

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### 3.1 Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksplorasi dan eksperimen. Penelitian eksplorasi dengan cara menggunakan isolasi jamur endofit dari akar kentang (*Solanum tuberosum*) yang diperoleh dari Desa Sumberbrantas Batu Malang sedangkan eksperimen dengan menguji isolat jamur endofit terhadap bakteri *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* dan jamur *Fusarium sp*, *Phytophthora infestans*. Rancangan yang digunakan dalam penelitian ini adalah rancangan acak lengkap (RAL) dengan 3 kali ulangan.

Jenis isolat jamur endofit diantaranya adalah sebagai berikut:

1A = *Penicillium* sp

2A = *Aspergillus* sp

3C = *Homiscium* sp

Penentuan ulangan perlakuan menggunakan rumus Hanafiah (1993) yaitu:

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

Keterangan : t = treatment / perlakuan = 9

r = replikasi / ulangan

Dengan demikian berdasarkan rumus tersebut, perlakuan dalam penelitian ini masing-masing dilakukan dalam 3 kali ulangan, sehingga secara keseluruhan menghasilkan 9 perlakuan dengan 3 kali ulangan.

Tabel 3.1 Diameter zona hambat yang dihasilkan jamur endofit terhadap jamur uji

JAMUR ENDOFIT	Jamur Uji		
	U1	U2	U3
1A	1A U1	1A U2	1A U3
2A	2A U1	2A U2	2A U3
3C	3C U1	3C U2	3C U3

Keterangan :

U1= Ulangan 1

U2= Ulangan 2

U3= Ulangan 3

### 3.2 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember 2009 sampai April 2010 dan bertempat di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

### 3.3 Variabel Penelitian

#### 3.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat jamur endofit yang ditumbuhkan pada medium PDA (*Potato Destroce Agar*) yang terdiri dari isolat 1A, 2A dan 3C dengan 3 kali ulangan.

#### 3.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini merupakan variabel yang dapat diukur yaitu zona hambat terhadap bakteri *Ralstonia solanacearum*, jamur *Fusarium* sp, *Phytophthora infestans* yang diletakkan pada cawan petri dan ditambahkan dengan suspensi jamur endofit dengan beberapa spesies.

### **3.4 Alat dan Bahan**

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah laminar flow cabinet, autoclave, oven, cawan petri, jarum ose, bunsen, pengaduk kaca, entkas, pinset, kertas saring, incubator aluminium foil, mikroskop, cover glass, gelas obyek, gelas ukur, tabung reaksi, pipet volume, laminar, erlenmeyer, penggaris, shaker incubator, sentri fugasi, timbangan analitik, silet, dan plastik wrap.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah biakan bakteri *Ralstonia solanacearum*, jamur *Fusarium* sp, *Phytophthora infestans*. Jamur endofit yang diisolasi dari akar tanaman kentang varietas *Granola vietnam* yang sehat, medium PDA (*Potato Dextrose Agar*), PDAS (*Potato dextrose Agar Streptomycin*), PDB (*Potato Dextrose Broth*), NA (*Nutrien Agar*), larutan NaOCl (*Sodium Hipoklorit*) 1%, Aquades steril, spirtus, kapas, alkohol 70%, kertas cakram, tissue.

### **3.5 Prosedur Kerja**

#### **3.5.1 Sterilisasi Alat dan Bahan**

Sebelum penelitian dimulai terlebih dahulu menyeterilkan alat dan bahan, untuk alat-alat gelas dan cawan petri dicuci terlebih dahulu kemudian dikeringkan. Alat-alat dan bahan kemudian dibungkus dan memasukkannya ke dalam autoklaf pada suhu 121 °C dengan tekanan 15 psi (*per square inchi*) selama 15 menit.

#### **3.5.2 Penyiapan Media**

##### **3.5.2.1 Penyiapan Media PDA (*Potato Destroce Agar*)**

Ditimbang PDA sebanyak 19,5 g, kemudian ditambahkan sebanyak 500

ml akuades pada media PDA. Setelah itu PDA dipanaskan setelah ditambahkan dengan akuades hingga mendidih. Kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi (10 buah), masing-masing 10 ml dan ditutup dengan kapas.

#### 3.5.2.2 Penyiapan Media PDAS (*Potato dextrose Agar Streptomysin*)

Ditimbang PDA sebanyak 39 g, kemudian ditambahkan sebanyak 1000 ml akuades pada media PDA dan streptomysin 1 gram. Setelah itu PDA panaskan setelah ditambahkan dengan akuades hingga mendidih. Kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi (10 buah), masing-masing 10 ml dan ditutup dengan kapas.

3.5.2.3 Penyiapan Media PDB (*Potato Dextose Broth*), cara pembuatannya adalah sebagai berikut:

1. Disiapkan bahan yang terdiri dari kentang 0,5 kg, dekstrosa 10 gram dan aquades steril 500 ml.
2. Dimasukkan semua bahan tersebut kedalam labu erlemeyer kemudian dipanaskan dan diaduk sampai homogen.
3. Dituangkan larutan PDB tersebut kedalam tabung reaksi masing-masing sebanyak 10 ml dan menutupnya dengan kapas,
4. Kemudian dimasukkan ke dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121 °C dengan tekanan 15 psi.
5. Disimpan media tersebut selama 24 jam pada suhu kamar sebelum digunakan.

#### 3.5.2.4 Penyiapan Media NA (*Nutrien Agar*)

Ditimbang NA sebanyak 19,5 g, kemudian ditambahkan sebanyak 500 ml akuades pada media NA. Setelah itu dipanaskan NA yang telah ditambahkan

dengan akuades hingga mendidih. Kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi (10 buah), masing-masing 10 ml dan ditutup dengan dengan kapas.

### **3.5.3 Penyiapan Isolasi Jamur Endofit dari Akar Tanaman Kentang**

Jamur endofit diisolasi dari tanaman kentang (*Solanum tuberosum*) sehat yang diambil dari akarnya. Kemudian akar tersebut dicuci dengan menggunakan air mengalir selama  $\pm 5$  menit setelah itu dipotong  $\pm 1$  cm . Setelah itu dilakukan sterilisasi permukaannya dengan memasukkannya ke dalam larutan alkohol 70% selama  $\pm 1$  menit dan dilanjutkan ke dalam larutan NaOCl 1 % selama  $\pm 5$  menit kemudian dikeringkan dengan tissue steril, selanjutnya akar tersebut dibilas dengan aquades steril  $\pm 1$  menit diulang 2 kali, lalu ditempelkan di atas cawan petri berisi media PDAS, perlakuan ini berfungsi sebagai kontrol. Kemudian pada akar yang lain (akar ke-2) dilakukan perlakuan dengan cara membelah akar tanaman tersebut dan meletakkannya pada posisi tertelungkup. Cawan petri yang sudah mengandung sampel tanaman kemudian diinkubasi dalam inkubator pada suhu kamar selama 2- 4 hari sampai tampak jamur yang tumbuh. Kemudian jamur endofit yang digunakan untuk penelitian adalah jamur yang tumbuh pada belahan akar bagian dalam (Simarmata, 2007).

### **3.5.4 Penyiapan Pemurnian Jamur Endofit**

Penyiapan pemurnian jamur endofit dilakukan dengan cara sebagai berikut:

1. Disiapkan cawan petri yang telah ditumbuhkan jamur endofit pada medium PDAS.
2. Kemudian diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu kamar 25 °C.

3. Kemudian diidentifikasi berdasarkan ciri-ciri makroskopis dengan melihat bentuk dan warna koloni jamur endofit.
4. Koloni yang terpisah dan tumbuh dengan baik selanjutnya dipilih dan ditanam kembali pada PDA yang baru.
5. Sedangkan pengamatan secara mikroskopis dengan menggunakan mikroskop binokuler.

Pembuatan preparat untuk pengamatan yang menggunakan mikroskop binokuler adalah sebagai berikut:

1. Media agar diambil dari cawan petri dengan menggunakan jarum ose.
2. Potongan media tersebut diletakkan di atas objek glass.
3. Konidia atau spora dari biakan murni jamur diambil dengan jarum ose.
4. Inokulum jamur diletakkan di atas potongan media pada objek glass.
5. Objek glass ditutup dengan cover glass kemudian ditekan secara perlahan.
6. Morfologi jamur (bentuk dan ukuran hifa, konidia, spora) yang terbentuk diamati dengan menggunakan mikroskop binokuler dengan perbesaran 400x, kemudian preparat jamur diidentifikasi dengan menggunakan buku identifikasi jamur karangan Barnett (1972).

### **3.5.5 Seleksi Jamur Endofit Penghasil Metabolit Antifungi dan Antibakteri**

#### **a. Produktivitas Metabolit Antifungi**

Produksi metabolit antifungi yang dihasilkan oleh jamur endofit dilakukan dengan cara menumbuhkannya di dalam medium PDB. Koloni jamur endofit yang telah diinkubasi pada medium PDA selama 24 jam pada suhu 25 °C, diambil satu sengkeli dengan menggunakan jarum ose dan diinokulasi ke medium PDB cair

dalam tabung reaksi 10 ml. Kemudian diinkubasi pada suhu 25 °C menggunakan shaker incubator 130 rpm selama 48 jam. Setelah selesai masing-masing medium disentrifugasi dengan kecepatan 2000 g pada suhu 4 °C selama 20 menit. Supernatan diambil dan dipergunakan dalam pengujian antifungi terhadap jamur *Fusarium sp* dan *Phytophora infestans*.

**b. Uji Antifungi (Jamur *Fusarium sp* dan *Phytophora infestans*.)**

Medium yang digunakan untuk uji antifungi yaitu medium PDA. Uji aktivitas antifungi metabolit jamur endofit terhadap jamur *Fusarium sp* dan *Phytophora infestans* dilakukan dengan metode uji Kirby-Bauer menggunakan kertas cakram. Kertas cakram dibuat dari kertas kertas saring Whatman dan membuat bulat dengan alat pelubang jertas sehingga didapatkan kertas cakram dengan diameter 6 mm.

Secara aseptik, kertas cakram yang sudah disterilkan direndam supernatan kultur jamur endofit selama 30 menit. Kertas cakram diambil dengan menggunakan pinset steril dan diletakkan di atas medium uji aktivitas antifungi (medium PDA). Kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 25 °C. Setelah masa inkubasi selesai, dilakukan pengukuran diameter zona jernih yang terbentuk. Sampel yang mempunyai potensi menghasilkan zat antifungi ditunjukkan dengan terbentuknya zona jernih.

**c. Uji Antibakteri (*Ralstonia solanacearum*)**

Medium yang digunakan untuk uji antibakteri yaitu medium NA. Uji aktivitas metabolit jamur endofit terhadap bakteri *Ralstonia solanacearum*

dilakukan dengan metode uji Kirby-Bauer menggunakan kertas cakram. Kertas cakram dibuat dari kertas saring Whatman dan dibuat bulat dengan alat pelubang kertas sehingga didapatkan kertas cakram dengan diameter 6 mm.

Secara aseptik, kertas cakram yang sudah disterilkan direndam supernatan kultur jamur endofit selama 30 menit. Kertas cakram diambil dengan menggunakan pinset steril dan diletakkan di atas medium uji aktivitas antibakteri (medium NA). Kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 25°C. Setelah masa inkubasi selesai, dilakukan pengukuran diameter zona jernih yang terbentuk. Sampel yang mempunyai potensi menghasilkan zat antibakteri ditunjukkan dengan terbentuknya zona jernih.

#### **3.5.6 Pengukuran Zona Hambat**

Data diperoleh dengan cara mengukur diameter zona hambat yang terbentuk, pengumpulan data dilaksanakan dengan cara, mengukur diameter zona hambat dengan menggunakan jangka sorong. Diameter zona hambat adalah diameter yang tidak ditumbuhi oleh jamur di sekitar paper disk dikurangi diameter paper disk.

#### **3.5.7 Analisis Data**

Analisis penelitian ini melalui uji Anova satu arah menggunakan batas kepercayaan 95% ( $\alpha:0,05$ ). Jika terdapat perbedaan nyata, maka dilakukan uji lanjut dengan menggunakan uji BNT.