

### 3. METODOLOGI PENELITIAN

#### 3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian dilaksanakan mulai bulan Januari 2016 hingga Februari 2017 di Laboratorium Mikologi Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya Malang.

#### 3.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: mikroskop (Olympus BX 41), kompor listrik (Oxone), autoklaf (Allmerican), *orbital shaker* (Protech model 722), timbangan (Ohaus), tabung reaksi (Iwaki), *Petridish* (Duran), botol media (Duran), gelas ukur (Pyrex), tabung *Erlenmeyer* (Duran), *beaker glass* (Pyrex), mikropipet (Vitlab), *object glass*, *cover glass* 18 x 18 mm, pipet tetes, tip, jarum ose, stik L, rak tabung reaksi, pinset, spatula, *bunsen*, korek api, *handsprayer*, *Laminar Air Flow Cabinet* (LAFC), nampan plastik, panci, pisau, jarum suntik ukuran 3cc, gunting, penggaris, bolpoin, kamera HP (OPPO A37f) dan kamera Sony Smart Lens DSC-QX10.

Bahan yang digunakan meliputi: buah jeruk keprok sehat, buah jeruk keprok bergejala antraknosa, isolat *C. gloeosporioides*, umbi kentang, *dextrose*, antibiotik (*cloramphenicol*), agar, ekstrak *yeast*, ekstrak *malt*, *pepton*, glukosa, aquades, alkohol 70% dan 96%, NaOCl 5,3%, Tween 80, spirtus, air, kertas label, kantong plastik (Petromax), kapas, aluminium foil, plastik *wrapping*, dan *tissue*.

#### 3.3 Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini ada dua, yaitu metode eksplorasi dan eksperimen. Kedua metode tersebut dilakukan secara bertahap, yang pertama ialah metode eksplorasi yaitu dengan mengisolasi khamir dari buah jeruk keprok dan selanjutnya diberi perlakuan suhu 40°C. Isolasi dengan perlakuan suhu dilakukan untuk memperoleh isolat dan mengetahui keragaman khamir termotoleran pada suhu 40°C.

Kedua ialah metode eksperimen yang dilaksanakan dengan menguji daya efikasi isolat khamir yang didapatkan sebagai agens antagonis patogen *C. gloeosporioides* secara *in vitro* pada media PDA dan *in vivo* pada buah jeruk keprok sehat. Uji daya efikasi



disusun menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL), terdiri dari tiga perlakuan yaitu tiga jenis khamir yang diulang sebanyak tujuh kali.

### 3.4 Persiapan Penelitian

#### 3.4.1 Pembuatan Media YMA, YMB dan PDA

Media *Yeast Malt Agar* (YMA) digunakan sebagai media pembiakan khamir.

Media ini termasuk media selektif untuk isolasi mikroorganisme dari jenis khamir.

Diperlukan ekstrak *yeast* 3 gram, ekstrak *malt* 3 g, pepton 5 g, dextrose 10 g, agar 20 g, klorampenikol 1 kapsul, dan air aquades 1 L untuk membuat 1000 mL media YMA.

Cara pembuatan media dilakukan dengan mendidihkan air akuades bersamaan dengan semua bahan kecuali agar dan klorampenikol. Setelah larutan mendidih, agar dimasukkan dan diaduk hingga merata. Kemudian klorampenikol dimasukkan sebagai tahap terakhir pencampuran larutan media. Setelah tercampur secara homogen, larutan media dimasukkan ke dalam botol media untuk selanjutnya disterilisasi menggunakan *autoclave* selama 20 menit dengan suhu 121°C (Sastrahidayat, 2014).

Media *Yeast Malt Extract* (YMB) digunakan sebagai media penyimpanan khamir (*stock culture*). Cara pembuatan media ini sama dengan cara pembuatan media YMA, berbeda pada komposisi bahannya. Bahan yang digunakan untuk membuat 1 L YMB antara lain 3 g ekstrak *yeast*, 3 g ekstrak *malt*, 5 g pepton, 10 g glukosa, dan 1 L akuades (Widiastutik dan Alami, 2014).

Media *Photatos Dextrose Agar* (PDA) digunakan untuk pembiakan jamur patogen dan uji antagonis antara isolat khamir dengan jamur patogen. Pembuatan 1000 mL PDA diperlukan kentang 250 g, dextrose 20 g, agar 20 g, klorampenikol 2 butir (250 mg), akuades 1 L. Membuat media PDA, kentang dikupas dan dipotong dadu dengan volume kurang lebih 1 cm<sup>3</sup> kemudian dicuci hingga bersih. Selanjutnya kentang direbus dalam 1 L air akuades hingga kentang lunak selama kurang lebih 1 jam. Setelah lunak, kentang ditiriskan dan diambil air hasil rebusan. Dextrose dimasukkan ke dalam sari kentang kemudian dididihkan. Setelah mendidih agar dimasukkan dalam larutan dan diaduk hingga larut, kemudian klorampenikol dimasukkan. Botol media ditutup menggunakan kapas, dilapisi menggunakan aluminium foil selanjutnya dibalut dengan



plastik wrap. Media dalam botol disterilkan menggunakan *autoclave* selama 20 menit dengan suhu 121°C (Sastrahidayat, 2014).

### 3.4.2 Isolasi Patogen *C. gloeosporioides*

Patogen (jamur *C. gloeosporioides*) diisolasi dari buah jeruk keprok dengan gejala penyakit antraknosa yang didapat dari pasar buah (Pasar Besar). Isolasi patogen penyakit dilakukan dengan memotong bagian buah bergejala kurang lebih 1 cm ( $\frac{1}{2}$  bagian sehat  $\frac{1}{2}$  bagian sakit). Potongan tersebut disterilisasi dengan cara direndam dalam NaOCl 5,3%, kemudian direndam kembali dalam alkohol 70% dan dibilas menggunakan aquades steril sebanyak 2 kali. Setelah disterilisasi, potongan tersebut dikeringkan di atas *tissue* steril. Setelah kering, potongan buah steril ditanam pada media PDA dalam cawan petri dan diinkubasi selama 2-4 hari (Pratama, 2007).

### 3.4.3 Uji Postulat Koch

Uji ini bertujuan untuk mengidentifikasi atau memastikan bahwa jamur patogen yang telah diisolasi dari tanaman bergejala merupakan patogen yang dikehendaki. Tahapan uji Postulat Koch yaitu, jamur *C. gloeosporioides* yang sudah diisolasi dari tanaman bergejala diuji patogenesitasnya atau diinokulasi pada buah jeruk keprok yang sehat dan harus menghasilkan gejala penyakit sama seperti gejala jeruk keprok yang terserang antraknosa. Inokulasi dilakukan dengan cara melukai buah jeruk keprok sehat (menusuk pada permukaan kulit hingga daging buah berulang kali dengan menggunakan jarum steril). Hasil tusukan diolesi dengan suspensi jamur yang diduga *C. gloeosporioides*, kemudian diinkubasi pada wadah steril dan diamati hingga muncul gejala.

Buah jeruk keprok yang telah memunculkan gejala antraknosa diisolasi lagi ke media PDA. Setelah diperoleh biakan murni jamur *C. gloeosporioides*, dilakukan perbanyakkan pada media PDA di dalam cawan petri. Biakan murni jamur patogen *C. gloeosporioides* digunakan sebagai sumber inokulum uji antagonis selanjutnya (Pratama, 2007).



### 3.5 Pelaksanaan Penelitian

#### 3.5.1 Eksplorasi Khamir

##### 1. Sampel Buah Jeruk

Sampel buah jeruk keprok didapatkan dari pasar buah (Pasar Besar), dipilih buah jeruk yang telah masak dan sehat. Menurut Isdiantoni (2013) buah jeruk keprok yang telah masak memiliki ciri-ciri kulit buah yang berwarna kekuningan (kulit buah berubah warna dari hijau menjadi kekuningan), jika dipegang bagian bawahnya tidak terlalu keras dan tidak berbunyi nyaring apabila dijentik menggunakan jari. Pada buah yang matang terjadi perubahan komponen nutrisi yang mendukung pertumbuhan mikroba termasuk yeast. Rumahlewang (2012) mengatakan bahwa pada buah mentah, mikroba tidak dapat berkembang cepat akibat ketersediaan nutrisi yang kurang.

##### 2. Isolasi khamir

Isolasi khamir dari buah jeruk keprok sehat yang telah masak dilakukan dengan metode pencucian. Buah dipotong mulai dari kulit hingga daging buah dan ditimbang sebanyak 10 g, kemudian dimasukkan ke dalam *erlenmeyer* berisi aquades steril sebanyak 90 ml dan digojok menggunakan *rotary shaker* dengan kecepatan 120 rpm selama 24 jam. Selanjutnya dilakukan pengenceran bertingkat hingga pengenceran  $10^{-5}$  dan diambil suspensi sebanyak 50  $\mu$ l pada konsentrasi  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  dan  $10^{-5}$ . Suspensi tersebut diratakan pada media *Yeast Malt Agar* (YMA) dan diinkubasi selama kurang lebih 24 jam (Assis dan Mariano, 1999).

##### 3. Perlakuan suhu 40°C untuk memperoleh khamir termotoleran

Isolat khamir hasil isolasi diberi perlakuan suhu dengan tujuan untuk memperoleh khamir termotoleran. Khamir diseleksi pada suhu 40°C sehingga termasuk dalam kategori mikroba mesofil. Isolat khamir dimasukkan ke dalam oven pada suhu 40°C selama 90 menit. Perlakuan disesuaikan dengan kondisi suhu minimum mikroba termofilik dan waktu perkembangan khamir pada media buatan (Kardos *et al.*, 2011; Bergman, 2001).



#### 4. Purifikasi khamir

Purifikasi dilakukan untuk mendapatkan isolat murni (koloni tunggal).

Purifikasi dilakukan dengan memilih koloni yang tumbuh dominan dan yang memiliki karakteristik morfologi koloni berbeda dari yang lainnya. Kemudian dilakukan inokulasi pada media YMA baru menggunakan metode *strike plate*.

Setelah diperoleh koloni tunggal, isolat diambil dan disimpan dalam media cair sebagai *stock culture* (Widiastutik dan Alami, 2014).

#### 5. Identifikasi khamir hingga tingkat Genus

Khamir diidentifikasi berdasarkan karakteristik morfologi makroskopis dan mikroskopis.

##### a. Pengamatan Morfologi Makroskopis

Pengamatan morfologi khamir secara makroskopis merupakan pengamatan yang ditekankan pada morfologi koloni khamir pada saat isolasi dan purifikasi. Faktor yang diamati meliputi bentuk, tekstur, warna, permukaan, elevasi dan tepi *culture* (Widiastutik dan Alami, 2014).

##### b. Pengamatan Morfologi Mikroskopis

Isolat khamir diidentifikasi sampai tingkat genus dengan mengacu pada buku panduan identifikasi "*The Yeasts a Taxonomic Study*" (Kurtzman dan Fell, 1998). Pengamatan morfologi khamir secara mikroskopis merupakan pengamatan terhadap sel khamir yang dilihat di bawah mikroskop. Faktor yang diamati meliputi bentuk sel, ukuran, *budding* (pertunasan), ada tidaknya hifa atau pseudohifa, dan tipe spora (Widiastutik dan Alami, 2014). Preparasi untuk pengamatan mikroskopis dilakukan dengan menanam koloni pada preparat. Koloni tunggal diletakkan pada kaca preparat mikroskop menggunakan jarum ose dan ditutup dengan cara ditekan menggunakan *object glass*, lalu diputar 180° dan diinkubasi selama 24 jam dalam kondisi lembab serta aseptis. Koloni pada kaca preparat siap diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 400x.



### 3.5.2 Uji Efikasi Khamir Termotoleran sebagai Agens Pengendali Hayati Patogen *C. gloeosporioides*

Uji efikasi dilakukan dengan dua tahap, yaitu uji antagonis khamir terhadap patogen secara *in vitro* dan dilanjutkan dengan uji antagonis khamir terhadap patogen secara *in vivo*.

a. Uji Antagonis Khamir Termotoleran terhadap Patogen *C. gloeosporioides* secara *In-vitro* pada Media PDA

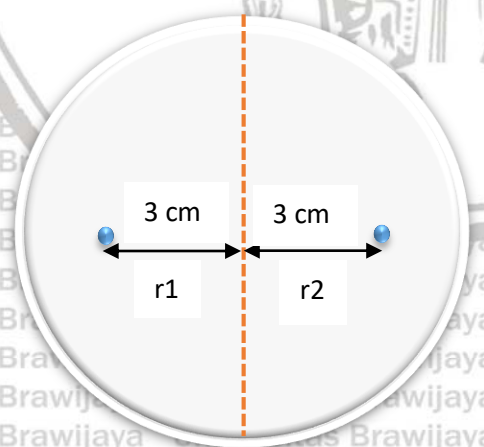
Isolat khamir digoreskan tepat di tengah cawan petri sebanyak satu lup inokulasi. Biakan murni patogen *C. gloeosporioides* diambil menggunakan bor gabus dan diletakkan di sisi kanan dan kiri goresan khamir dengan jarak 3 cm. Pengamatan dilakukan selama 6 hari terhadap lebar zona hambat yang dihasilkan. Pada perlakuan kontrol patogen *C. gloeosporioides* ditumbuhkan tanpa khamir (Sugipriatini, 2009). Persentase tingkat hambatan terhadap patogen dihitung dengan rumus mengikuti Hadiwiyono (1999):

$$THR = \frac{dk-dp}{dk} \times 100\%$$

THR = Persentase tingkat hambatan relatif terhadap pertumbuhan patogen

dk = Jumlah jari-jari koloni patogen tanpa perlakuan khamir (kontrol)

dp = Jumlah jari-jari koloni patogen yang diberi perlakuan khamir



#### Keterangan:

----- = Isolat Khamir

● = Isolat Patogen

$r1 + r2$  = Jumlah jari-jari koloni



- b. Uji Antagonis Khamir Termotoleran terhadap Patogen *C. gloeosporioides* secara *In-vivo* pada Buah Jeruk Keprok

Suspensi patogen *C. gloeosporioides* dibuat dengan kerapatan  $10^6$  spora/ml. Kemudian membuat suspensi khamir dengan kerapatan  $10^7$  sel/ml. Buah yang sehat disterilkan dengan aquades steril dan disemprot alkohol 96% lalu dibiarkan kering. Kemudian disemprot dengan suspensi khamir yang telah ditambahkan tween 80 sebanyak 0,006%. Selanjutnya suspensi *C. gloeosporioides* diinjeksikan pada buah jeruk keprok (3 titik inokulasi) menggunakan jarum suntik steril (sedalam  $\pm 1$ mm). Metode injeksi yang diaplikasikan pada buah, berdasar pada percobaan pendahuluan yang telah dilakukan peneliti sebelumnya. Pada percobaan pendahuluan, peneliti menggunakan metode tetes dan metode injeksi dalam menginokulasikan patogen. Metode injeksi menunjukkan keberhasilan proses inokulasi dengan munculnya gejala yang diinginkan, sedangkan metode tetes tidak memunculkan gejala, sehingga digunakan metode injeksi pada penelitian. Digunakan 3 ml suspensi *C. gloeosporioides* untuk 3 titik inokulasi pada buah dikali tujuh ulangan. Pengamatan dilakukan terhadap masa inkubasi penyakit dan kejadian penyakit pada buah. Masa inkubasi penyakit dihitung ketika buah mulai menunjukkan gejala penyakit pertama kali. Persentase kejadian penyakit pada buah dihitung pada 6 HSI menggunakan rumus mengikuti Korsten dan Demoz (2006):

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

KP = Kejadian Penyakit

n = Jumlah titik inokulasi yang menunjukkan gejala penyakit

N = Jumlah titik inokulasi yang diamati



### 3.6 Analisis Data

Data yang diperoleh dari uji efikasi khamir dengan *C. gloeosporioides* dianalisis menggunakan analisis sidik ragam (ANOVA) dan dilanjutkan dengan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) pada taraf 5% apabila terdapat beda nyata.

