagi hari. Daun dibersihkan kemudian pangkal daun dimasukkan ke dalam wadah yang mengandung larutan gula 2%. Wadah ditempatkan di tempat gelap dan lembab. Pada sekitar pukul 02.00 dini hari, daun yang terlihat mengandung spora dicelupkan kedalam air larutan gula 2% dan sporanya diambil dengan menggunakan kuas. Untuk satu tangki penyemprotan volume 14 liter digunakan sekitar 75-100 daun.

Penyemprotan larutan spora dimulai pada saat tanaman penular sudah muncul di permukaan tanah (7 hari setelah tanam), penyemprotan dilakukan mulai pukul 06.00 pagi hari. Penyemprotan dilakukan setiap 2 hari sekali sampai dengan tanaman berumur 21 hst pada saat tanaman yang terserang bulai mulai nampak jelas.

#### **3.4.3 Pemupukan dan Penyiangan**

Pemupukan dilakukan sebanyak tiga kali, yaitu pupuk dasar diberikan bersamaan dengan tanam, pupuk susulan pertama diberikan pada saat umur 21-25 hari dan pupuk susulan kedua umur 42-45 hari. Setelah pemberian pupuk susulan pertama dan kedua juga dilakukan penyiangan dengan pembumbunan. Jenis dosis yang diberikan adalah pupuk dasar Kebomas (15-15-15) 250 kg/ha, pupuk susulan pertama Urea 200 kg/ha, pupuk susulan kedua Urea 200 kg/ha.

#### 3.4.4 Pengendalian Hama Dan Penyakit

Pengendalian hanya dilakukan untuk mengendalikan hama bibit (*Altherigona sp.*). Pengendalian lalat bibit dilakukan dengan memberikan insektisida berbahan aktif *imidakloprid* pada saat tanam dan tanaman berumur 20 hari diberikan pada pucuk tanaman dengan dosis 6-8 kg/ha/aplikasi. Sedangkan hama dan penyakit lain yang menyerang selama periode pengujian tidak dilakukan pengendalian.

#### 3.4.5 Panen

Panen dilakukan pada saat biji jagung sudah masak fisiologis yang ditandai dengan munculnya jaringan hitam (*black layer*) pada pangkal biji yang menempel pada janggél. Panen dilakukan secara manual dengan tangan.

### 3.5 Pengamatan di Lahan

#### 3.5.1 Intensitas Penyakit

Pengamatan intensitas penyakit dilakukan dengan pengamatan secara langsung dengan beberapa tahap dimulai pada saat tanaman berumur 7 hst (hari setelah tanam), 14 hst, 21 hst, 28 hst, 35 hst dan 42 hst. Pengambilan data dilakukan dengan cara menghitung jumlah tanaman terserang pada setiap plot, kemudian dinisbahkan dengan jumlah tanaman awal diamati pada umur 7 hst atau jumlah populasi tanaman per plot, dengan rumus sebagai berikut (BBN Kementan, 2012) :

$$SB = \frac{n}{N} \times 100\%$$

Keterangan :

- Sb : Persentase tanaman terserang bulai per plot
- n : Jumlah tanaman terserang bulai per plot
- N : Jumlah tanaman awal per plot

#### 3.5.2 Kategori Ketahanan

Kategori ketahanan varietas yang diuji, dikategorikan berdasarkan persentase intensitas serangan dari penyakit bulai. Menurut Budiarti *et al.* dalam Talanca (2009) penggolongan ketahanan tanaman jagung terhadap penyakit bulai dibagi menjadi 5 yaitu :

Tabel 2. Katagori ketahanan varietas jagung hibrida terhadap serangan penyakit bulai berdasarkan persentase serangan (Talanca, 2009).

Persentase Serangan	Kategori Ketahanan
0,0 – 10%	Sangat Tahan
>10 – 20%	Tahan
>20 – 40%	Agak Tahan
>40 – 60%	Peka
>60 – 100%	Sangat Peka

### 3.5.3 Indeks Keragaman (H'), Dominasi (C) dan Keseragaman (E)

Indeks keanekaragaman digunakan untuk menghitung keanekaragaman jamur endofit dari daun tanaman jagung. Menurut Ludwig dan Reynold (1988), indeks keanekaragaman Shannon digunakan untuk mendapatkan gambaran populasi melalui jumlah individu masing-masing jenis dalam suatu komunitas. Indeks keseragaman dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$H' = \sum_{i=1}^s \left( \frac{ni}{N} \right) \ln \left( \frac{ni}{N} \right)$$

Keterangan:

- H' = indeks keanekaragaman Shannon
- s = jumlah spesies
- ni = proporsi jumlah individu pada spesies
- N = jumlah individu seluruh jenis

Indeks keragaman dihitung dengan kriteria sebagai berikut.

Tabel 3. Kriteria Indeks Keragaman

Nilai Indeks	Kriteria
<1	Keanekaragaman rendah, penyebaran jumlah individu tiap jenis rendah
1-3	Keanekaragaman sedang, penyebaran jumlah individu tiap jenis sedang
>3	Keanekaragaman tinggi, penyebaran jumlah individu tiap jenis tinggi

Indeks dominansi digunakan untuk mengetahui adanya dominansi jenis jamur endofit pada suatu komunitas. Menurut Ludwig dan Reynold (1988), indeks dominansi dihitung dengan rumus:

$$C = \sum_{i=1}^s \left( \frac{Ni}{N} \right)^2$$

Keterangan:

C = indeks dominansi

Ni = jumlah individu ke i

N = jumlah total individu

Tabel 4. Kriteria Indeks Dominasi Simpson

Nilai Indeks	Kriteria
$0,00 < C \leq 0,50$	Rendah
$0,50 < C \leq 0,75$	Sedang
$0,75 < C \leq 1,00$	Tinggi

Indeks keseragaman digunakan untuk mengukur keseimbangan komunitas. Hal ini didasarkan pada ukuran kesamaan jumlah individu antar spesies dalam suatu komunitas (Ludwig dan Reynold, 1988). Rumus yang digunakan dalam keseragaman sebagai berikut:

$$E = \frac{H'}{\ln s}$$

Keterangan:

E = indeks keseragaman

H' = indeks keanekaragaman Shannon

S = jumlah genus atau spesies

Tabel 5. Kriteria Indeks Keseragaman

Nilai Indeks	Kondisi Komunitas
$0,00 < E \leq 0,50$	Keseragaman kecil, komunitas tertekan
$0,50 < E \leq 0,75$	Keseragaman sedang, komunitas labil
$0,75 < E \leq 1,00$	Keseragaman tinggi, komunitas stabil

### 3.5.4 Pengamatan Tinggi Tanaman

Tinggi tanaman diamati dengan mengukur tingginya dari permukaan tanah hingga tajuk tanaman yang paling tinggi dan di rata-rata dari semua tanaman yang diukur. Pengukuran tinggi tanaman dilakukan dengan mengambil beberapa sampel tanaman per plot. Pengambilan sampel menggunakan metode diagonal, yakni dengan mengambil 5 titik dalam plot, 4 titik dipojok dan 1 titik ditengah. Tiap titik diambil 4 tanaman. Pengamatan dimulai saat tanaman berumur 7 hst, 14 hst, 21 hst, kemudian 28 hst, 35 hst dan 42 hst hingga 63 hst.

### 3.5.5 Pengamatan Jumlah Daun

Pengamatan jumlah daun dilakukan dengan menghitung jumlah daun yang telah membuka dengan sempurna. Pengamatan dilakukan dengan menghitung seluruh tanaman pada setiap plot. Pengamatan dimulai saat tanaman berumur 7 hst, 14 hst, 21 hst, kemudian 28 hst, 35 hst dan 42 hst.

## 3.6 Pelaksanaan Penelitian di Laboratorium

### 3.6.1 Pembuatan media

Media buatan yang digunakan adalah PDA (Potato Dextrose Agar). media yang digunakan dalam proses isolasi adalah media yang kaya nutrisi sehingga memungkinkan mempercepat perkembangan jamur endofit (Agusta, 2009). Bahan yang digunakan dalam pembuatan media adalah kentang, dekstrose (gula), agar, chloramphenicol, dan aquades steril. Kentang dan dekstrose merupakan sumber nutrisi untuk isolat jamur endofit, agar merupakan pematat dari media, dan *chloramphenicol* mencegah kontaminasi dari bakteri (antibakteri). Untuk meminimalisir adanya kontaminasi mikroorganisme yang tidak dikehendaki, media PDA diletakkan dalam botol media dan ditutup permukaan botolnya dengan kapas steril dan *aluminium foil*. Kemudian disterilisasi dengan metode pemanasan basah, yaitu *autoclave* dengan suhu 121°C dan tekanan 1,5 atm.

### 3.6.2 Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel akar jagung sehat dilakukan 2 kali dalam 1 kali masa tanam saat (9 MST dan 14 MST) dan menggunakan metode acak, dan diambil tanaman yang sehat tanpa ada yang terkena gejala penyakit pada setiap varietas tanaman jagung, untuk pengambilan sample dilakukan pada sore hari dengan menggunakan cangkul sebagai alat alternatif untuk mengambil sample beserta

tanahnya agar sampel yang akan digunakan masih dalam keadaan hidup dan segar. Varietas yang digunakan untuk eksplorasi terdiri dari 5 varietas yaitu 2 varietas komersil dan 3 varietas hibrida baru. Sampel komersil yang digunakan adalah jenis varietas P35 dan TF8016, sedangkan untuk varietas hibrida baru sampel yang digunakan ialah BMD57, BMD58 dan TF8016, untuk pengambilan sampel diambil pada bagian akar tanaman jagung untuk diisolasi.

### **3.6.3 Isolasi Jamur Endofit**

Metode yang digunakan untuk isolasi jamur endofit yaitu menggunakan metode pencucian, mencuci bagian akar tanaman jagung yang sehat agar steril sehingga diharapkan jamur yang akan tumbuh adalah jamur endofit. Kontaminasi dari jamur luar diharapkan tidak terjadi pada saat isolasi. Hal ini dikarenakan isolasi jamur endofit merupakan isolasi jamur yang berasal dari dalam sistem jaringan tumbuhan (Septia, 2012). Tahap isolasi dilakukan di *Laminar Air Flow Cabinet*. Tahapan awal isolasi yaitu menyiapkan sampel akar tanaman jagung yang sehat dan di lakukan pencucian dengan air mengalir hingga bersih dari tanah, kemudian di keringkan diatas tisu. Setiap sampel tanaman sehat dilakukan pengambilan sampel akar dengan memotong akar pada pangkal batang menggunakan gunting steril. Kemudian potongan akar pada pangkal batang diambil dengan pinset yang sudah disterilkan menggunakan bunsen dan dilakukan perendaman kedalam larutan NaOCL 2% (1 menit), alkohol 70% (1 menit). Setelah itu dibilas 2 kali dengan aquadest steril (1 menit) lalu akar dikeringkan diatas tisu steril. Setiap akar tanaman dipotong  $\pm 1$  cm dengan kondisi aseptis, kemudian hasil potongan diambil secara acak dan ditanam pada cawan petri berisi media PDA (d=9 cm). Selanjutnya dibungkus dengan plastik wrapping dan dilakukan pengamatan selama 7 hari. Kemudian pada aquadest bilasan terakhir di ambil 1 ml dan diisolasikan pada media PDA baru lainnya, perlakuan ini digunakan sebagai kontrol. Kontrol digunakan sebagai penentu dan memastikan jamur yang tumbuh dari sampel akar yang telah dicuci berasal dari jamur endofit atau bukan, sehingga hasil yang dicapai mendekati kebenaran.

### **3.6.4 Tahap Pemurnian**

Purifikasi (pemurnian) dilakukan pada setiap koloni jamur yang tumbuh pada media PDA ke media PDA baru dalam keadaan aseptis, yaitu dalam *LAFC*. Pemurnian dilakukan berdasarkan kenampakan morfologi secara makroskopis yang meliputi warna dan bentuk koloni jamur. Masing- masing mikroorganisme

tersebut diambil dengan jarum ose, kemudian ditumbuhkan kembali pada cawan petri yang berisi media PDA. Jika setelah dimurnikan jamur yang tumbuh masih bercampur dengan jamur lain, maka dilakukan pemurnian berulang kali sampai diperoleh jamur yang murni.

### **3.6.5 Pembuatan Preparat Jamur**

Tahapan pembuatan preparat jamur adalah menyiapkan object glass, cover glass, aquades steril dan tissue steril. Jamur yang telah diisolasi pada media PDA diambil dengan jarum ose dilekan ke object glass dan kemudian ditutup dengan menggunakan cover glass. Preparat diletakkan pada wadah yang telah diberi alas tissue steril lembab dan inkubasi selama 2-3 hari.

### **3.6.6 Pengamatan dan Identifikasi**

Pengamatan dilakukan secara makroskopis dan mikroskopis terhadap isolat jamur endofit yang telah dipurifikasi atau pemurnian kemudian hasilnya digunakan untuk identifikasi Gandjar *et al.* (1999) menyebutkan, pengamatan makroskopis meliputi warna dan permukaan koloni (granular; seperti tepung; menggunung; licin; ada atau tidaknya tetesan eksudat), garis-garis radial dari pusat koloni ke arah tepi koloni, dan lingkaran-lingkaran konsentris dalam cawan petri (konsentris atau tidak konsentris), dan pertumbuhan koloni (cm/hari) yang dilakukan setiap hari sampai koloni jamur mencapai diameter 9 cm dengan menggunakan penggaris.

Sedangkan pengamatan mikroskopis meliputi sekat hifa (bersekat atau tidak bersekat), pertumbuhan hifa (bercabang atau tidak bercabang), warna hifa (hialin, transparan atau gelap), ada tidaknya konidia, dan bentuk konidia (bulat, lonjong, berantai, atau tidak beraturan). Pengamatan mikroskopis dilakukan pada pengamatan hari terakhir (5-7 hari) dengan menggunakan mikroskop. Identifikasi dilakukan menggunakan buku identifikasi yaitu *Illustrated General of Imperfect Fungi* (Barnett and Hunter, 2006).

### **3.6.7 Analisis Data**

Data yang diperoleh dianalisis menggunakan analisis varian (uji F) pada taraf nyata 5% apabila dalam pengujian diperoleh pengaruh perlakuan beda nyata, maka pengujian dilanjutkan dengan (DMRT) pada taraf 5 %. Aplikasi yang digunakan dalam perhitungan yakni Microsoft Excel 2010.(DSTAT).