

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan waktu penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret 2022 sampai bulan September 2022 bertempat di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Produksi Fakultas Pertanian Universitas Siliwangi Kampus Mugarsari, Kota Tasikmalaya.

3.2 Alat dan bahan

Alat yang digunakan pada penelitian ini diantaranya gelas ukur, timbangan analitik, *Laminar Air Flow Cabinet* (LAFC), cawan petri, tabung reaksi, jarum ose, pipet, mikropipet, *tube* mikropipet, api bunsen, *plastic wrap*, *shaker*, erlenmeyer, *hot plate magnetic stirrer*, *spreader*, gelas objek, mikroskop, inkubator, autoklaf, pinset, mortar, kompor gas, *aluminium foil*, kertas merang, germinator, *haemocytometer*, kapas, kassa, tabung falcon, *centrifuge*.

Adapun bahan yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya akar tanaman ginseng jawa (*Talinum paniculatum* Gaertn.) pada berbagai tingkat kapasitas lapang yaitu sampel A (50% kapasitas lapang), sampel B (60% kapasitas lapang), sampel C (70% kapasitas lapang), sampel D (80% kapasitas lapang), sampel E (90% kapasitas lapang), sampel F (100% kapasitas lapang), sampel G (110% kapasitas lapang), media *Nutrient Agar* (NA), media *Potato Dextrose Agar* (PDA), Media *Nutrient Broth* (NB), NaCl, alkohol 70%, aquadest steril, minyak imersi, kristal violet, iodin, safranin 0,5%, NaOCL, alkohol 96%, tween 80, biji ginseng jawa.

3.3 Rancangan penelitian

Penelitian ini dilakukan secara eksplorasi dan eksperimen. Metode penelitian yang digunakan untuk eksplorasi mikroba endofit ini adalah metode deskriptif. Sampel akar yang digunakan untuk eksplorasi mikroba endofit merupakan akar ginseng jawa dengan berbagai tingkat cekaman air dari penelitian sebelumnya.

Sementara itu untuk penelitian pengaruh isolat mikroba endofit terhadap perkecambahan ginseng jawa bersifat eksperimen. Adapun rancangan penelitian yang digunakan yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 3 perlakuan dan 6

ulangan. Masing-masing perlakuan terdiri dari 100 biji ginseng jawa dengan uraian sebagai berikut.

A= Tanpa mikroba endofit (kontrol)

B= Isolat bakteri endofit

C= Isolat fungi endofit

Data yang diperoleh dari hasil pengamatan semua proses selanjutnya dianalisis secara deskriptif. Sementara itu, data hasil pengujian pengaruh isolat mikroba endofit terhadap perkecambahan tanaman ginseng jawa dianalisis melalui persamaan Rancangan Acak Lengkap (RAL) sebagai berikut:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

Dengan $i = 1, 2, \dots, t$ dan $j = 1, 2, \dots, r$

Keterangan:

Y_{ij} : Pengamatan pada perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

μ : Rataan umum

τ_i : Pengaruh perlakuan ke-i

ε_{ij} : Pengaruh acak pada perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

Berdasarkan model linear di atas dapat disusun dalam daftar sidik ragam sebagaimana Tabel 1. berikut ini.

Tabel 1. Sidik Ragam

Sumber Jumlah macam koloni	db	JK	KT	F Hitung	F Tabel 5%
Perlakuan (k)	2	$\sum X_{ij}^2/r - X_{..}^2/RK$	JKk/dbk	KTk/KTg	3,68
Galat (g)	15	JKT- JKk	JKg/dbg		
Total (T)	17	$\sum X_{ij}^2 - X_{..}^2/rk$			

Sumber: Gomez dan Gomez (2015)

Tabel 2. Kaidah Pengambilan Keputusan

Hasil Analisis	Analisis	Kesimpulan Percobaan
$F \text{ Hitung} \leq F_{0,05}$	Berbeda tidak nyata	Tidak ada perbedaan pengaruh antar perlakuan
$F \text{ Hitung} > F_{0,05}$	Berbeda nyata	Terdapat perbedaan pengaruh antar perlakuan

Sumber: Gomez dan Gomez (2015)

Untuk mencari S_x dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$S_x = \sqrt{\frac{KT \text{ Galat}}{r}}$$

Keterangan:

LSR = *Least Significant Ranges*

SSR = *Significant Studentized Range* (dilihat dari tabel dengan D_b galat 15 pada taraf 5%)

S_x = Galat baku rata-rata (*standard error*)

α = Taraf nyata

dbG = Derajat bebas galat

p = *Range* (perlakuan)

KTG = Kuadrat tengah galat

r = Jumlah ulangan pada tiap nilai tengah perlakuan yang dibandingkan

3.4 Pelaksanaan penelitian

3.4.1 Eksplorasi mikroba endofit

1) Pengambilan sampel tanaman

Sebanyak tujuh sampel akar ginseng jawa diambil dari pertanaman ginseng jawa di *Green House* Fakultas Pertanian Universitas Siliwangi Kampus Mugarsari. Sampel yang diperoleh kemudian ditempatkan di dalam wadah atau *box* plastik agar sampel tersebut tidak rusak.

2) Sterilisasi alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian di laboratorium dicuci kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf dengan tekanan 1 atm dan suhu 121°C selama 15 menit (Silalahi, Mukarlina, dan Rahmawati, 2020). Adapun alat-alat yang tidak tahan panas dapat disterilkan dengan alkohol 70%.

3) Pembuatan Media

Media yang digunakan dalam penelitian ini yaitu media *Nutrient Agar* (NA) dan media *Nutrient Broth* (NB) untuk bakteri dan media PDA (*Potato Dextrose Agar*) untuk fungi. Media NA dibuat dengan melarutkan 28 gram media NA dalam 1 liter akuades steril kemudian dihomogenkan dan dipanaskan dengan menggunakan *hot plate magnetic stirrer*. Setelah homogen, media kemudian disterilkan dengan menggunakan autoklaf. Sementara itu, untuk membuat media NB dilakukan dengan melarutkan 13 gram media NB ke dalam 1 liter akuades steril kemudian dihomogenkan dan disterilkan dengan menggunakan autoklaf. Media PDA dibuat dengan melarutkan 39 gram media PDA ke dalam 1 liter akuades steril kemudian di homogenkan dan disterilkan dengan autoklaf.

4) Isolasi bakteri dan fungi endofit

Bakteri endofit diisolasi menggunakan metode cawan sebar. Sampel akar tanaman ginseng yang didapatkan kemudian dicuci di air mengalir untuk membersihkan kotoran yang menempel pada akar. Akar yang telah dibersihkan kemudian dikeringkan menggunakan tissue kemudian ditimbang sebanyak 1 gram. Sterilisasi permukaan dilakukan dengan merendam potongan akar menggunakan alkohol 70% selama 1 menit, kemudian sampel direndam dalam larutan Natrium Hipoklorit 5,25% selama 2 menit. Potongan akar kemudian dibilas dengan akuades steril sebanyak 3 kali. Keberhasilan sterilisasi permukaan dengan menuangkan aquades bilasan terakhir pada media *Nutrient Agar* (NA) (Ginting, Wijanarka, dan Kusdiyantini, 2020). Sampel kemudian dihaluskan dengan menggunakan mortar steril dan dilakukan pengenceran bertingkat (Lampiran 3) dengan menggunakan 9 mL larutan fisiologis steril (0,85% NaCl) hingga pengenceran 10^{-4} . Pada tiap

pengenceran, diambil 0,1 ml larutan dan ditumbuhkan di dalam media NA dengan 3 kali (triplo) pengulangan kemudian diinkubasi selama 2-3 hari pada suhu ruang.

Isolasi fungi endofit dilakukan dengan mencuci bagian akar dengan alkohol dan aquades agar steril dari fungi luar sehingga fungi yang tumbuh diharapkan berasal dari dalam jaringan tanaman ginseng jawa. Kemudian sampel dipotong sepanjang ± 1 cm. Potongan sampel disterilkan dengan cara dicuci ke dalam larutan NaOCl 10% selama satu menit dan selanjutnya direndam alkohol 96% selama satu menit diulang dua kali. Setelah itu dibilas dengan aquades selama satu menit dan diulang dua kali, lalu potongan sampel dikeringkan di atas tissue steril. Setelah kering, kemudian potongan sampel ditanam pada media PDA dalam cawan petri. Pada aquades bilasan terakhir diambil 1 ml dan dituang pada media PDA yang baru untuk digunakan sebagai kontrol yang berfungsi menentukan apakah sampel yang diisolasi merupakan fungi endofit atau bukan. Kemudian isolat diinkubasi selama 5 sampai 7 hari pada suhu 25 °C sampai 30°C atau sampai isolat fungi endofit tumbuh memenuhi cawan petri. Pengamatan dilakukan dua hari sekali selama fungi endofit tampak tumbuh (Shofiana, Sulistyowati dan Muhibuddin, 2015).

Bakteri dan fungi yang tumbuh secara bertahap dimurnikan satu persatu. Koloni yang mempunyai bentuk yang berbeda antara satu dengan koloni yang lainnya dapat dianggap koloni yang berbeda (Djamaan, Asiah, dan Wahyuni, 2014). Media *Nutrient Agar* (NA) untuk bakteri dan *Potato Dektrosa Agar* (PDA) untuk fungi.

Jumlah koloni bakteri dihitung dengan metode cawan hitung/ *Total Plate Count* (TPC). Prinsip metode cawan hitung adalah sel mikroba yang masih hidup ditumbuhkan pada media agar, maka sel bakteri itu berkembangbiak membentuk koloni yang dapat dilihat dan dihitung secara makroskopis, disebut *Colony Forming Unit* (CFU). Prinsip metode hitung cawan adalah jika sel mikroba yang masih hidup ditumbuhkan pada media agar, maka sel mikroba itu akan berkembangbiak membentuk koloni yang dapat dilihat dan dihitung dengan mata telanjang, dan disebut dengan "*Colony Forming Unit*" = CFU. Metode hitungan cawan dapat dilakukan dengan menggunakan metode tuang (*pour plate*) dan metode permukaan (*surface/spread plate*). Penghitungan jumlah mikroba dianggap valid jika dalam

satu cawan tumbuh koloni sebanyak 30-300, sehingga jika pertumbuhan mikroba terlalu padat, maka dilakukan pengenceran terlebih dahulu. Rumus perhitungannya adalah sebagai berikut:

$$\text{Koloni per ml atau per gram (CFU/ml)} = \text{Jumlah koloni} \times (1/\text{FP} \times \text{jumlah yang ditumbuhkan})$$

Keterangan:

FP = faktor pengenceran pada cawan petri yang koloninya dihitung atau pengenceran x jumlah yang ditumbuhkan (volume yang dimasukkan dalam cawan petri (0,1 ml atau 1 ml) .

Cara menghitung jumlah koloni pada cawan menurut Schlegel (2001) dalam Utami Dkk. (2018), sesuai dengan kaidah sebagai berikut.

- Cawan yang dipilih dan dihitung adalah cawan yang mengandung jumlah koloni antara 30 sampai 300.
- Beberapa koloni yang bergabung menjadi satu merupakan suatu kumpulan koloni yang besar dimana jumlah koloni diragukan, dihitung sebagai satu koloni.
- Suatu deretan (rantai) yang terlihat sebagai suatu garis tebal dihitung sebagai satu koloni.
- Data yang dilaporkan mengikuti peraturan yaitu hanya terdiri dari dua angka, yaitu angka pertama di depan koma dan angka ke dua dibelakang koma.
- Jika semua pengenceran menghasilkan angka kurang dari 30 koloni, hanya jumlah koloni yang terendah yang dihitung. Jika semua pengenceran menghasilkan lebih dari 300 koloni pada cawan petri, hanya jumlah koloni pada pengenceran yang tertinggi yang dihitung.
- Jika terdapat lebih dari satu cawan yang mempunyai jumlah koloni yang memenuhi syarat, maka dihitung nilai rata-ratanya.

3.4.2 Uji daya kecambah benih ginseng jawa

1) Penyediaan benih ginseng jawa

Benih ginseng jawa diperoleh dari pertanaman ginseng jawa di *Green House* Fakultas Pertanian Universitas Siliwangi Kampus Mugarsari yang kemudian

disimpan di Laboratorium Produksi. Benih yang diambil adalah benih dari buah yang telah masak dan mengering.

2) Pembuatan suspensi isolat bakteri dan fungi endofit

Bakteri dan fungi endofit hasil isolasi kemudian diidentifikasi lalu dipilih satu isolat bakteri dan satu isolat fungi dengan frekuensi kemunculan terbanyak. Penyiapan suspensi bakteri endofit terpilih dilakukan dengan menumbuhkan bakteri dalam media *Nutrient Broth* (NB) selama 48 jam dan diinkubasi menggunakan *shaker* kemudian di-*centrifuge* untuk memisahkan bakteri dan media. Selanjutnya koloni bakteri disuspensikan dengan menambahkan 10 ml akuades steril, diaduk, dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Konsentrasi suspensi bakteri endofit yang digunakan untuk perendaman benih yaitu 10^8 – 10^{10} CFU ml⁻¹ (Munif, Wibowo, dan Herliyana, 2015).

Pembuatan suspensi fungi endofit dilakukan dengan menumbuhkan fungi endofit terpilih pada media padat. Biakan fungi yang telah berumur 3-4 minggu kemudian dicampur dengan 10 ml aquades steril dan ditambahkan 0,1 ml tween 80 lalu dilakukan pengadukan sehingga konidia terlepas dari media. Perhitungan kerapatan konidia dihitung menggunakan *haemocytometer*. Suspensi fungi diambil sebanyak 1 ml menggunakan mikropipet lalu diteteskan pada bagian kotak perhitungan *haemocytometer* dan ditutup dengan gelas penutup. Kerapatan konidia yang digunakan dalam uji kecambah adalah 10^6 konidia ml⁻¹ (Irawati, 2017). Adapun perhitungan kerapatan konidia menggunakan rumus menurut Hadioetomo (1993) sebagai berikut.

$$K = \frac{t \times d}{n \times 0,25} \times 10^6$$

Keterangan:

K = kerapatan konidia (konidia/ml)

t = konidia dalam jumlah kotak sampel

d = faktor pengenceran

n = jumlah sampel yang diamati

0,25 = faktor koreksi

3) Perlakuan benih

Benih ginseng jawa yang akan digunakan dilakukan sterilisasi permukaan dengan alkohol 70% selama 1 sampai 2 menit, kemudian dibilas tiga kali dengan aquades steril, lalu ditiriskan. Sebagai kontrol, benih hanya disterilisasi permukaannya dan tidak direndam dengan suspensi mikroba endofit. Setelah benih ditiriskan, benih direndam selama 12 jam menggunakan air steril kemudian direndam dalam suspensi fungi dan bakteri endofit yang telah dipersiapkan sebelumnya selama 30 menit.

4) Uji daya kecambah

Benih ginseng jawa yang telah diberi direndam dalam suspense mikroba endofit kemudian dilakukan pengujian daya kecambah menggunakan kertas merang. Kertas merang dilembabkan dengan akuades steril dan disemaikan 100 benih/kertas merang lalu diinkubasi di dalam germinator (ruang kecambah) selama 7 hari (Yanty dan Trisno, 2021).

3.5 Parameter pengamatan

3.5.1 Pengamatan penunjang

Pengamatan penunjang ini bertujuan untuk mengetahui faktor-faktor eksternal yang mungkin berpengaruh selama penelitian berlangsung. Pengamatan ini dilakukan terhadap suhu dan kelembaban ruang tempat percobaan juga serangan Organisme Pengganggu Tumbuhan (OPT) pada saat perkecambahan.

3.5.2 Parameter utama

1) Jumlah koloni endofit

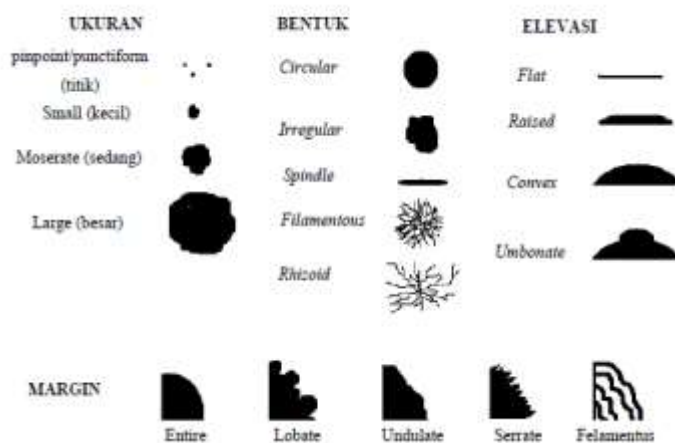
Jumlah koloni endofit dihitung dengan metode cawan hitung/*Total Plate Count* (TPC). Prinsip metode cawan hitung adalah sel bakteri yang masih hidup ditumbuhkan pada media agar, maka sel bakteri itu berkembangbiak membentuk koloni yang dapat dilihat dan dihitung secara makroskopis disebut *Colony Forming Unit* (CFU)

2) Identifikasi mikroba endofit

a. Identifikasi makroskopis

Pengamatan makroskopis pada bakteri endofit dilakukan dengan melihat bentuk, permukaan, warna hingga ukuran koloni dari isolat endofit sebagai berikut:

- Bentuk koloni (dilihat dari atas): berupa titik-titik, bulat, berbenang, tak teratur, serupa akar, serupa kumparan.
- Permukaan koloni (dilihat dari samping): utuh, berombak, berbelah, bergerigi, berbenang, keriting.
- Warna koloni: keputih-putihan, kelabu, kekuning-kuningan atau hampir bening.
- Ukuran koloni: titik, kecil, sedang, besar.



Gambar 2. Morfologi bakteri (Sumber: Waluyo, 2019)

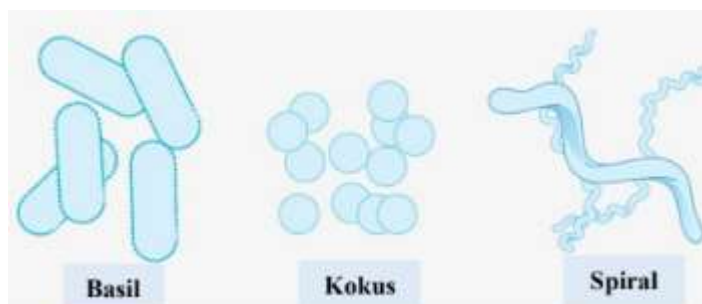
Sementara itu, pengamatan makroskopis untuk fungi endofit diidentifikasi berdasarkan pada karakter koloni seperti warna koloni, tekstur permukaan koloni, bentuk koloni, tepian koloni dan arah pertumbuhan koloni.

b. Identifikasi mikroskopis

Pengamatan karakteristik bakteri endofit secara mikroskopik dilakukan dengan cara pewarnaan gram, isolat bakteri endofit diambil dengan jarum ose secara aseptis dan disuspensikan dengan aquades yang ada di atas gelas objek. Preparat difiksasi di atas api bunsen sampai kering kemudian ditetesi dengan kristal ungu, didiamkan selama 1 menit dan dicuci dengan air lalu keringkan. Preparat ditetesi dengan iodin dan didiamkan selama 1 menit kemudian dicuci dengan air

lalu keringkan. Preparat ditetesi dengan alkohol 96% sampai warna hilang. Preparat ditetesi dengan safranin dan didiamkan selama 30 detik, dicuci dengan air lalu dikeringkan. Preparat diamati menggunakan mikroskop uji Gram positif jika berwarna ungu, uji Gram negatif jika berwarna merah (Hadioetomo, 1985, dalam Hidayati, Yulia, dan Aji, 2019). Pengamatan mikroskopis juga dilakukan untuk mengetahui bentuk dari bakteri yaitu sebagai berikut.

- Kokus, Bakteri dengan bentuk sferis atau bulat disebut kokus (*coccus*) yang ditemukan pada genus *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Neisseria*, dan lain-lain.
- Basil, Bakteri yang berbentuk batang atau silinder dinamakan basil, dapat dijumpai pada famili Enterobacteriaceae seperti *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae* maupun famili Bacillaceae seperti genus *Clostridium* dan genus *Bacillus*.
- Spiral



Gambar 3. Bentuk bakteri secara mikroskopis.

Identifikasi mikroskopis pada fungi endofit menggunakan metode *slide culture* James (1986) yang dimodifikasi. Media PDA yang telah padat dipotong dari cawan petri dengan ukuran 0.5 cm x 0.5 cm (potongan *block agar*). Potongan tersebut diletakan pada objek glass steril yang dilapisi tissue steril dalam cawan. Isoalt fungi endofit kemudian diinokulasikan pada empat sisi blok agar kemudian ditutup dengan *deck glass*. Cawan petri ditutup dengan rapat selanjutnya diinkubasi pada suhu 20°C sampai 25°C selama 5 sampai 7 hari. Setelah masa inkubasi, *deck glass* kemudian diangkat dengan hati-hati dan dipindahkan di atas objek glass yang telah ditetesi pewarna *Lactophenol Cotton Blue*. Preparat kemudian diamati di bawah mikroskop. Pengamatan dilakukan terhadap morfologi fungi secara mikroskopis seperti bentuk hifa dan konidia fungi.

3) Persentase benih berkecambah (%)

Persentase daya kecambah benih 6jkkm kginseng jawa dihitung pada hari ke-7 setelah semai dengan rumus sebagai berikut.

$$P = \frac{\text{Jumlah benih yang berkecambah}}{\text{jumlah benih dikedambahkan}} \times 100\%$$

Keterangan:

P = persentase daya kecambah benih yang tumbuh

4) Efektivitas perlakuan terhadap persentase daya kecambah benih ginseng jawa

Pengamatan efektivitas perlakuan terhadap persentase daya kecambah benih ginseng jawa dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut.

$$E = \frac{\text{perlakuan-kontrol}}{\text{kontrol}} \times 100\%$$

Keterangan:

E = efektivitas

5) Kecepatan tumbuh (% etmal)

Kecepatan tumbuh (KCT) diamati dengan menghitung benih yang berkecambah normal secara harian dengan rumus menurut Sadjad (1993).

$$KCT = \frac{N1}{W1} + \frac{N2}{W2} + \dots + \frac{Nn}{Wn}$$

Keterangan:

Nn = banyaknya kecambah hari ke-n (n=1,2,3 dan seterusnya)

Wn = etmal (24 jam) hari ke-n (n-1,2,3, dan seterusnya)

6) Keserempakan berkecambah (%)

Keserempakan tumbuh benih dihitung dengan menggunakan persentase kecambah normal dengan rumus sebagai berikut.

$$KST = \frac{KK}{TB} \times 100\%$$

Keterangan:

KST = keserempakan tumbuh benih

KK = jumlah kecambah normal

TB = total benih yang dianalisis