

### III. BAHAN DAN METODE PENELITIAN

#### 3.1 Waktu dan Tempat

Waktu pelaksanaan penelitian pada bulan Februari sampai Agustus 2013. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Penyakit Tanaman bagian Mikologi, Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian, Universitas Brawijaya, Malang. Tempat pengambilan sampel akar kangkung darat dilakukan di Kelurahan Cemorokandang, Kecamatan Kedungkandang, Kota Malang.

#### 3.2 Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksplorasi dan komparasi. Eksplorasi jamur endofit di ambil dari akar tanaman kangkung sehat pada lahan budidaya kangkung darat dengan sistem pertanian organik dan konvensional. Hasil eksplorasi dibandingkan dengan menggunakan metode komparasi untuk mengetahui perbedaan keanekaragaman jamur endofit pada akar kangkung darat dengan sistem pertanian organik dan konvensional.

#### 3.4 Pelaksanaan Penelitian

##### 3.4.1 Pembuatan Media PDA

Media buatan yang digunakan dalam isolasi jamur adalah PDA (*Potato Dextrose Agar*). Penggunaan media PDA dikarenakan media PDA bersifat selektif terhadap jamur, karbohidrat dan senyawa yang diambil dari kentang mendukung akan pertumbuhan jamur. Alat yang diperlukan dalam pembuatan media antara lain pisau, timbangan, *autoclave*, kompor listrik, *beaker glass*, saringan, panci dan botol media. Bahan-bahan yang diperlukan dalam pembuatan PDA antara lain kentang, agar, *dextrose* (gula), aquades dan *chloramphenicol*. Kentang dan *dextrose* merupakan sumber nutrisi utama untuk jamur, *chloramphenicol* digunakan untuk mencegah kontaminasi dari bakteri (antibakteri) dan agar digunakan sebagai pematat dari media.

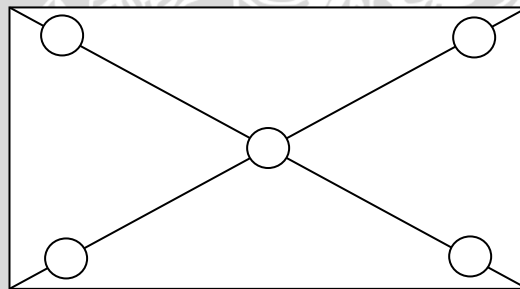
Pembuatan media PDA untuk 1000 ml dilakukan dengan mencuci dan mengupas kentang serta menimbang 200 g. Kemudian direbus dengan aquades steril 800 ml. Setelah mendidih, saring dan ambil ekstrak kentang. Larutkan Agar 20 g, *dextrose* 20 g dengan aquadest steril masing-masing 100 ml dan tambahkan

*chlorampenicol*. Kemudian campurkan dengan ekstrak kentang dan direbus kembali hingga mendidih. Media buatan tersebut diisikan ke dalam botol media selanjutnya ditutup dengan kapas dan *aluminium foil*. Kemudian botol media disterilkan menggunakan *autoclave* pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  selama 25 menit (Gambar 70).

### 3.4.2 Eksplorasi Jamur Endofit

#### 3.4.3.1 Pengambilan sampel akar tanaman kangkung darat

Pengambilan sampel tanaman sehat dilakukan pada lahan dengan sistem pertanian organik dan konvensional. Pengambilan sampel tanaman kangkung darat dilakukan 2 minggu sekali yaitu 14, 28, dan 42 hst. Pengambilan sampel tanaman menggunakan metode sistematis (*Systematic sampling*), yaitu pada garis diagonal tanaman, sehingga diperoleh 5 tanaman sampel (Gambar 1). Pengambilan sampel tanaman sehat dilakukan dengan memasukkan sampel tanaman dari lahan pada plastik kemudian di isolasi di laboratorium (Gambar 4).



**Gambar 1.** Ilustrasi Petak Pengambilan Sampel Tanaman

Keterangan:

○ : tempat pengambilan sampel tanaman

#### 3.4.3.2 Isolasi Jamur Endofit

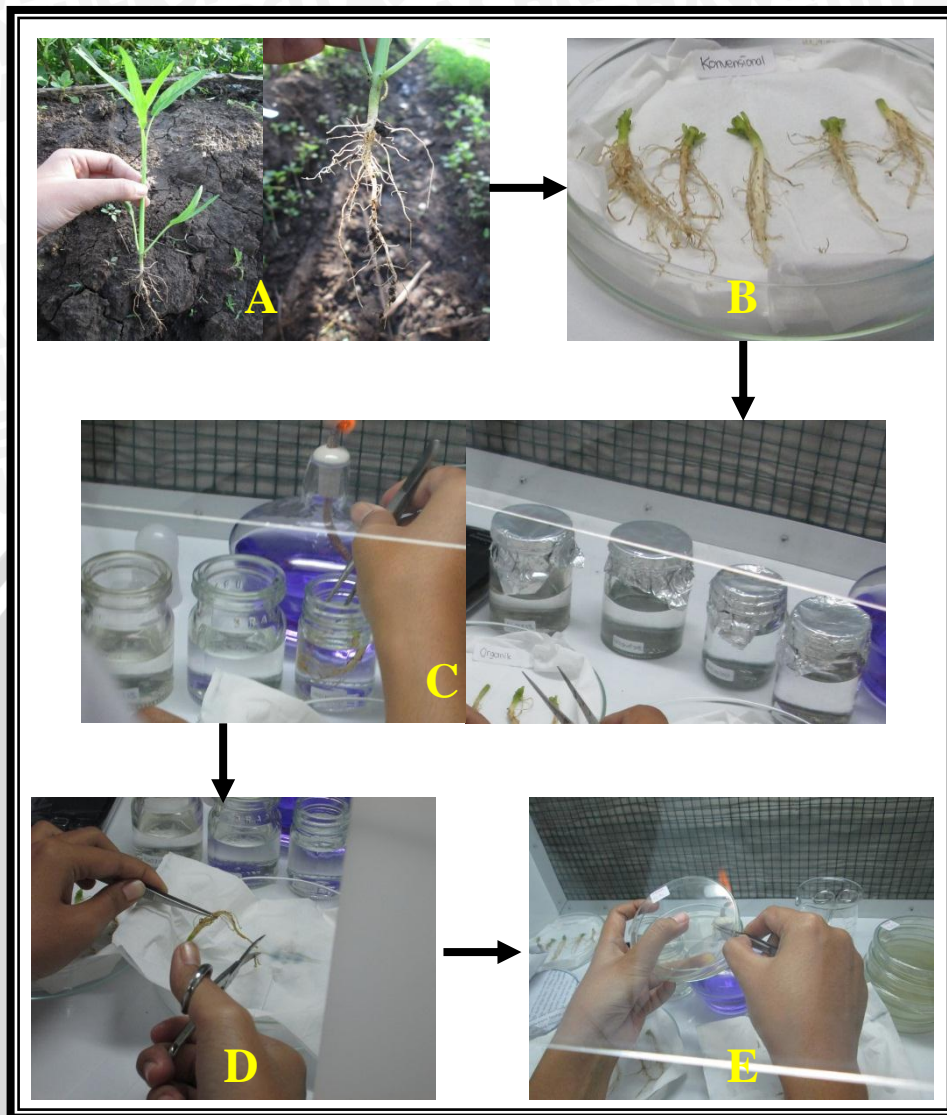
Kontaminasi dari jamur luar diharapkan tidak terjadi pada saat isolasi. Hal ini dikarenakan isolasi jamur endofit merupakan isolasi jamur yang berasal dari dalam sistem jaringan tumbuhan (Septia, 2012). Metode yang digunakan yaitu menggunakan metode pencucian, mencuci bagian permukaan sampel akar tanaman kangkung darat agar steril, sehingga diharapkan jamur yang tumbuh merupakan jamur yang hanya berasal dari dalam jaringan akar.

Tahap isolasi dilakukan di *laminar air flow cabinet*. Tahapan awal isolasi (Gambar 3) yaitu menyiapkan sampel akar tanaman kangkung darat yang sehat dan di lakukan pencucian dengan air mengalir hingga bersih dari tanah, kemudian di keringkan diatas *tissue*. Setiap sampel tanaman sehat dilakukan pengambilan sampel akar dengan memotong akar pada pangkal batang menggunakan gunting (Gambar 2). Kemudian potongan akar pada pangkal batang diambil dengan pinset yang sudah disterilkan menggunakan bunsen dan dilakukan perendaman kedalam larutan NaOCL 5% selama 1 menit, dilanjutkan dengan memasukkan kedalam alkohol 70% selama 1 menit. Setelah itu dibilas dengan aquadest steril selama 1 menit dan diulang 2 kali lalu akar dikeringkan diatas *tissue* steril.

Setiap akar tanaman dipotong  $\pm 1$  cm dengan kondisi aseptis, kemudian hasil potongan diambil secara acak dan ditanam pada cawan petri (d = 9 cm) yang berisi media PDA. Selanjutnya tepi cawan petri dipanaskan diatas Bunsen. Cawan petri dibungkus dengan plastik *wrapping* dan dilakukan pengamatan selama 7 hari. Kemudian pada aquadest bilasan terakhir di ambil 1 ml menggunakan pipet dan dituang atau di isolasikan 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.



**Gambar 2.** Pemotongan Akar pada Pangkal Batang (Sumber: dokumentasi peneliti)



**Gambar 3.** Proses Isolasi Jamur Endofit. A. Akar kangkung sehat B. Potongan akar pada pangkal batang C. Perendaman akar (NaOCl 5%, alkohol 70%, aquadest 2x) D. Pemotongan akar  $\pm$  1cm E. Penanaman pada media PDA (Sumber: dokumentasi peneliti)

### 3.4.3.3 Purifikasi

Purifikasi atau pemurnian dilakukan untuk memudahkan dalam pengidentifikasian suatu jamur. Koloni jamur yang tumbuh di cawan petri dilakukan purifikasi atau pemurnian. Pada setiap koloni jamur yang dianggap berbeda berdasarkan morfologi makroskopis yaitu bentuk dan warna koloni maka dilakukan pemurnian. Pemurnian dilakukan secara aseptis dengan mengambil dan memisahkan masing-masing mikroorganisme menggunakan jarum ose, selanjut-

nya di tumbuhkan lagi pada cawan petri yang berisi media PDA dan ditutup dengan plastik *wrapping*. Bila jamur yang ditumbuhkan terdapat jamur lain maka dilakukan pengulangan purifikasi sampai diperoleh isolat jamur biakan murni.

#### 3.4.3.4 Pembuatan Preparat Jamur

Pembuatan preparat jamur bertujuan untuk memudahkan identifikasi secara mikroskopis. Tahap pembuatan preparat yakni dengan menyiapkan *object glass*, *cover glass* dan tissue. Kemudian menyiapkan jarum ose untuk mengambil dan meletakkan koloni jamur yang telah diisolasi pada media PDA ke *object glass*, selanjutnya ditutup menggunakan *cover glass*. Preparat jamur diletakkan pada wadah yang telah terisi *tissue* steril lembab dan diinkubasi selama 2-3 hari.

#### 3.4.3.5 Pengamatan dan Identifikasi

Pengamatan dilakukan secara makroskopis dan mikroskopis terhadap isolat jamur endofit yang telah dipurifikasi kemudian hasilnya digunakan untuk identifikasi. Pengamatan makroskopis meliputi warna koloni, bentuk koloni (konsentris atau tidak konsentris), tekstur koloni dan pertumbuhan koloni (cm/hari). Pengamatan makroskopis dilakukan setiap hari sampai koloni jamur mencapai diameter 9 cm. Sedangkan pengamatan mikroskopis dilakukan pada pengamatan akhir (5-7 hari) menggunakan mikroskop meliputi hifa (bersekat, tidak bersekat), warna hifa (gelap atau hialin transparan), pertumbuhan hifa (bercabang atau tidak bercabang), ada tidaknya konidia, warna konidia (gelap atau hialin transparan) dan bentuk konidia (bulat, lonjong, berantai atau tidak beraturan).

Kemudian hasil pengamatan diidentifikasi berdasarkan ciri-ciri makroskopis (bentuk, perkembangan dan warna koloni) dan mikroskopis (bentuk misselium, konidiofor dan bentuk spora). Identifikasi dilakukan menggunakan buku identifikasi yaitu *Illustrated Genera of Imperfect Fungi* (Barnett and Hunter, 1960). Selanjutnya dilakukan dokumentasi terhadap hasil identifikasi jamur secara makroskopis dan mikroskopis.

### 3.5 Analisa Data

#### 3.5.1 Indeks Keanekaragaman (H') Shannon (Odum, 1993)

Indeks keanekaragaman digunakan untuk menghitung keanekaragaman jamur endofit akar kangkung darat pada lahan pertanian organik dan konvensional. Indeks keanekaragaman dihitung dengan menggunakan 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 = jumlah individu jenis ke i, N = jumlah total individu

Indeks keanekaragaman dihitung dengan kriteria menurut Brower dan Zar (1977) sebagai berikut (Tabel 1):

**Tabel 1.** Kriteria Indeks Keanekaragaman Shannon

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

#### 3.5.2 Indeks Keseragaman (E) (Ludwig and Reynold, 1988)

Indeks keseragaman digunakan untuk mengukur keseimbangan komunitas. Hal ini didasarkan pada ukuran kesamaan jumlah individu antar spesies dalam suatu komunitas. Indeks keseragaman (E) dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

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

Keterangan: E = indeks keseragaman, H' = indeks keanekaragaman Shannon, s = jumlah genus/spesies

Nilai indeks keseragaman berkisar antara 0-1 dengan kriteria menurut Brower dan Zar (1977) sebagai berikut (Tabel 2):

**Tabel 2.** Kriteria Indeks Keseragaman

Nilai indeks	Kondisi Komunitas
$0,00 < E < 0,50$	keseragaman kecil, komunitas tertekan
$0,50 < E < 0,75$	keseragaman sedang, komunitas labil
$0,75 < E < 1,00$	keseragaman tinggi, komunitas stabil

### 3.5.3 Indeks dominansi (C) (Odum, 1993)

Indeks dominansi jenis digunakan untuk mengetahui adanya dominansi jenis jamur endofit pada suatu komunitas. Indeks dominansi dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

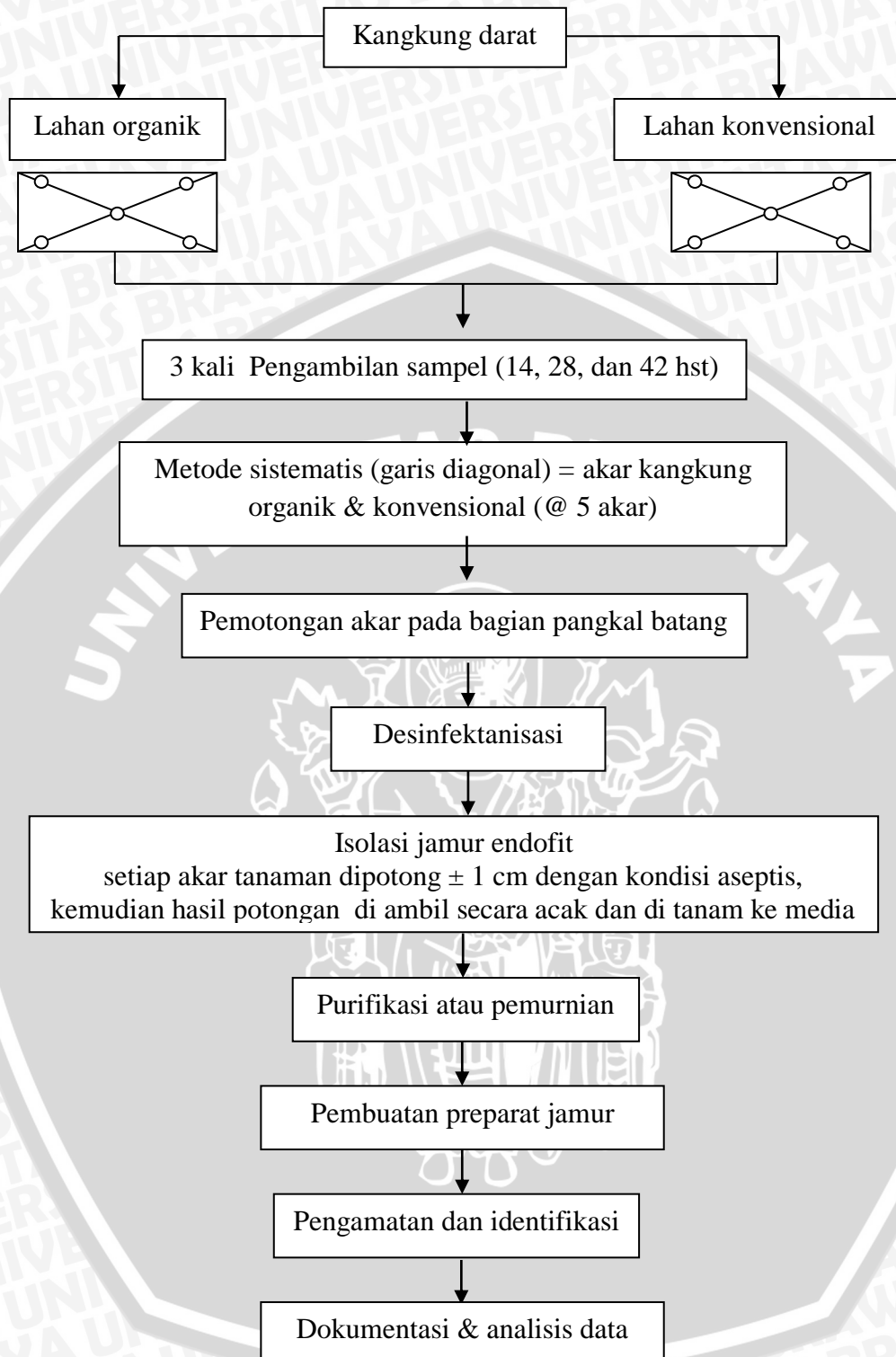
$$C = \sum_{i=1}^s \left( \frac{n_i}{N} \right)^2$$

Keterangan: C = indeks dominansi Simpson,  $n_i$  = jumlah individu jenis ke  $i$ ,  $N$  = jumlah total individu

Nilai indeks keseragaman berkisar antara 0-1 dengan kriteria menurut Hamsiah (2006) sebagai berikut (Tabel 3):

**Tabel 3.** Kriteria Indeks Dominansi

Nilai indeks	Kriteria
$0,00 < C \leq 0,50$	rendah
$0,50 < C \leq 0,75$	sedang
$0,75 < C \leq 1,00$	tinggi



Gambar 4. Diagram Alir Metode Kerja