

## **BAB III**

### **BAHAN DAN METODE**

#### **3.1 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian dilakukan dari 2 Juni dan 20 Juni 2014, di Balai Laboratorium Kesehatan Medan.

#### **3.2 Alat dan Bahan**

Alat –alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah laminar flow cabinet, autoclaf, oven, cawan petri, jarum ose, bunsen, pengaduk kaca, entkas, pinset, ose cincin, incubator, mikroskop, cover glas, gelas obyek, gelas ukur, tabung reaksi, pipet volum, erlemeyer, jangka sorong, botol media, shaker incubator, sentrifugasi, timbangan analitik, dan silet.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah pengambilan jamur *Fusarium oxysporum* pada cabai merah yang terserang penyakit. Jamur endofit yang diisolasi dari akar tanaman cabai merah (*Capsicum annum* L.) yang masih sehat, medium SDA (Saboroud Dextrose Agar), Larutan NaOCl (Sodium Hipoklorit) 1 %, Aquades steril, spirtus, kapas, alkohol 70 %, imersil oil, dan tissue.

#### **3.3 Metode Penelitian**

Metode yang digunakan adalah dengan metode eksperimen kualitatif, dimana hasil penelitian ini dapat dilihat dengan membandingkan interaksi antagonis antara jamur patogen dengan jamur endofit pada cabai merah.

### **3.4 Prosedur Kerja.**

#### **3. 4. 1 Tahap Pelaksanaan**

Pada tahap ini dilakukan persiapan alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini harus disterilisasikan terlebih dahulu.

#### **3. 4. 2 Pembuatan Media**

Ditimbang SDA sebanyak 22,8 gr, kemudian ditambahkan sebanyak 500 ml aquades pada media SDA. Setelah itu SDA dipanaskan dengan menambahkan aquades sambil mengaduk hingga mendidih. Kemudian dimasukkan kedalam cawan petri (10 buah), masing-masing 15 gr dan tutup dengan rapat tunggu sampai SDA membeku baru dapat digunakan.

##### **3. 4. 2. 1. Kontrol**

Pada tahap ini bagian tanaman cabai yang menjadi kontrol adalah akarnya. Kemudian akar tersebut dicuci dengan menggunakan air mengalir selama  $\pm$  5 menit setelah itu dipotong  $\pm$  2 cm. Setelah itu dilakukan sterilisasi permukaannya dengan memasukkan kedalam larutan alkohol 70 % selama  $\pm$  1 menit dan dilanjutkan kedalam larutan NaOCl 1 % selama  $\pm$  5 menit kemudian dikeringkan dengan tissue steril lalu akar di belah menjadi dua bagian, selanjutnya akar tersebut dibilas dengan aquades steril  $\pm$  1 menit diulang 2 kali, lalu ditempatkan di atas cawan petri berisi media SDA, perlakuan ini berfungsi sebagai kontrol.

##### **3. 4. 2. 2. Isolasi Jamur *Fusarium oxysporum* Pada Tanaman Cabai Merah (*Capsicum annum*)**

Cabai merah yang menunjukkan gejala umum berupa layu digali dengan sekop diambil pertanaman (termasuk seluruh perakarannya) diangkat, kemudian butiran-butiran tanah yang menempel dilepaskan dengan cara direndam didalam

air setelah itu secepatnya dimasukkan kedalam kantong plastik dan diberi label, kemudian dimasukkan kedalam termos pendingin. Setelah sampai di laboratorium sampel-sampel tanaman segera dipindah ke refrigerator bersuhu 4°C. Kemudian diambil bagian tanaman cabai merah yang terinfeksi terutama pada bagian akar tanaman cabai merah. Bagian akar yang terinfeksi di cuci hingga bersih pada air yang mengalir sampai tidak ada lagi butiran-butiran tanah yang masih menempel, lalu dipotong bagian akar tanaman cabai yang sudah bersih dengan ukuran 5 cm. Setelah itu dirajang hingga halus-halus bagian akar yang telah dipotong, lalu direndam selama ± 1 menit dengan alkohol 70 % kemudian tiriskan dengan kertas saring yang sudah disediakan. Setelah itu disediakan tabung erlemeyer yang berisi aquades 1 ml lalu dimasukkan rajangan akar tanaman cabai merah ke dalam tabung erlemeyer setelah itu dihomogenkan kemudian diamkan ± 1 menit. Setelah itu dituangkan kedalam cawan petri berisi SDA yang masih cair atau masih dalam kondisi hangat. Lalu dihomogenkan dengan cara memutar berbentuk angka 8 agar tercampur semua antara SDA dengan rajangan akar tanaman cabai merah. Kemudian diinkubasi selama 2 hari dalam inkubator pada suhu kamar.

### **3. 4. 2. 3. Isolasi Jamur Endofit dan identifikasi dari Akar Tanaman Cabai Merah**

Jamur endofit diisolasi dari tanaman cabai merah (*Capsicum annum* L.) sehat yang diambil dari akarnya. Kemudian pada bagian akar di potong dengan ukuran 5 cm. Setelah itu dirajang hingga halus-halus bagian akar yang telah dipotong, lalu direndam selama ± 1 menit dengan alkohol 70 % kemudian tiriskan dengan kertas saring yang sudah disediakan. Setelah itu disediakan tabung erlemeyer yang berisi aquades 1 ml lalu dimasukkan rajangan akar tanaman cabai

merah ke dalam tabung erlemeyer lalu dihomogenkan kemudian diamkan  $\pm$  1 menit. Setelah itu dituangkan kedalam cawan petri berisi SDA yang masih cair atau masih dalam kondisi hangat. Lalu dihomogenkan dengan cara memutar berbentuk angka 8 agar tercampur semua antara SDA dengan rajangan akar tanaman cabai merah. Kemudian diinkubasi selama 2 hari dalam inkubator pada suhu kamar. Kemudian jamur endofit yang digunakan untuk penelitian adalah jamur yang tumbuh dari dalam akar tanaman cabai merah yang telah dirajang-rajang halus (Simarmata, 2007). Setelah jamur endofit tumbuh pada media cawan petri lalu dilakukan identifikasi berdasarkan ciri-ciri makroskopis dengan cara melihat secara langsung bentuk dan warna koloni jamur endofit. Sedangkan pengamatan ciri-ciri mikroskopis dengan menggunakan binokuler.

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

Pilih salah satu dari beberapa jamur yang endofit yang tumbuh pada cawan petri dengan menggunakan ose jarum, lalu sampel miselium yang telah diambil diletakkan diatas objek glass yang sudah ditetesi dengan aquadest, kemudian tutup dengan cover glass sambil menekan secara perlahan-lahan agar tidak ada gelembung udara masuk. Setelah itu diamati dengan perbesaran 100 x kemudian setelah terlihat bentuk morfologi jamur diamati kembali dengan perbesaran 400 x dan ditetesi dengan minyak imersil oil agar morfologi dari jamur lebih jelas terlihat. Kemudian preparat jamur diidentifikasi dengan menggunakan buku identifikasi jamur karangan Barnett (1972)

#### **3. 4. 2. 4. Permurnian Jamur Endofit**

Setelah diidentifikasi dibawah mikroskop Binokuler jamur endofit, lalu dilakukan tahap pemurnian terhadap masing-masing jamur endofit dengan cara disuspensi. Ambil tabung erlemeyer yang berukuran 250 ml sebanyak 3 buah lalu isi dengan aquadest 2 ml masing-masing tabung. Lalu ambil cawan petri yang sudah ditumbuhi oleh jamur endofit kemudian ambil masing-masing tiap koloni jamur endofit yang berbeda-beda dengan menggunakan jarum ose cincin. Masing-masing koloni yang telah diambil dengan menggunakan jarum ose cincin dimasukkan ke dalam tabung erlemeyer lalu dihomogenkan agar masing-masing dari jamur endofit bercampur secara merata dengan aquadest. Setelah itu diambil cawan petri yang sudah berisi dengan SDA yang masih cair atau masih dalam kondisi hangat lalu hasil jamur yang telah dihomogenkan dimasukkan kedalam cawan petri. Setelah dimasukkan kedalam cawan petri lalu dihomogenkan dengan cara memutar berbentuk angka 8 agar merata pertumbuhan jamur endofitnya kemudian diinkubasi selama 2 hari pada suhu kamar.

#### **3. 4. 3. Uji Antifungi Terhadap Jamur *Fusarium oxysporum***

Setelah jamur patogen *Fusarium oxysporum* berhasil diisolat dari akar tanaman cabai merah yang terinfeksi dan beberapa jamur endofit berhasil diisolat dari akar tanaman cabai merah yang sehat. Kemudian masuk pada tahap uji antifungi antara jamur *Fusarium oxysporum* dengan jamur endofit. Menyiapkan media cawan petri yang berisi SDA sebanyak 32, lalu diberi garis tengah pada masing-masing cawan petri ini berfungsi untuk mempermudah ketika menghitung diameter pada jamur tersebut. Setelah media SDA membeku diberi label pada masing-masing media agar tidak terjadi penukaran antara jamur endofit yang satu

dengan jamur endofit yang lain. Lalu diambil masing-masing jamur endofit dan jamur *Fusarium oxysporum* dengan menggunakan ose jarum dan diletakkan pada posisinya masing-masing. Setelah itu diinkubasi selama 3 hari pada suhu kamar.

#### **3. 4. 3. 1. Pengukuran Zona Hambat**

Data diperoleh dari hasil masing-masing jamur endofit dan jamur *Fusarium oxysporum* yang telah diinkubasi selama 3 hari. Cara mengukur diameter zona hambat dengan menggunakan jangka sorong, diukur mulai dari titik dimana tumbuhnya koloni endofit sampai melewati batas garis tengah yang telah di beri tanda sampai batas menghambatnya jamur *Fusarium oxysporum*.

#### **3.5 Rancangan Penelitian**

Rancangan penelitian dilakukan dengan menggunakan pola Rancangan Acak Lengkap Faktorial (RAL) dengan dua faktor yang terdiri atas:

Faktor 1: Jamur patogen yang terdiri dari dua perlakuan yaitu:

P<sub>0</sub>: Tanpa jamur patogen.

P<sub>1</sub>: Dengan jamur patogen.

Faktor 2: Jamur endofit yang terdiri dari empat perlakuan yaitu:

E<sub>0</sub>: Tanpa jamur endofit

E<sub>1</sub>: Dengan jamur endofit *Aspergillus*

E<sub>2</sub>: Dengan jamur endofit *Penicillium*

E<sub>3</sub>: Dengan jamur endofit *Trichoderma*

Dari perlakuan diatas diperoleh 8 kombinasi yaitu:

P<sub>0</sub>E<sub>0</sub>          P<sub>0</sub>E<sub>1</sub>          P<sub>0</sub>E<sub>2</sub>          P<sub>0</sub>E<sub>3</sub>

P<sub>1</sub>E<sub>0</sub>          P<sub>1</sub>E<sub>1</sub>          P<sub>1</sub>E<sub>2</sub>          P<sub>1</sub>E<sub>3</sub>

Dimana:

$P_0E_0$  = Kontrol tanpa jamur endofit dan jamur patogen

$P_0E_1$  = Tanpa jamur patogen hanya jamur endofit (*Aspergillus*)

$P_0E_2$  = Tanpa jamur patogen hanya jamur endofit (*Penicillium*)

$P_0E_3$  = Tanpa jamur patogen hanya jamur endofit (*Trichoderma*)

$P_1E_0$  = Dengan jamur patogen tanpa jamur endofit

$P_1E_1$  = Dengan jamur patogen dan jamur endofit (*Aspergillus*)

$P_1E_2$  = Dengan jamur patogen dan jamur endofit (*Penicillium*)

$P_1E_3$  = Dengan jamur patogen dan jamur endofit (*Trichoderma*)

Berdasarkan dari 8 kombinasi perlakuan maka jumlah masing-masing dari perlakuan adalah 4 ulangan, dengan demikian maka diperoleh jumlah keseluruhan cawan petri yang di pakai adalah 32 cawan petri.

Data hasil penelitian dengan sidik ragam model linier sebagai berikut:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

$$i = 1, 2, 3, 4 \quad j = 1, 2 \quad k = 1, 2, 3, 4$$

Dimana:

$Y_{ijk}$  = Hasil pengamatan dari faktor ulangan ke-k pada faktor jamur patogen ke-i dan jamur endofit ke-j

$\mu$  = Nilai tengah rata-rata

$\alpha_j$  = Efek faktor jamur patogen ke-i

$\beta_k$  = Efek jamur endofit ke-j

$\epsilon_{ijk}$  = Efek galat yang disebabkan oleh faktor jamur patogen ke-i dan jamur endofit ke-j pada ulangan ke-k.

Jika dari hasil sidik ragam diperoleh pengaruh yang nyata, maka dilanjutkan dengan Uji Duncan (DMRT) pada taraf 5% (Steel and Torrie, 1993).

