

3. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Maret-Juli 2017 di Laboratorium Mikologi dan Laboratorium Toksikologi Pestisida jurusan Hama dan Penyakit Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya Malang. Isolat khamir didapatkan di Laboratorium Pengujian Mutu dan Keamanan Pangan Fakultas Teknologi Pertanian. Sampel cabai terserang antraknosa di dapatkan dipasar Belimbing Malang. Analisis N-Total dilaksanakan di UPT Layanan Analisa dan Pengukuran Jurusan Kimia FMIPA. Identifikasi mikroskopis uji antagonis dilaksanakan di Biosains Universitas Brawijaya.

3.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah baskom, nampan plastik, kompor listrik, aerator, panci, pisau, cutter, gunting, penggaris, botol selai, botol gelap, jarum inokulasi, spektrofotometer, pipet volume, bola hisap, *orbital shaker*, cawan petri, botol media, pH meter, termometer, gelas ukur, tabung erlenmeyer, *Beaker glass*, *object glass*, *cover glass*, pipet tetes, mikropipet, jarum ose, *cork borer*, pengaduk, timbangan, tabung reaksi, rak tabung reaksi, pinset spatula, bunsen, korek api, mikroskop, *hand sprayer*, autoklaf, *Laminar air flow cabinet* (LAFC) dan kamera digital.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah media *dextrose*, cabai, air kelapa, air leri, air limbah tahu, taoge, gula, isolat *Saccharomyces cerevisiae*, kentang, *yeast extract*, agar, glukosa, malt ekstrak, pepton, agar, buah cabai bergejala *Colletotrichum capsici* (antraknosa), NaOCL (Natrium hipoklorit) 2%, alkohol 70%, alkohol 96%, KMnO_4 1 %, akuades steril, kloroks, spiritus bakar, air, antibiotik (*cloramphenicol*), kertas label, kantong plastik, kapas, aluminium foil, plastik wrapping, tisu, ethanol 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 96%.

3.3 Metode Penelitian

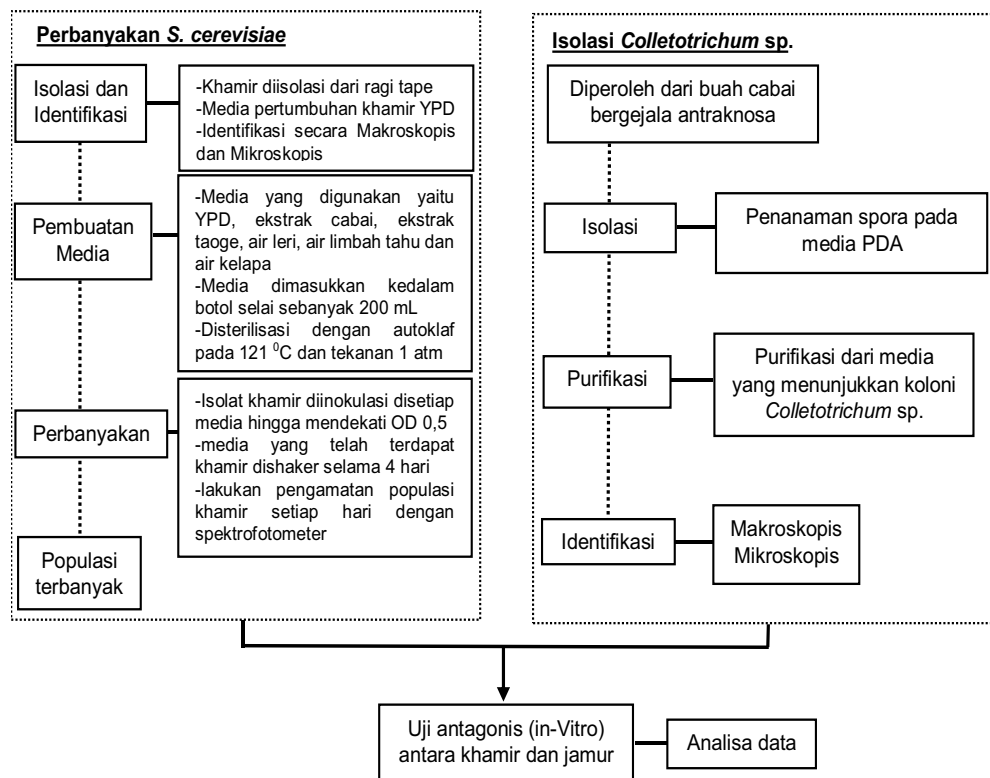
Penelitian dilaksanakan dengan menggunakan metode eksperimental yang terdiri dari 2 tahap yaitu:

- Tahap I adalah pembiakan khamir pada 6 media yaitu: YPD cair (kontrol), ekstrak cabai, ekstrak taoge, air leri, air limbah tahu dan air kelapa dengan 4 kali ulangan. Data-data yang diambil dalam tahap ini adalah jumlah populasi khamir, pH, dan suhu. Pengujian disusun menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) *one way* pada excel.

- Tahap II adalah pengujian antagonis hasil perbanyakkan khamir dengan *Colletotrichum* sp. secara *in vitro*. Pengujian disusun menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) *one way* diexcel dengan 4 perlakuan. Masing-masing perlakuan pada uji antagonis diulang sebanyak 5 kali sehingga didapatkan 20 unit percobaan. Data yang diambil adalah taraf hambatan relatif *Colletotrichum* sp. setelah isolat khamir diinokulasi.

3.4 Pelaksanaan Penelitian

Pelaksanaan penelitian terdiri dari sterilisasi alat, pembuatan media pembiakan khamir, pembuatan media antagonis, peremajaan khamir, pembiakan isolat khamir *S. cerevisiae*, dan uji antagonis khamir pada tanaman cabai secara *in vitro* dapat diikuti pada (Gambar 10).



Gambar 10. Kerangka operasional penelitian

3.4.1 Perbanyakkan khamir pada berbagai media

1. Sterilisasi alat

Sterilisasi alat dengan menggunakan sterilisasi basah, kering, dan sterilisasi menggunakan sinar UV. Sterilisasi basah dengan alkohol 70% dan kloroks sedangkan sterilisasi kering dengan autoklaf dan oven. Alat-alat yang

disterilisasi dengan menggunakan autoklaf adalah alat-alat yang tahan pada suhu 121 °C dan tekanan 1 atm selama 20 menit, sedangkan alat-alat yang tidak tahan panas disterilisasikan dengan menggunakan kloroks, alkohol 70 % dan aquades.

2. Khamir dan media pertumbuhan

Khamir yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Saccharomyces cerevisiae* yang diperoleh dari ragi tape. Khamir tersebut dipurifikasi pada media YPD. *Pre-culture* dilakukan pada media YPD cair (1 gr/ml yeast extract, 2 g/ml pepton, 2 gr/ml glukosa) untuk persiapan inokulum. Sedangkan pengamatan pertumbuhan secara makroskopis dan mikroskopis dilakukan pada media YPD agar.

3. Isolasi dan identifikasi khamir

Khamir diisolasi dari ragi tape yang didapat dari pasar Belimbing, Malang. Metode isolasi merujuk pada Muhibuddin *et al.*, (2016) sebanyak 10 gr ragi, ditempatkan dalam erlenmeyer berisi air akuades steril sebanyak 50 ml. Digojok selama 2 jam pada suhu kamar. Hasil gojokan dibuat seri pengenceran $10^5 - 10^6$. Sebanyak 0.1 ml suspensi hasil pengenceran ditumbuhkan secara taburan pada medium YPD (*Yeast Extract Peptone Dextrose*) yang mengandung 5 gr/l chloramphenicol. Biakan diinkubasi pada suhu kamar selama 3 hari. Isolat khamir dengan koloni yang tumbuh dipindah ke media YPD yang masih segar. Isolat khamir kemudian dimurnikan dengan memindahkan koloni berulang-ulang ke media agar YPD. Isolat yang telah murni lalu diidentifikasi.

Proses identifikasi mengacu pada metode Muhibuddin *et al.*, (2016) Pengamatan dilakukan secara makroskopik dan secara mikroskopis. Pengamatan makroskopik adalah berdasarkan kemunculan morfologi koloni setelah isolasi dan pемurnian termasuk bentuk, tekstur, warna, permukaan, elevasi, dan tepi koloni. Pengamatan mikroskopis pada khamir meliputi bentuk sel, ukuran, jenis tunas, ada tidaknya hifa atau pseudohyphae dan jenis spora yang diperoleh dari isolat.

4. Peremajaan khamir *S. cerevisiae*

Media yang digunakan untuk peremajaan isolat adalah media *Yeast Extract Peptone Dextrose* (YPD). Untuk pembuatan YPD agar yaitu dengan menggunakan yeast extract sebanyak 1 gr, pepton 2 gr, dekstrosa 10 gr, agar 1,5 gr, dan akuades 100 ml kemudian dicampur dan diaduk hingga rata sambil dipanaskan di atas kompos hingga mendidih, lalu masukkan ke dalam tabung erlenmeyer. Setelah semua bahan homogen, media disterilkan dengan autoklaf

pada suhu 121 °C. Kemudian media yang telah disterilkan dalam autoklaf dan masih cair dimasukkan ke dalam cawan petri hingga menjadi padat. Inokulasi isolat dilakukan dengan metode penggoresan berdasarkan Talukder *et al.*, (2016) Khamir digoreskan pada media agar menggunakan jarum ose lalu diinkubasi pada suhu 30 °C selama 48 jam.

5. Pembuatan media perbanyak khamir

Pembuatan media pertumbuhan khamir dengan menggunakan 6 bahan yaitu YPD, buah cabai, toage, air leri, air limbah tahu dan air kelapa. Untuk pembuatan media kontrol (YPD cair) yaitu *yeast extract* sebanyak 2 gr, pepton 4 gr, dekstrosa 20 gr, dan akuades 200 ml dicampur dan diaduk hingga rata sambil dipanaskan di atas kompos hingga mendidih, lalu masukkan ke dalam tabung erlenmeyer.

Untuk pembuatan media ekstrak cabai dan taoge, pertama-tama bahan dicuci dengan air sampai bersih, kemudian potong kecil-kecil bahan yang akan digunakan sekitar ± 2 cm. Cuci kembali bahan, timbang sebanyak 50 gr lalu masukkan ke dalam panci dan tambahkan akuades sebanyak 200 ml. Setelah itu rebus di atas kompor sampai pada kondisi setengah matang, lalu saring dan ambil ekstraknya. Selanjutnya sari bahan dimasukkan ke dalam botol selai.

Sedangkan untuk pembuatan media air leri, air limbah tahu dan air kelapa, yaitu dengan langsung memasukkan bahan sebanyak 200 ml ke dalam botol. Kemudian semua media yang telah dibuat, dimasukkan ke dalam botol selai 250 ml. Setelah itu semua media yang telah dimasukkan ke dalam botol selai disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121 °C dengan tekanan 1 atm untuk menghilangkan kontaminasi mikroorganisme yang tidak diinginkan.

6. Inokulasi isolat

S. cerevisiae yang telah tumbuh pada media agar YPD kemudian diinokulasi sebanyak satu ose pada media YPD cair dengan ketentuan *yeast extract* sebanyak 2 gr, pepton 4 gr, dekstrosa 20 gr, dan akuades 200 ml. Tahapan inokulasi mengacu pada metode suprayogi *et al.*, (2015). Inokulasi dilakukan dengan cara menyiapkan media cair yang telah disterilisasi sebanyak 200 mL, lalu inokulasi isolat yang diambil dari biakkan koloni tunggal menggunakan jarum ose ke dalam tabung reaksi kemudian diinkubasi selama 24 jam menggunakan *rotary shaker* dengan kecepatan 160 rpm. Setelah itu khamir yang telah tumbuh pada media YPD cair di samakan nilai ODnya sama dengan 1. Jika nilai *Optical Density*

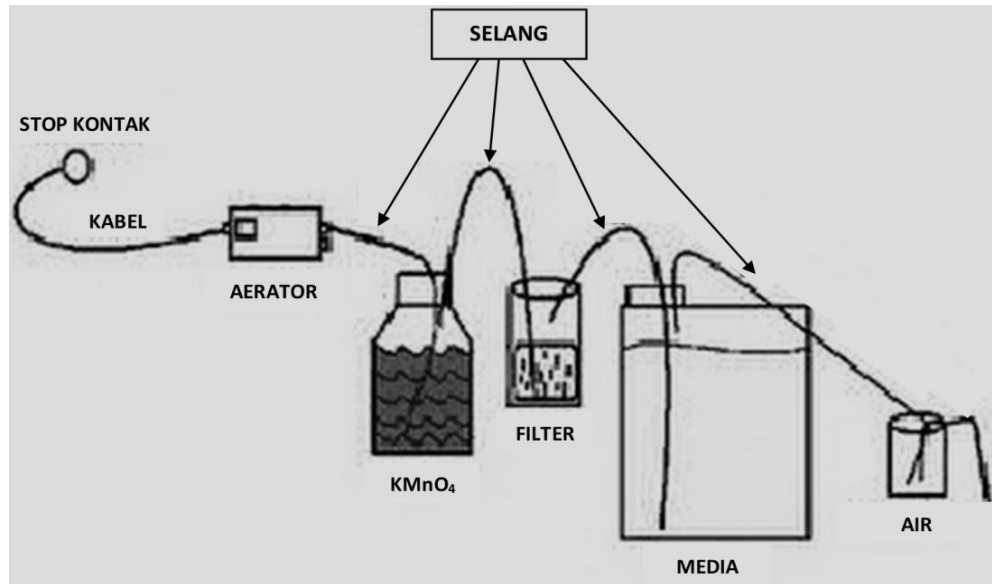
(OD) melebihi 1 maka akan dilakukan pengenceran hingga nilai ODnya mendekati 1. Setelah didapatkan nilai OD yang sama, selanjutnya inokulasi khamir ke setiap media perbanyakkan hingga media mendekati OD sama dengan 0,5.

7. Perbanyakkan khamir dengan metode shaker

Kultur murni *S. cerevisiae* diperoleh dari isolasi pada ragi tape. Uji pertumbuhan khamir pada media cair ditujukan untuk mekanisme pemanfaatan karbohidrat oleh khamir. Pengujian dilakukan dengan menumbuhkan khamir pada media yang telah dibuat sebelumnya dari YPD cair, ekstrak buah cabai, ekstrak toage, air leri, air limbah tahu, dan air kelapa. Perbanyakkan dilakukan dengan memasukkan media perbanyakkan ke dalam erlenmeyer, tutup menggunakan aluminium foil dan plastik wrapping. Kemudian diautoklaf pada suhu 121 °C dan tekanan 1 atm selama ± 20 menit, lalu inokulasi isolat *S. cerevisiae* yang telah dilakukan penyamaan nilai OD sebelumnya sebanyak 1 ml ke dalam botol selai yang berisi 200 ml media. tutup kembali erlenmeyer menggunakan aluminium foil dan plastik wrapping, setelah itu inkubasi media yang berisi khamir di atas *orbital shaker* selama 4 hari. Khamir oksidatif pada media ditandai dengan terbentuknya lapisan (film) atau pelikel pada permukaan media, sedangkan khamir fermentatif ditandai dengan terbentuknya lapisan (film) atau pelikel pada dasar media (Jumiyati *et al.*, 2012). Langkah kerja perbanyakkan khamir disajikan pada (Lampiran 4).

8. Perbanyakkan khamir dengan metode aerator

Pada perbanyakkan aerator difungsikan sebagai validasi dari uji perbanyakkan khamir dengan metode shaker. Pertama yang harus disiapkan yaitu media dengan kerapatan tertinggi pada perlakuan perbanyakkan shaker, KMnO_4 1%, fermentor yang telah diset. Media perbanyakkan dimasukkan kedalam erlenmeyer 1000 mL sebanyak 600 mL, udara dialiri dengan aerator melalui fermentor yang sudah diset, tunggu dan biarkan ± 15 menit, inokulum *S. cerevisiae* ditambahkan sebanyak 3 mL pada media perbanyakkan, kemudian udara dialiri kembali dan diamati selama 4 hari (Gambar 10).



Gambar 11. Perbanyakkan metode aerator (Fardiaz, 1992)

3.4.2 Uji antagonis khamir

1. Pembuatan media PDA

Media yang digunakan untuk uji antagonis menggunakan media *Potato Dextrose Agar* (PDA). Media PDA ialah media yang secara umum sering digunakan untuk isolasi patogen dan agens hayati. Dalam pembuatan 1000 ml PDA diperlukan: kentang 250 gr; *dextrose* 20 gr; agar 20 gr; klorampenikol 2 butir (250 mg); akuades 1 L. Untuk membuat media PDA, kentang dikupas dan dipotong dadu dengan volume kurang lebih 1 cm³ kemudian dicuci hingga bersih. Selanjutnya kentang direbus dalam 1 L 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 di-didihkan. Setelah mendidih agar dimasukkan dalam larutan dan 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 autoklaf selama 20 menit dengan suhu 120 °C (Sastrahidayat, 2011).

2. Isolasi dan identifikasi patogen *Colletotrichum* sp.

Patogen *Colletotrichum* sp. diisolasi dari permukaan buah cabai yang menunjukkan gejala penyakit antraknosa yang diperoleh dilapang. Metode isolasi jamur merujuk pada Zuhria *et al.*, (2016) buah dicuci dengan air steril, kemudian dipotong ukuran 1 cm dengan setengah bagian sehat dan setengah bagian sakit,

selanjutnya direndam dalam NaOCL 1%, dalam alkohol 70% dalam aquades steril, masing-masing selama 1 menit, dan dikering anginkan pada tisu, kemudian ditanam pada media PDA secara aseptik. Selanjutnya isolat diinkubasi selama 5-7 hari pada suhu ruang. Setelah dilakukan inkubasi, Selanjutnya pemurnian dilakukan dengan mengambil kultur dan dibiakkan lagi dalam media PDA baru hingga menjadi kultur murni.

Setelah dilakukan inkubasi, Selanjutnya pemurnian dilakukan dengan mengambil kultur dan dibiakkan lagi dalam media PDA baru hingga menjadi kultur murni. Cara melakukan purifikasi mengacu pada metode Shofiana *et al.*, (2015) yaitu jamur yang telah diisolasi diambil dan dipisahkan kedalam media PDA baru dengan menggunakan jarum ose. Setelah didapatkan isolat murni, selanjutnya jamur diamati secara makroskopis dan mikroskopis.

Identifikasi secara makroskopis dengan mengamati pertumbuhan koloni jamur pada cawan petri, warna koloni, tekstur koloni, pola sebaran dan ada tidaknya lingkaran konsentris. Identifikasi juga dilakukan secara mikroskopis sampai klasifikasi tingkat genus. Sebelum melakukan pengamatan secara mikroskopis perlu dilakukan pembuatan preparat patogen yang dilakukan dengan cara meneteskan preparat dengan sedikit aquades steril, kemudian tempelkan solasi pada patogen agar konidia jamur menempel pada solasi, Selanjutnya tempelkan solasi pada preparat yang telah ditetesi aquades steril. Pengamatan morfologi dilakukan dengan bantuan mikroskop cahaya yang kemudian membandingkannya dengan buku kunci identifikasi jamur.

3. Uji Antagonis *S. cerevisiae* dengan jamur *Colletotrichum* sp.

Uji antagonis isolat khamir *S. cerevisiae* dengan *Colletotrichum* sp. dilakukan secara in-vitro pada media PDA. Media yang digunakan untuk pengujian ini mengacu pada Nurlala *et al.*, (2016) jamur patogen dan khamir ditumbuhkan pada media PDA(40 g/L PDA powder, 1 L aquades). Khamir yang diujikan yaitu *S. cerevisiae* hasil perbanyakan pada berbagai media. Uji antagonis isolat khamir dengan jamur *Colletotrichum* sp. ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 4 perlakuan yang diulang sebanyak 5 kali. Metode pengujian antagonisme khamir secara *in vitro* mengacu pada Shofiana *et al.*, (2015) yang dimodifikasi. Dimana terdapat tiga perlakuan yaitu khamir dan patogen diinokulasikan pada waktu yang sama (P1), khamir diinokulasi 3 HSI (hari setelah inokulasi) patogen (P2), dan khamir diinokulasi 6 HSI patogen (P3).

Tabel 1. Perlakuan uji antagonis *S. cerevisiae* terhadap *Colletotrichum* sp.

Perlakuan	Keterangan
Kontrol	Tanpa Khamir
P1	Patogen 0 HSI + Khamir 0 HSI
P2	Patogen 0 HSI + Khamir 3 HSI
P3	Patogen 0 HSI + Khamir 6 HSI

Perlakuan diulang sebanyak 5 kali sehingga didapatkan 20 unit percobaan antagonis terhadap *Colletotrichum* sp.. Pengujian isolat khamir yang diperoleh dilakukan dengan cara menggoreskan khamir pada media PDA tepat ditengah petridis berdiameter 9 cm dengan posisi tegak lurus sebanyak 1 lup inokulasi. Kemudian biakan *Colletotrichum* sp. yang didapat diambil dengan cork borer dan diletakkan pada sisi kanan dan kiri goresan khamir dengan jarak \pm 3 cm kemudian diinkubasi pada suhu kamar dan diamati selama 9 hari dengan cara mengukur lebar zona hambat khamir terhadap *Colletotrichum* sp. pada setiap harinya. Khamir dengan persentase hambatan tertinggi akan dilihat mekanisme hambatannya secara mikroskopis dengan bantuan mikroskop elektron *Scanning Electron Microscope* (SEM).

4. Pengamatan mekanisme antagonis dengan *Scanning Electron Microscope* (SEM)

Alat yang digunakan Untuk mengetahui interaksi mekanisme antagonis sampel isolat hasil uji antagonis khamir *S. cerevisiae* dan patogen *Colletotrichum* sp. adalah *Scanning Electron Microscope* (SEM). Metode yang digunakan mengacu pada Hastuti (2016) yaitu hasil uji antagonis dipreparasi terlebih dahulu dengan cara menyiapkan *cover glass* steril dan diletakkan pada cawan steril. Lalu mengiris 2 x 2 mm pada zona antagonis dan diletakkan diatas *cover glass* steril yang telah disiapkan. Kemudian dilakukan pengeringan atau dehidrasi bertingkat menggunakan konsentrasi larutan etanol 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, dan 96% dengan cara disemprotkan kurang lebih dengan jarak 30 cm. Setiap penyemprotan konsentrasi etanol dilakukan dengan jarak waktu \pm 5 menit untuk pengeringan.

Setelah isolat dikeringkan kemudian diletakkan pada alat pemegang spesimen (*aluminium stub*) dengan perekat koloid pasta perak dan dilapisi logam emas (Au) (ketebalan logam \pm 15 mm) dengan mengikuti proses evaporasi. selanjutnya diamati menggunakan mikroskop elektron skanning.

3.5 Variabel Pengamatan

3.5.1 Perbanyakkan khamir

1. Jumlah populasi

Jumlah populasi diukur menggunakan metode spektrofotometri. Variabel pengamatan berupa sifat biologi dilakukan dengan mengukur nilai OD (*Optical Density*). Pengukuran nilai OD dilakukan dengan mengambil contoh substrat pada perbanyakkan setiap 24 jam sekali yang masing-masingnya sebanyak 3 ml selama 4 hari pengamatan. Jumlah sel dihitung menggunakan spektrofotometer UV-VIS dengan panjang gelombang 600 nm (Sholikah *et al.*, 2013).

2. Analisa N-Total

Nitrogen total dianalisis dengan menggunakan pereaksi Khjedal-Nessler dan metode Spektrofotometri. Setiap sampel medium diambil sebanyak 25 ml, diberi pereaksi asam sufonil yang dicampurkan dengan *naphthyl amine*, dikocok, dibiarkan selama 10 menit, maka akan terbentuk warna lembayung, dan warna inilah yang diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 420 nm. Nilai absorbansi yang didapat dihubungkan dengan persamaan deret strandar yang telah diketahui kadarnya dan dapat dihitung secara regresi linier.

3. Suhu dan pH

Variabel sifat kimia berupa pH serta sifat fisik berupa suhu dilakukan dengan menggunakan alat pH meter dan thermometer. Pengamatan itu dilakukan dengan cara memasukkan elektroda dan stik pengukur ke dalam substrat yang dilakukan setiap 24 jam sekali (Widyanti, 2013). Pada penggunaan pH meter setiap kali mengukur pH medium biakkan, terlebih dahulu elektroda dibenamkan dalam aquades, dibersihkan dengan tissue, kemudian dicelupkan lagi kemedium biakkan berikutnya, begitu seterusnya sampai medium biakkan terakhir sesuai jumlah perlakuan. Dilanjutkan dengan menghitung jumlah koloni sel.

3.5.2 Uji Antagonis

1. Tingkat hambatan relatif

Persentase Tingkat Hambatan Relatif dari uji antagonis khamir *S. cerevisiae* terhadap patogen *Colletotrichum* sp. akan dihitung setelah 7 HSI. Persentase Tingkat Hambatan Relatif dihitung menggunakan rumus Begum *et al.*, (2008):

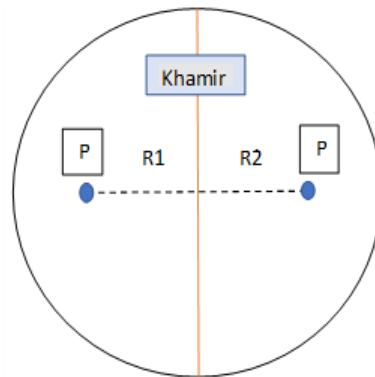
$$\text{THR} = \frac{dk-dp}{dk} \times 100\%$$

Keterangan:

THR = Tingkat hambatan relatif terhadap pertumbuhan patogen

dk = jumlah jari-jari koloni (r1+r2) patogen tanpa perlakuan khamir (kontrol)

dp = jumlah jari-jari koloni (r1+r2) patogen yang diberi perlakuan.



Gambar 12. Bagan uji antagonis secara *in vitro* pada petridish (Begum *et al.*, 2008)

Keterangan:

— = isolat khamir

- - - = jari-jari koloni (r1/r2)

● ● = isolat *C. musae*

2. Pengamatan *Scanning Electron Microscope* (SEM)

Cara kerja dari mikroskop elektron skanning adalah sinar dari lampu dipancarkan pada lensa kondensor, sebelum masuk pada lensa kondensor ada pengatur dari pancaran sinar elektron yang ditembakkan. Sinar yang melewati lensa objektif diteruskan pada spesimen yang diatur miring pada pencekamnya, spesimen ini disinari oleh deteksi x-ray yang menghasilkan sebuah gambar yang diteruskan pada layar monitor (Respati, 2008). Pengamatan dilakukan secara visual terhadap hasil fotomikograf yang diproses dengan foto hitam putih Fuji film.

3.6 Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil perbanyakan dan pengujian daya hambat khamir terhadap patogen *Colletotrichum* sp. dianalisis dengan analisis ragam (Anova) menggunakan DSAASTAT. Selanjutnya apabila terdapat hasil yang berbeda nyata, maka akan dilanjutkan menggunakan uji DMRT pada perbanyakan dan BNT pada uji antagonis taraf kesalahan 5%.