

### III. METODOLOGI

#### 3.1. Waktu dan Tempat

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi, Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, UIN Maulana Malik Ibrahim Malang dan Laboratorium Mikologi Universitas Brawijaya. Penelitian dilaksanakan pada bulan April 2014 sampai November 2014.

#### 3.2. Alat dan Bahan

##### 3.2.1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah cawan petri diameter 9 cm, gunting, pisau, pinset, meja *shaker*, penggaris, jarum ose, tissue steril, bunsen, plastik wrapping, plastik, aluminium foil, *cork borer*, *hand sprayer*, *autoclave*, *laminar air flow cabinet*, *object glass*, *cover glass*, tabung Erlenmeyer, mikroskop, timbangan, gelas ukur, kapas, botol kaca, kamera digital dan buku identifikasi jamur.

##### 3.2.2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun kacang hijau, jamur *Cercospora canescens*, Alkohol 70%, NaOCl 5%, *media Potato Dextrose Agar* (PDA), spirtus, dan aquades steril.

Penggunaan media Potato Dextrose Agar (PDA) dikarenakan media PDA bersifat selektif terhadap jamur, karbohidrat dan senyawa yang diambil dari kentang mendukung pertumbuhan jamur. Media buatan yang digunakan dalam isolasi jamur adalah *Potato Dextrose Agar* (PDA). Adapun bahan yang diperlukan dalam pembuatan PDA yaitu kentang (200 gr), dextrosa (gula) (20 gr), agar (20 gr), chloramphenicol (2 butir kapsul), dan aquades steril (1 liter). Kentang dan dextrosa merupakan sumber nutrisi utama untuk jamur, agar merupakan pematid dari media dan chloramphenicol berfungsi untuk mencegah kontaminasi dari bakteri (antibakteri).

### 3.3. Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksplorasi dan eksperimen dengan tahapan sebagai berikut:

1. Eksplorasi jamur endofit dari daun kacang hijau yang diambil dari lahan tanaman kacang hijau di BALITKABI. Hal ini dilakukan dengan pertimbangan bahwa di daerah tersebut merupakan sentra tanaman kacang hijau.
2. Menguji daya antagonis isolat jamur endofit yang diperoleh terhadap jamur *F. oxysporum* (penyebab layu Fusarium pada kacang hijau) pada media PDA. Dengan setiap perlakuan diulang tiga kali.

### 3.4. Pelaksanaan Penelitian

#### 3.4.1. Isolasi Jamur *F. oxysporum*

##### 3.4.1.1. Isolasi Jamur *F. oxysporum*

Isolasi jamur *F. oxysporum* pertama-tama dilakukan dengan cara mengambil sampel batang yang terkena layu Fusarium pada kacang hijau yang didapatkan dari lapang (sesuai dengan gejala yang telah didapatkan dari literatur). Isolasi dilakukan dengan cara memotong batang secara melintang dengan setengah bagian sakit dan setengah bagian sehat. Bagian tersebut dicuci pada air mengalir, NaOCl 5%, Alkohol 70%, Aquadest steril 2 kali masing-masing selama 15 detik. Kemudian potongan batang tersebut ditanam pada media PDA dan diinkubasi sampai patogen tumbuh pada media.

##### 3.4.1.2. Purifikasi dan Identifikasi

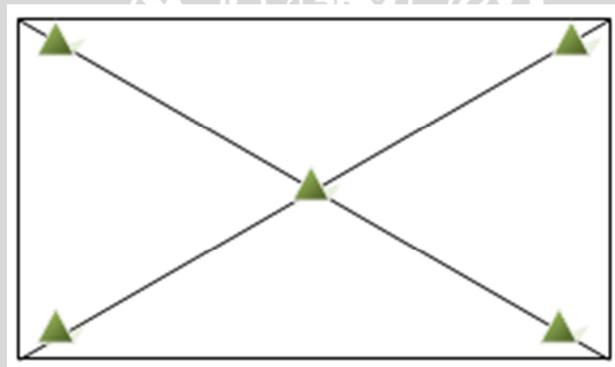
Setelah jamur tumbuh pada media PDA selanjutnya jamur dimurnikan (purifikasi) dengan cara mengambil jamur dalam biakan dan dipindahkan kedalam cawan petri lain yang berisi PDA baru sehingga diperoleh biakan murni jamur patogen. Jamur yang telah dimurnikan dipindahkan kepreparat untuk dilakukan identifikasi berdasarkan kunci determenasi menurut Barnett and Hunter tahun 1998.

Setelah diperoleh biakan murni kedua perbanyakkan jamur *F. oxysporum* pada media PDA maka dapat digunakan sebagai sumber inokulum untuk uji antagonis.

### 3.4.2. Eksplorasi Jamur Endofit

#### 3.4.2.1. Pengambilan Sampel Daun

Pengambilan sampel tanaman untuk proses isolasi jamur endofit yaitu dilakukan dengan metode diagonal dengan jumlah lima tanaman. Tanaman yang diambil daunnya yaitu dua tanaman pada bagian depan kebun, satu tanaman bagian tengah kebun, dan dua tanaman bagian belakang kebun. Setiap helai daun digunakan untuk isolasi jamur endofit. Setelah itu daun dimasukkan kedalam kantong plastik berukuran 1 Kg secara terpisah dan diberi label sesuai urutan pengambilan misalnya daun tanaman pertama.



Gambar 1. Pengambilan Sampel Jamur Endofit pada Lahan

Keterangan :

▲ → Tanaman kacang hijau yang akan diambil

□ → Lahan kacang hijau

#### 3.4.2.2. Isolasi Jamur Endofit

Isolasi jamur endofit pertama-tama dilakukan dengan cara mencuci daun tanaman kacang hijau yang didapatkan dari lapang pada air mengalir, selanjutnya disterilkan secara bertahap dengan cara direndam pada larutan alkohol 70% selama 1 menit, selanjutnya direndam pada larutan NaOCl 5%

selama 1 menit, langkah selanjutnya yaitu mencuci sampel daun tersebut dengan air steril (aquades) yang diulang sebanyak dua kali, lalu daun dikeringkan diatas tissue steril, kemudian sampel daun tanaman kacang hijau dipotong-potong dengan panjang  $\pm 1$  cm dengan menggunakan gunting steril. Potongan-potongan daun dtanam pada media PDA dan diinkubasi selama 2-4 hari.

#### **3.4.2.3. Purifikasi**

Setiap koloni jamur yang tumbuh pada media kemudian dilakukan purifikasi (pemurnian) pada media PDA baru. Pemurnian dilakukan pada setiap koloni jamur yang dianggap berbeda berdasarkan morfologi makroskopis yang meliputi warna dan bentuk koloni. Masing-masing mikroorganisme tersebut dipisahkan, diambil dengan menggunakan jarum ose, kemudian ditumbuhkan lagi pada cawan petri yang telah berisi PDA padat. Jika jamur yang tumbuh masih bercampur dengan jamur lain, dilakukan purifikasi kembali sampai diperoleh isolat biakan jamur yang murni.

#### **3.4.2.4. Pembuatan Preparat Jamur**

Jamur yang telah berhasil dimurnikan pada media PDA diambil dengan jarum ose kemudian diletakkan pada *object glass* setelah itu ditutup dengan *cover glass*. Selanjutnya letakkan preparat pada wadah yang telah dialasi tissue basah steril dan inkubasi selama 2-3 hari.

#### **3.4.2.5. Identifikasi**

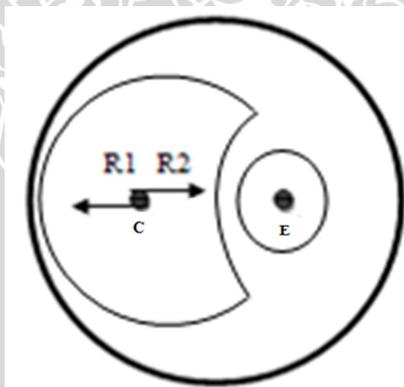
Mikroorganisme yang telah didapat dan dimurnikan (dipurifikasi) kemudian diidentifikasi berdasarkan panduan Barnett dan Hunter (1998) dalam bukunya *Illustrated Genere of Imperfect Fungi*. Pengamatan makroskopis meliputi warna, koloni, bentuk pertumbuhan dalam cawan petri (konsentris atau tidak konsentris), warna balik koloni (*reverse color*) dan pertumbuhan koloni (cm/hari). Sedangkan pengamatan secara mikroskopis meliputi ada tidaknya septa (sekat) pada hifa, pertumbuhan hifa (bercabang atau tidak bercabang), warna hifa (gelap atau hialin transparan), warna konidia (gelap atau hialin

transparan), ada tidaknya konidia dan bentuk konidia (bulat, lonjong, berantai atau tidak beraturan).

### 3.4.3. Uji Antagonis dengan *F. oxysporum*

Pengujian jamur antagonis dilakukan secara in-vitro dengan cara menumbuhkan isolat jamur patogen *F. oxysporum* dengan isolat jamur endofit secara berhadapan dengan jarak 3 cm pada cawan petri berdiameter 9 cm yang telah berisi media PDA. Tujuan dari percobaan pada tahap ini adalah untuk melihat adanya penghambatan serta besarnya hambatan yang dilakukan jamur endofit terhadap pertumbuhan jamur *F. oxysporum* pada media PDA.

Inokulasi jamur endofit dan jamur patogen *F. oxysporum* dilakukan bersamaan, biakan uji antagonis diinkubasi pada suhu kamar (28-30°C) sampai dengan jamur patogen tumbuh memenuhi cawan petri. Jumlah perlakuan yang dilakukan uji antagonis sebanyak jamur endofit yang ditemukan dengan ulangan sebanyak tiga kali.



Gambar 2. Cara pengukuran penghambatan jamur

Keterangan :

R1 = Jari-jari koloni jamur *F. oxysporum* yang tumbuh kearah berlawanan dengan tempat jamur endofit

R2 = Jari-jari koloni jamur *F. oxysporum* yang tumbuh ke arah jamur endofit.

E = Jamur Endofit

C = Jamur patogen *F. oxysporum*

Penghambatan pertumbuhan jamur *F. oxysporum* oleh jamur endofit dihitung berdasarkan rumus yang diadaptasikan dari rumus yang dikemukakan oleh Fokkema (1973 dalam Skidmore, 1976) yaitu:

$$I = \frac{R1 - R2}{R1} \times 100\%$$

Keterangan:

I = persentase hambatan,

R1 = jari-jari koloni jamur *F. oxysporum* yang tumbuh kearah berlawanan dengan tempat jamur endofit, dan

R2 = jari-jari koloni jamur *F. oxysporum* yang tumbuh ke arah jamur endofit.

### 3.5. Analisis Data

Metode analisis yang digunakan pada perlakuan secara in vitro adalah analisis ragam (Anova) dan apabila terdapat perbedaan antar perlakuan, akan dilanjutkan dengan menggunakan uji Duncan.

