

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Dasar Fakultas Pertanian Universitas Siliwangi, Kota Tasikmalaya, Jawa Barat. Waktu penelitian berlangsung pada bulan Desember 2024 sampai Januari 2025.

3.2 Alat dan bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu *autoclave*, *laminar air flow*, bunsen, *scalpel*, mata pisau, *cork borer*, tabung reaksi, cawan petri, pipet, rak tabung reaksi, *shaker*, erlenmeyer, *mikropipet*, tip pipet, bor tanah/sekop, label, jarum ose, alat semprotan, *object glass*, *cover glass*, mikroskop, timbangan digital, kompor, panci, aluminium foil, *plastic wrap*, korek, tisu, penggaris, spidol, plastik, suntikan, dan alat tulis.

Sedangkan bahan yang diperlukan selama penelitian adalah media PDA, *aquadest* steril, alkohol 70%, alkohol 90%, spirtus, tanaman tembakau, isolat murni *Fusarium* sp. dari koleksi laboratorium mikrobiologi Fakultas Pertanian Universitas Siliwangi, serta tanah rizosfer bambu (*Bambusa* sp.) sebanyak 100 g.

3.3 Metode penelitian

Penelitian ini terbagi menjadi 2 percobaan yaitu percobaan pertama dan percobaan kedua, berikut uraiannya:

3.3.1. Percobaan Pertama

Pelaksanaan percobaan pertama berkaitan dengan proses eksplorasi jamur antagonis dari tanah rizosfer bambu sampai dengan penyeleksian isolat jamur rizosfer bambu. Percobaan pertama meliputi isolasi jamur antagonis dari tanah rizosfer bambu, uji hipersensitif, dan karakterisasi jamur hasil eksplorasi. Adapun penamaan isolat jamur hasil eksplorasi yaitu Jamur Rizosfer Bambu yang disingkat menjadi JRB.

3.3.2. Percobaan Kedua

Percobaan kedua meliputi satu tahap *screening* isolat JRB yaitu uji kecepatan pertumbuhan serta uji daya hambat yang meliputi diameter koloni *Fusarium* sp. dan

daya hambat pertumbuhan *Fusarium* sp. Metode yang digunakan dalam uji daya hambat pada percobaan kedua yaitu rancangan acak lengkap (RAL) dengan 5 perlakuan jamur hasil eksplorasi yang dipilih berdasarkan hasil uji hipersensitif dan kecepatan pertumbuhan jamur, serta 1 perlakuan kontrol sehingga berjumlah 6 perlakuan. Setiap perlakuan akan diulang sebanyak 4 kali sehingga jumlah percobaan sebanyak 24 unit percobaan. Adapun perlakuan percobaan ini yaitu :

A = Kontrol (*Fusarium* sp. tanpa JRB)

B = JRB-1 (*Fusarium* sp. dengan JRB-1)

C = JRB-2 (*Fusarium* sp. dengan JRB-2)

D = JRB-3 (*Fusarium* sp. dengan JRB-3)

E = JRB-5 (*Fusarium* sp. dengan JRB-5)

F = JRB-6 (*Fusarium* sp. dengan JRB-6)

Model linear dari rancangan acak lengkap (RAL) tersebut adalah sebagai berikut:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \epsilon_{ij}$$

Keterangan:

Y_{ij} = nilai pengamatan perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

μ = nilai tengah umum (rata-rata respon)

T_i = pengaruh perlakuan ke-i

ϵ_{ij} = pengaruh galat percobaan dari perlakuan ke-I dan ulangan ke-j

Data hasil pengamatan *in vitro* dianalisis dengan menggunakan sidik ragam (ANOVA) yang disajikan pada Tabel 1. dan kaidah pengambilan keputusan pada Tabel 2.

Tabel 1. Analisis Ragam *in vitro*

Sumber ragam	Db	JK	KT	F hit.	F tab. 5%
Perlakuan	5	$\frac{\sum T_{ij}^2}{r} - FK$	$\frac{JKP}{DbP}$	$\frac{KTP}{KTG}$	2,77
Galat	18	JKT-JKP	$\frac{JKG}{DbG}$		
Total	23	$\sum X_{ij}^2 - FK$			

Sumber : Gomez dan Gomez, 2010

Tabel 2. Kaidah pengambilan keputusan

Hasil analisa	Kesimpulan analisa	Keterangan
$F_{hit} \leq F_{0,05}$	Berbeda tidak nyata	Tidak ada pengaruh
$F_{hit} > F_{0,05}$	Berbeda nyata	Ada pengaruh

Apabila hasil uji F dinyatakan berbeda nyata, maka dilakukan analisis lanjutan dengan Uji Jarak Berganda Duncan pada taraf nyata 5%. Adapun rumus yang digunakan sebagai berikut :

$$s\bar{x} = \sqrt{\frac{KT_{galat}}{r}}$$

Keterangan :

$s\bar{x}$: Galat baku rata-rata (*Standard Error*)

KT galat : Kuadrat Tengah galat

r : Jumlah ulangan pada tiap nilai tengah perlakuan yang dibandingkan

3.4 Pelaksanaan penelitian

3.4.1 Sterilisasi alat laboratorium

Sterilisasi dilaksanakan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15-30 menit tekanan 1 atm. Satu siklus sterilisasi dengan autoklaf mencakup peningkatan tekanan, sterilisasi, dan pengeluaran gas biasanya membutuhkan waktu dari tiga puluh menit hingga satu jam (Jiwatami, 2022). Adapun peralatan yang disterilisasi seperti jarum ose, tabung reaksi, *petridish*, erlenmeyer, media, kapas, tip, *cork borer*, dan seluruh alat yang kontak langsung dengan mikroba. Sterilisasi alat juga dilaksanakan dengan memanfaatkan pembakaran bunsen pada alat seperti ose, jarum, dan scalpel dengan cara membakar ujung alat diatas api bunsen sampai berpijar baik sebelum maupun sesudah digunakan.

3.4.2 Pembuatan media

Media pertumbuhan jamur menggunakan media instan yang memiliki kandungan *potato dextrose agar* (PDA) dengan jumlah kebutuhan disesuaikan penggunaan media tersebut selama penelitian berjalan. Pada pembuatan media tumbuh, setiap 29 g PDA instan dapat dilarutkan dalam 1 liter aquades kemudian

dipanaskan dalam wadah yang berisi air hingga homogen. Media yang homogen dibuat dilakukan sterilisasi menggunakan autoklaf dengan tujuan untuk menghilangkan mikroorganisme yang tidak diharapkan selain dari jamur yang akan diisolasi maupun diremajakan.

3.4.3 Peremajaan *Fusarium* sp.

Biakan murni *Fusarium* sp. didapatkan dari koleksi Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Pertanian Universitas Siliwangi yang diisolasi dari bagian batang tanaman kelor bergejala. Peremajaan jamur dilakukan dengan cara memotong biakan jamur dengan *scalpel* atau *cork borer* kemudian dipindahkan ke media PDA yang baru secara berkala. Proses inkubasi dilakukan selama 5 sampai dengan 7 hari sebelum digunakan untuk pengujian.

3.4.4 Pelaksanaan percobaan pertama

a. Pengambilan sampel

Pengambilan sampel tanah rizosfer bambu (*Bambusa* sp.) dilakukan dengan menggunakan bor tanah/sekop bersih. Selanjutnya tanah rizosfer bambu diambil pada kedalaman 20 cm sampai dengan 40 cm dibawah tumbuhnya akar tanaman. Pengambilan sampel ini dilakukan di 5 titik daerah akar bambu pada lokasi yang sama, lalu dikompositkan (Wisdawati *et.al.* 2019). Sampel tanah yang sudah diambil disimpan pada wadah sebelum dilakukan isolasi.

b. Isolasi dan pemurnian jamur rizosfer bambu (*Bambusa* sp.)

Isolasi jamur dari rizosfer bambu (*Bambusa* sp.) dilakukan dengan metode pengenceran bertingkat, selama proses ini dilaksanakan di dalam *Laminar Air Flow* (LAF). Proses pengenceran mengikuti metode yang digunakan oleh Wisdawati (2019). Sampel tanah ditimbang seberat 10 g, kemudian dilarutkan ke dalam 100 ml aquades. 1 ml suspensi rizosfer tanah bambu dilarutkan ke dalam 9 ml aquades pada tabung reaksi sehingga didapat pengenceran 10^{-1} . Suspensi pengenceran 10^{-1} diambil sebanyak 1 ml dengan mikropipet dan diencerkan pada tabung reaksi yang berisi 9 ml aquades sehingga didapatkan pengenceran 10^{-2} . Pengenceran bertingkat dilakukan dengan cara yang sama sampai dengan tingkat 10^{-9} . Setiap pengenceran yaitu 10^{-1} sampai dengan 10^{-9} suspensinya diambil sebanyak 0,1 ml kemudian ditumbuhkan dalam media PDA steril, selanjutnya dilakukan inkubasi

selama 3-7 hari. Setelah 3-7 hari setelah inokulasi (HSI) dapat dilakukan pengamatan pertumbuhan jamur dengan asumsi seluruh cendawan dari rizosfer tanaman bambu (*Bambusa sp.*) sudah tumbuh.

Pemurnian jamur hasil eksplorasi dilakukan dengan cara mengambil bagian miselium pada jamur menggunakan jarum ose, lalu dipindahkan pada media PDA steril. Tujuannya yaitu untuk memudahkan dalam pengamatan makroskopis maupun mikroskopis serta pengujian awal yang akan dilaksanakan. Pemurnian dilakukan pada setiap jenis jamur yang memiliki morfologi berbeda dilihat dari pengamatan koloni makroskopis sehingga dihasilkan biakan murni (Posangi & Bara 2014).

c. *Screening* uji hipersensitif

Uji hipersensitif dilakukan untuk melihat sifat patogenitas/ jamur rizosfer bambu yang telah diinjeksikan pada jaringan bagian bawah daun tanaman tembakau (*Nicotiana tobacum*). Suspensi pengujian dibuat dengan cara mengambil bagian jamur kemudian dilarutkan pada aquades steril. Perkembangan gejala diamati dengan tanda kemunculan bagian daun yang nekrotik dalam waktu 2x24 jam setelah injeksi (Rifai *et.al.* 2019). Hasil uji hipersensitif digunakan untuk menyeleksi isolat yang bersifat patogen sehingga tidak dilakukan pengukuran pertumbuhan diameter dan identifikasi mikroskopis.

d. Identifikasi jamur asal rizosfer bambu

Identifikasi jamur hasil eksplorasi dilakukan secara makroskopis dan mikroskopis sehingga dapat dilakukan pendugaan genus jamur rizosfer bambu. Pengamatan makroskopis dilakukan dengan mengamati secara langsung dari koloni yang berumur 7 HSI, sedangkan pengamatan mikroskopis dilakukan dengan metode *slide culture*. Pembuatan preparat *slide culture* dilakukan dengan cara menyiapkan alat seperti cawan petri, *object glass*, *cover glass* dan batang penahan *object glass* yang telah disterilkan. Selanjutnya, media PDA cair dituangkan pada cawan petri hingga memadat. Setelah media PDA memadat, *scalpel* steril digunakan untuk memotong media dengan ukuran 1x1 cm. Lalu, media tersebut dipindahkan pada bagian tengah *object glass* dalam cawan petri steril yang sudah

diisi dengan kapas yang basah untuk menciptakan ruang yang lembab. Tahap terakhir, cawan petri dibungkus dengan plastik wrap.

Pembuatan preparat *slide culture* dilakukan pada setiap isolat rizosfer bambu (*Bambusa* sp.). Seluruh proses pembuatan preparat dilakukan di LAF dan di dekat api bunsen dengan tujuan menghindari kontaminasi. Masa inkubasi pada masing-masing hasil *slide culture* selama 2-3 hari sebelum diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 40x.

3.4.5 Pelaksanaan percobaan kedua

a. *Screening* kecepatan pertumbuhan jamur rizosfer bambu

Pengukuran kecepatan pertumbuhan jamur dilakukan untuk melihat pertambahan pertumbuhan diameter koloni jamur. Kecepatan pertumbuhan jamur mengindikasikan virulensi dan potensi patogen, serta menunjukkan kerapatan miselium dan produksi konidia pada jamur, sehingga menunjukkan kemampuan jamur dalam mendominasi pertumbuhan di suatu medium. Pengukuran laju pertumbuhan jamur rizosfer bambu (*Bambusa* sp.) dilakukan di cawan petri yang berisi media PDA sebanyak 9 ml. Kemudian setiap jamur rizosfer diambil menggunakan *cork borer* dengan diameter 5 mm dan dipindahkan ke cawan petri yang telah diisi media 9 ml sebelumnya. Pengukuran vertikal dan horizontal koloni jamur dilakukan setiap 12 jam satu kali sampai koloni jamur menutupi seluruh cawan petri yaitu dibagi menjadi 5 interval antara lain 12 jam sampai 60 jam setelah inkubasi. 5 isolat jamur dari rizosfer bambu dengan pertumbuhan tercepat akan digunakan dalam uji daya hambat dan dilakukan identifikasi sampai tingkat genus.

b. Pengujian daya hambat pertumbuhan *Fusarium* sp secara *in vitro*

Pengujian secara *in-vitro* dilakukan dengan menggunakan metode *dual culture* dimana menghidupkan dua isolat antara jamur patogen *Fusarium* sp. dengan jamur yang didapatkan dari bambu (*Bambusa* sp.) di cawan petri steril yang diisi 9 ml media PDA. Pengambilan jamur dari biakan murni menggunakan *cork borer* 5 mm, sehingga ukuran awal setiap jamur sama. Adapun perlakuan jamur rizosfer calon agen hayati merupakan 5 (lima) isolat jamur yang telah melewati tahap *screening* atau penyeleksian dengan kriteria tidak menjadi patogen (uji hipersensitif) dan kecepatan pertumbuhan terbaik (*growth rate*). Selain itu, akan

ada perlakuan kontrol dimana pertumbuhan jamur patogen *Fusarium* sp. dibiakan secara mandiri pada cawan petri. Pengamatan dilakukan setiap hari dengan masa inkubasi selama 7 hari.

Dalam pelaksanaan uji daya hambat *dual culture* akan mendapatkan hasil terkait diameter koloni *Fusarium* sp. dan persentase daya hambat *Fusarium* sp. dengan perlakuan jamur rizosfer bambu (JRB).

3.5 Parameter pengamatan

3.5.1 Parameter pengamatan penunjang

Parameter penunjang merupakan pengamatan yang dilakukan saat penelitian, namun tidak dilakukan uji statistik pada hasil pengamatannya. Adapun variabel pengamatan penunjang penelitian ini yaitu uji hipersensitif, karakterisasi jamur berupa identifikasi makroskopis dan mikroskopis. Identifikasi makroskopis meliputi bentuk koloni, warna koloni, tampak depan, tampak belakang, dan tekstur koloni. Sedangkan identifikasi mikroskopis meliputi ada atau tidaknya konidia, dan bentuk konidia (bulat, lonjong, berantai, atau tidak beraturan) (Ariyono *et.al.* 2014).

Hasil pengamatan mikroskopis digunakan untuk menduga jenis jamur yang didapatkan berdasarkan buku *Illustrated Genera of Imperfect Fungi Fourth Edition* (Barnett & Hunter, 1998).

3.5.2 Parameter pengamatan utama

Pengamatan utama adalah pengamatan yang dilakukan pada setiap variabel yang datanya diuji secara statistik dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh dari setiap perlakuan yang diuji.

a. Kecepatan pertumbuhan koloni jamur rizosfer bambu (*Bambusa* sp.)

Pengukuran kecepatan pertumbuhan (*growth rate*) koloni jamur dilakukan untuk melihat pertumbuhan setiap 12 jam pada jamur rizosfer dengan cara mengukur diameter koloni jamur kemudian dirata-ratakan. Pengukuran diameter dilakukan dengan cara mengukur garis vertikal dan garis horizontal koloni. Pengamatan ini dilakukan menggunakan jangka sorong dalam periode waktu setiap 12 jam satu kali sampai ada koloni JRB yang memenuhi cawan petri setelah masa inkubasi. Perhitungan kecepatan pertumbuhan jamur menggunakan selisih antar

pertumbuhan setiap pengamatan. Adapun data yang diperoleh untuk diameter jamur rizosfer digunakan berdasarkan rumus Risdianto (2007) berikut :

$$D = \frac{D1 + D2}{2}$$

Keterangan :

D = Diameter koloni jamur

D1 = Jari-jari vertikal koloni jamur

D2 = Jari-jari horizontal koloni jamur

b. Diameter koloni *Fusarium* sp.

Pengukuran koloni *Fusarium* sp. hasil uji antagonis *dual culture* dilakukan menggunakan rumus Risdianto (2007) yaitu mengukur jari-jari vertikal dan horizontal.

$$D = \frac{D1 + D2}{2}$$

Keterangan :

D = Diameter koloni jamur

D1 = Jari-jari vertikal koloni jamur

D2 = Jari-jari horizontal koloni jamur

c. Uji daya hambat *Fusarium* sp.

Uji antagonis *dual culture* dilakukan untuk melihat persentase hambatan pertumbuhan *Fusarium* sp. dengan mengukur radial koloni jamur yang ditumbuhkan di media PDA menggunakan jangka sorong digital. Pelaksanaan pengamatan dilakukan setiap hari selama 7 hari setelah inkubasi (HSI). Adapun persentase hambatan patogen *Fusarium* sp. dapat dihitung dengan persamaan sebagai berikut (Seema & Devaki, 2012) :

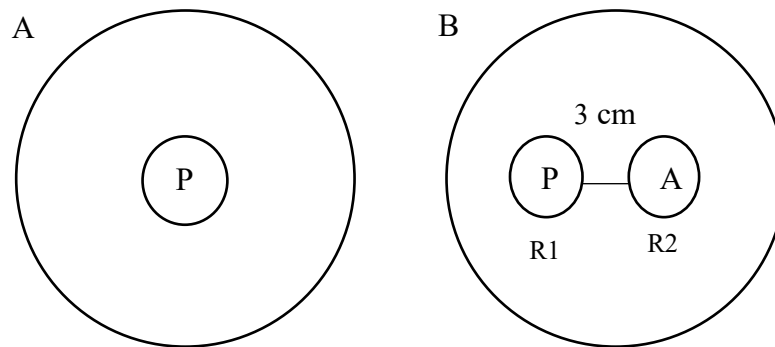
$$PH (\%) = \frac{R1-R2}{R1} \times 100\%$$

Keterangan :

PH = Persentase hambatan (%)

R1 = Diameter koloni *Fusarium* sp. Kontrol

R2 = Diameter koloni *Fusarium* sp. dengan perlakuan jamur rizosfer bambu



Gambar 3. Uji antagonis *dual culture*. A. kontrol, B. perlakuan JRB

Keterangan: P menunjukkan Koloni *Fusarium* sp., A menunjukkan koloni jamur rizosfer bambu (JRB).

Menurut Zivkovic *et.al.* (2010), persentase daya hambat dikategorikan menjadi 4 kelompok, yaitu :

- 1) 1-25% = rendah
- 2) 26-50% = sedang
- 3) 51-75% = tinggi
- 4) 76-100% = sangat tinggi.