

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode eksperimen karena terdapat suatu pengendalian perlakuan untuk memanipulasi objek penelitian disertai dengan adanya kontrol (Nasir, 1988: 74).

B. Desain Penelitian

Desain penelitian ini berupa pengamatan yang terdiri dari dua tahap. Tahap pertama yaitu isolasi dan identifikasi jamur *Trichoderma* dari media jamur tiram (serbuk gergaji). Tahap kedua yaitu penentuan umur inokulum jamur yang optimal, ditentukan dari kurva tumbuh masing-masing isolat jamur dan pengujian daya hambat masing-masing isolat *Trichoderma* terhadap *Fusarium sp.*

Rancangan penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan memberikan perlakuan beberapa isolat jamur *Trichoderma* terhadap *Fusarium sp.* isolat Kalimantan untuk mengetahui persentase hambatan pertumbuhan jamur *Fusarium sp.* yang terdiri dari lima perlakuan, yaitu:

1. *Fusarium sp.* isolat Kalimantan + *Trichoderma* isolat A
2. *Fusarium sp.* isolat Kalimantan + *Trichoderma* isolat B
3. *Fusarium sp.* isolat Kalimantan + *Trichoderma* isolat C
4. *Fusarium sp.* isolat Kalimantan + *Trichoderma* isolat D
5. *Fusarium sp.* isolat Kalimantan tanpa isolat *Trichoderma* (sebagai kontrol).

Masing-masing perlakuan dilakukan replikasi dengan menggunakan rumus menurut Gomez & Gomez (1995), yaitu:

$$T(r - 1) \geq 20 \text{ (db Galat)} \quad \text{Keterangan:}$$

$$5r - 5 \geq 20 \quad T = \textit{Treatment}$$

$$5r \geq 25 \quad r = \text{replikasi}$$

$$r \geq 5 \approx 6$$

Sehingga dapat diketahui replikat/ pengulangan dalam penelitian ini adalah sebanyak 6 kali.

C. Populasi dan Sampel

Populasi dan sampel berupa objek penelitian. Populasi yang digunakan adalah seluruh jamur *Fusarium sp.* isolat Kalimantan asal bawang daun. Sedangkan sampelnya adalah inokulum *Fusarium sp.* isolat Kalimantan asal bawang daun yang diberi perlakuan.

D. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Pendidikan Biologi FPMIPA UPI Jalan Dr. Setiabudhi no. 229 Bandung. Penelitian dilakukan selama 5 bulan, dari bulan Desember 2007 – Mei 2008.

E. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian dapat dilihat pada Tabel 3.1 sebagai berikut:

Tabel 3.1. Alat-alat penelitian

No.	Nama alat	Spesifikasi	Jumlah
1.	Autoklaf	Merek EYELA model HL36AE	1 unit
2.	Tabung reaksi	Merek Pyrex	75 buah
3.	Cawan Petri	Merek Pyrex, d = 9 cm	50 buah
4.	Erlenmeyer	Merek Pyrex, 250 mL	15 buah
5.	Botol vial	125 mL	25 buah
6.	Alumunium foil	36 cm ²	50 buah
7.	Rak tabung	-	4 buah
8.	Papan miring	-	4 buah
9.	Waterbath shaker	125 rpm	2 unit
10.	Timbangan analitik	Merek AND	1 unit
11.	Neraca	-	1 unit
12.	Pipet tetes	Merek pyrex	secukupnya
13.	Oven	-	1 unit
14.	Mikropipet 1mL, 5 mL, 10 mL	Merek Eppendorf	@ 1 buah
15.	Pinset	-	1 buah
16.	Karet gelang	-	secukupnya
17.	Plastik transparan	0,5 kg	secukupnya
18.	Pelubang gabus	-	1 buah
19.	Jarum ose	-	5 buah
20.	Kamera digital	JVC GR-D47AG	1 unit
21.	Mikroskop	cahaya	1 unit
22.	Mistar	30 cm	1 buah
23.	Gelas kimia	1 L	3 buah
24.	Hot plate with magnetic stirer	-	2 unit
25.	Inkubator	4 °C	1 unit
26.	Sumbat	Kapas lemak	100 buah
27.	Tissue gulung	Merek Nice	2 gulung
28.	Objek glass dan kaca penutup	-	1 boks
29.	Vortek	Merek SIBATA	1 unit
30.	Haemocytometer	-	1 unit

Adapun bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian dapat dilihat pada Tabel 3.2 sebagai berikut:

Tabel 3.2. Bahan-bahan penelitian

No.	Nama Bahan	Spesifikasi	Jumlah
1.	Aquadest	steril	6 L
2.	Kentang	-	1 kg
3.	Gula	pasir	100 g
4.	Agar batangan	-	100 g
5.	Antibiotik	Kloramfenicol	100 mg/l
6.	Serbuk gergaji	-	300 g
7.	Alkohol	70 %	250 ml
8.	Spirtus	-	250 ml
9.	Kertas saring	d = 9 cm	36 buah

F. Prosedur Penelitian

Penelitian ini dibagi menjadi beberapa tahapan:

1. Tahap persiapan, meliputi: persiapan alat dan bahan yang akan digunakan, pembuatan medium pertumbuhan jamur, sterilisasi, persiapan medium serbuk gergaji untuk isolasi jamur *Trichoderma*.
2. Tahap pra penelitian, meliputi:
 - a. Isolasi jamur dari substrat serbuk gergaji
 - b. Pembiakan isolat jamur pada PSA
 - c. Pemurnian dan perbanyakkan kultur
 - d. Identifikasi isolat jamur untuk mendapatkan isolat jamur *Trichoderma* sampai tingkat genus.
3. Tahap pelaksanaan penelitian, meliputi:
 - a. Penentuan umur inokulum dengan kurva tumbuh

- b. Pengujian daya hambat dari masing-masing isolat *Trichoderma* terhadap pertumbuhan jamur *Fusarium sp.*
- c. Pengamatan dan penghitungan persentase hambatan pertumbuhan jamur *Fusarium sp.*

G. Cara Kerja

1. Tahap pra penelitian

- a. Isolasi jamur dari substrat serbuk gergaji menurut Dennis (1968) adalah sebagai berikut:

- 1) Penyiapan isolat

Sampel serbuk gergaji sebanyak 10 gram diambil dan dihaluskan dengan mortar steril. Sampel tersebut disuspensikan dengan 99 ml aquades steril, kemudian dihomogenkan sehingga diperoleh suatu suspensi.

- 2) Pengenceran

Suspensi yang diperoleh sebanyak 1 ml ditambah dengan 9 ml aquades steril digunakan sebagai tingkat pengenceran 10^{-1} , kemudian diencerkan secara berseri sampai tingkat pengenceran 10^{-3} dengan mengambil 1 ml suspensi sebelumnya yang dimasukkan ke dalam 9 ml aquades steril yang baru.

- 3) Pemiakan isolat jamur pada PSA

Suspensi pada tingkat pengenceran 10^{-3} ditanam sebanyak 2 kali pada medium PSA dalam cawan Petri. Penanaman dilakukan dengan cara memipet 1 ml suspensi ke dalam cawan Petri, kemudian dituangkan 12 ml medium PSA

(temperatur medium 40 – 45 °C), dihomogenkan dan dibiarkan beku. Setelah itu, diinkubasi pada suhu ruangan selama 3 – 7 hari.

4) Pemurnian dan perbanyakkan kultur

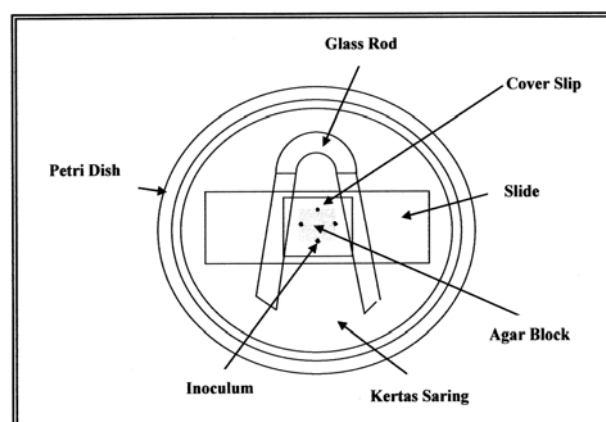
Diambil 1 ose biakan jamur dari satu koloni yang tumbuh pada cawan Petri, kemudian dinokulasikan pada medium PSA miring dalam tabung reaksi dan diinkubasi pada suhu ruangan selama 3 – 7 hari.

5) Identifikasi isolat jamur *Trichoderma*

Pengamatan morfologi isolat yang diperoleh dilakukan secara makroskopis dan mikroskopis dengan mengacu pada kunci determinasi jamur (Von Arx, 1974: 185 – 189). Secara makroskopis diamati warna dan bentuk koloni. Sedangkan secara mikroskopis diamati struktur konidia, bentuk spora dan hifa dengan metode mikrokultur (*slide culture*) seperti yang terlihat pada Gambar 3.1 (Stevens, 1974: 154; Onions, *et al.*, 1981: 301). Adapun prosedur dalam pembuatan mikrokultur (*slide culture*) untuk identifikasi jamur secara mikroskopis (Duncan *dalam* Stevens, 1974: 154), yaitu:

- a) Cawan Petri disiapkan dengan bagian dalamnya diberi kertas saring berbentuk bundar (Φ 9 cm). Pada bagian atas kertas saring tersebut diletakkan tiga buah batang kayu berbentuk segitiga, selanjutnya di atas batang tersebut diletakkan sebuah gelas objek beserta penutupnya.
- b) Cawan Petri tersebut dibungkus dengan kertas dan disterilisasi selama 15 menit dalam autoklaf 121 °C dengan tekanan 1,5 lbs .
- c) Medium PSA dicairkan sebanyak 5 ml dan dimasukkan ke dalam cawan Petri steril, dibiarkan beku.

- d) Medium PSA tersebut dibuat blok $\pm 1 \text{ cm}^2$ dan diambil dengan pinset, kemudian blok PSA tersebut diletakkan di atas gelas objek secara aseptik.
- e) Inokulum biakan murni jamur diambil 1 ose dengan menggunakan jarum ose dan diinokulasikan di keempat bagian sisi dari blok PSA, kemudian ditutup dengan kaca penutup.
- f) Aquades steril diteteskan pada bagian kertas saring dalam cawan Petri untuk memberikan kelembaban yang optimum bagi pertumbuhan jamur.
- g) Mikrokultur tersebut diinkubasi dalam suhu ruangan selama 3 - 7 hari, dilakukan pengamatan menggunakan mikroskop dan selama pengamatan selalu dijaga kelembabannya dengan menambahkan aquades steril apabila kertas saring mulai mengering.
- h) Mikrokultur diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 400x. Pengamatan dilakukan terhadap struktur miselium, spora/ konidianya dan badan penghasil spora.
- i) Selanjutnya dilakukan pengambilan gambar dari masing-masing isolat dengan menggunakan kamera digital untuk diidentifikasi.



Gambar 3.1. *Slide culture*
Sumber: Stevens, 1974

2. Tahap pelaksanaan penelitian

a. Penentuan umur inokulum dengan kurva tumbuh menurut Hamdiyati (1999: 23 - 24) adalah sebagai berikut:

1) Pembuatan kurva tumbuh isolat jamur

Pembuatan kurva tumbuh bertujuan untuk menentukan umur inokulum isolat jamur terbaik dalam medium pertumbuhan. Penentuan umur optimum inokulum dibuat berdasarkan kurva pertumbuhan berupa hubungan antara waktu (sumbu x) dengan berat kering biomassa (sumbu y).

Sebanyak 10 ml aquades steril dimasukkan ke dalam isolat jamur yang telah dikultur pada PSA miring selama lima hari. Setelah itu dihomogenkan dengan vortex selama 1 menit agar sporanya terlepas dan kemudian diambil 1 ml suspensi untuk dihitung sporanya pada *Haemocytometer*. Jumlah spora yang diharapkan adalah $10^6 - 10^8$ spora/ml. Suspensi spora sebanyak 10 ml diambil dan dimasukkan ke dalam medium pertumbuhan (*Potato Sucrose*) sebanyak 100 ml. Kemudian diinkubasi selama 3 hari pada suhu ruangan.

Setelah itu, diambil 10 % biakan dari medium pertumbuhan 100 ml dan dimasukkan ke dalam 250 ml medium pertumbuhan, diinkubasi selama 3 hari pada suhu ruangan. Selanjutnya diambil kembali 10 % inokulum dan dimasukkan ke dalam 100 ml medium pertumbuhan. Suspensi tersebut di shaker dengan kecepatan 125 rpm pada suhu ruangan selama 7 hari pengamatan. Pengambilan cuplikan dilakukan setiap 24 jam sekali dengan cara disaring menggunakan kertas saring yang sudah diketahui berat keringnya. Kemudian disimpan dalam oven dengan suhu 80 °C selama 24 jam/ lebih dan ditimbang berat keringnya sampai

konstan, sehingga didapatkan biomassa jamur dari hasil selisih berat kertas saring yang ditambah jamur dengan berat kering kertas saring. Perhitungan berat kering biomassa jamur dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan.

2) Pembuatan suspensi isolat jamur

Kultur spora isolat jamur yang telah dipanen sesuai waktu permanen terbaik berdasarkan kurva tumbuh, selanjutnya autoclave dan disentrifugasi. Supernatan dibuang, pelet dibilas dengan aquades steril 3 kali. Pelet yang telah dicuci ditambahkan aquades sejumlah volume pelet, dan di autoclave kembali. Pelet hasil autoclave ini dianggap mempunyai konsentrasi 100%. Kemudian pellet dilarutkan kembali ke dalam aquades sampai volumenya 100 ml, untuk mendapatkan suspensi spora isolat jamur murni sebesar 100 ml.

b. Uji daya hambat menurut Djatnika & Nuryani (1993: 626) adalah sebagai berikut:

Pengujian daya hambat berbagai isolat jamur *Trichoderma* dilakukan untuk mengetahui persentase hambatan pertumbuhan *Fusarium sp.* Pengujian daya hambat dilakukan dengan menggunakan metode biakan ganda (*dual culture*) menggunakan pelubang gabus.

Medium PSA yang telah beku dicairkan didalam penangas air, kemudian didinginkan sampai mencapai suhu 40 – 45 °C. Disiapkan 5 buah cawan Petri steril yang telah diberi label untuk masing-masing isolat jamur *Trichoderma* dan kontrol. Kemudian, PSA yang telah cair dimasukkan kedalam masing-masing cawan Petri.

Inokulum *Fusarium sp.* dalam medium PSA umur 7 hari diambil dengan menggunakan alat pelubang gabus (6 mm) dan dipindahkan ke dalam medium PSA yang baru. Dalam waktu bersamaan ditumbuhkan isolat *Trichoderma sp.* umur inokulum 5 – 6 hari dengan jarak 3 cm. Pada kontrol, tidak diberi perlakuan penambahan isolat jamur *Trichoderma* hanya menginokulasi isolat jamur *Fusarium* pada medium PSA. Kontrol digunakan untuk mengetahui rata-rata jari-jari koloni *Fusarium* sehingga dapat dilihat adanya perbedaan antara kontrol dan perlakuan. Kemudian diinkubasi pada suhu ruangan selama 7 hari. Dilakukan pengulangan sebanyak 6 kali.

c. Pengamatan dan penghitungan persentase hambatan pertumbuhan jamur *Fusarium sp.*

Dilakukan pengamatan dan penghitungan yang meliputi jari-jari koloni *Fusarium sp.* yang berhadapan dengan koloni *Trichoderma* dan yang berlawanan dengan koloni *Trichoderma*, sehingga dapat diperoleh persentasenya. Pengamatan dimulai sejak hari pertama setelah perlakuan sampai koloni memenuhi cawan Petri.

Jari-jari koloni *Fusarium sp.* yang berhadapan dengan koloni *Trichoderma* dan yang berlawanan dengan koloni *Trichoderma* pada tiap perlakuan per cawan Petri dihitung dengan menggunakan mistar. Dalam menentukan persentase hambatan yaitu dapat dihitung dengan rumus Fokkema (Skidmore, 1976 dalam Djatnika, 1992: 102) sebagai berikut:

$$I = \frac{(r_1 - r_2)}{r_1} \times 100\%$$

ket: I = persentase hambatan

r_1 = jari-jari koloni *Fusarium* ke arah yang berlawanan dengan koloni *Trichoderma*

r_2 = jari-jari koloni *Fusarium* ke arah yang berhadapan dengan koloni *Trichoderma*

H. Analisis Data

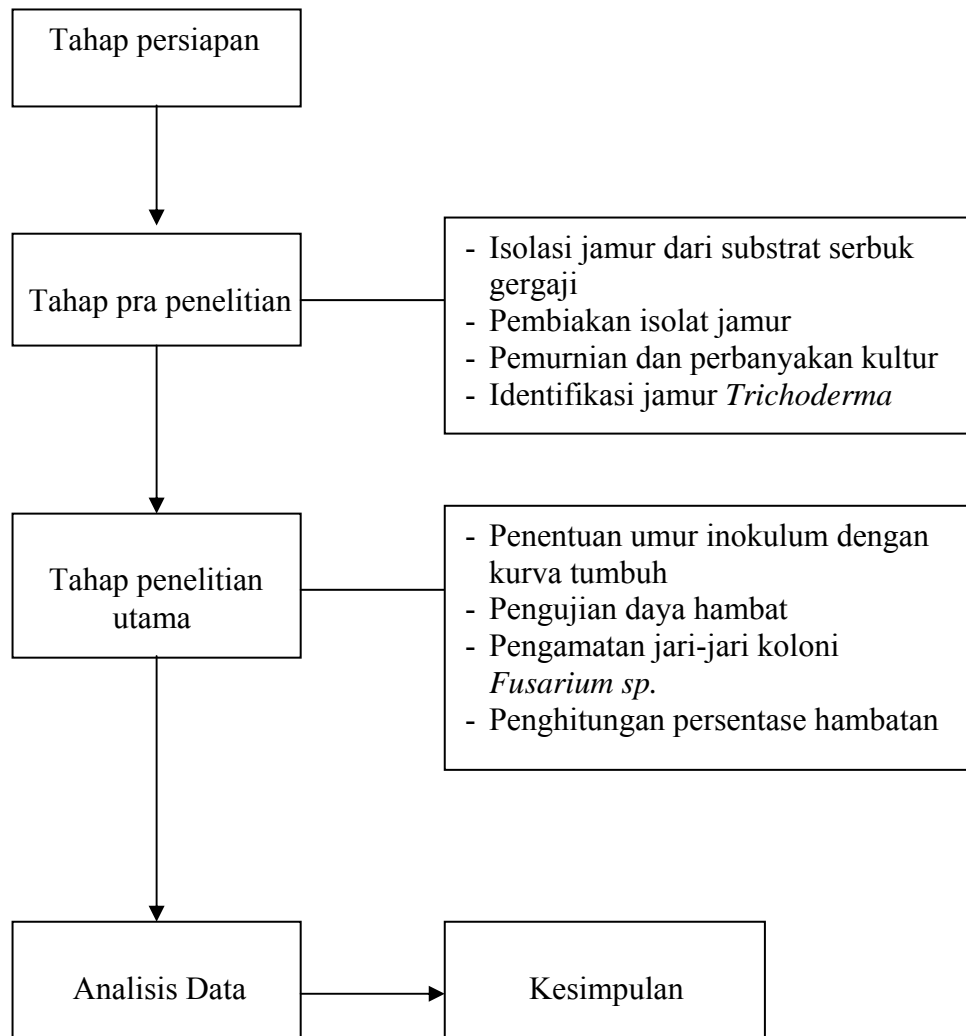
Pada tahap pra penelitian yakni isolasi dan identifikasi jamur *Trichoderma*, parameter yang diamati adalah pertumbuhan dari isolat jamur *Trichoderma sp.* Isolat jamur yang didapat diamati secara makroskopis yaitu, meliputi: warna dan bentuk koloni jamur, sedangkan pengamatan secara mikroskopis meliputi bentuk hifa, struktur konidia dan bentuk spora.

Pada tahap penelitian inti, masing-masing isolat jamur ditentukan umur inokulumnya dengan pembuatan kurva tumbuh. Hasil dari kurva tumbuh tersebut dapat diketahui umur inokulum isolat jamur yang optimal untuk dijadikan perlakuan.

Pada pelaksanaan uji daya hambat *Trichoderma* terhadap pertumbuhan jamur *Fusarium*, didapatkan data berupa jari-jari koloni *Fusarium sp.* yang berhadapan dengan koloni *Trichoderma* dan yang berlawanan dengan koloni *Trichoderma*, sehingga dapat diperoleh persentase hambatannya dan rata-rata jari-jari koloni jamur *Fusarium* yang tidak diberi perlakuan sebagai kontrol. Masing-masing perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak 6 kali.

Data pengamatan yang telah diperoleh dianalisis dengan menggunakan program *SPSS versi 12.0 for window*, terlebih dahulu dilakukan uji normalitas dengan menggunakan *Kolmogorov-Smirnov* untuk mengetahui kenormalan distribusi data, kemudian dilakukan uji homogenitas dengan menggunakan *Levene Test* untuk mengetahui variansi dari data hasil eksperimen dan data kontrol. Jika variansi dari data tersebut normal dan homogen, maka untuk mengetahui kemampuan *Trichoderma spp.* dalam menekan pertumbuhan jamur *Fusarium sp.* isolat Kalimantan asal bawang daun secara *in vitro* dilakukan analisis menggunakan *One-Way ANOVA*. Jika uji F akhir menunjukkan perbedaan persentase hambatan koloni jamur yang signifikan, maka dilakukan uji yang lebih sensitif yaitu uji *Tukey* (Trihendradi, 2004: 110).

I. Alur Penelitian



Gambar 3.2 Alur Penelitian