

3.3.2 Metode Penelitian

Rancangan percobaan dalam penelitian ini adalah rancangan acak lengkap (RAL) 1 faktor yaitu eksplorasi mycovirus pada 6 isolat *Cylindrocladium* sp. setiap isolat diulang 3 kali sehingga diperoleh 18 unit.

Model linear rancangan acak lengkap yang digunakan adalah :

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

Dimana :

i = 1,2,3,4,5,6

j = 1,2,3 ulangan

Y_{ij} = Nilai pengamatan pada perlakuan ke i , ulangan ke j

μ = Nilai tengah umum

T_i = Pengaruh perlakuan ke- i

ϵ_{ij} = Pengaruh acak isolat *Cylindrocladium* sp. ke- j yang memperoleh perlakuan ke- i

3.4. Pelaksanaan Penelitian

3.4.1 Karakteristik Morfologi

Karakteristik morfologi dilakukan dengan membiakkan 6 isolat terpilih *Cylindrocladium* pada 20 ml media padat *Potato Sukrosa Agar* (PSA) di dalam petridish pada suhu 27⁰C selama 9 hari. Seluruh isolat diberi label sehingga akan memudahkan pengamatan. Adapun kode isolat *Cylindrocladium* yang terpilih yaitu:

A isolat 083 *Cyllindrocladium* dari Ep 947 Wk

B isolat 069 *Cylindrocladium* dari *Eucalyptus pellita* projenik

C isolat 015 *Cylindrocladium* dari *Eucalyptus pellita* di Nursery

D isolat 057 *Cylindrocladium*-gelombang dari *acasia crassikarpa*.

E isolat 071 C *Cylindrocladium* dari *Eucalyptus pellita*

F isolat 101 *Cylindrocladium* dari Ep 6185.

3.4.2 Uji Virulensi

Uji virulensi dilakukan dengan cara menginokulasikan isolat *Cylindrocladium* pada daun tanaman *Eucalyptus* yang berumur 4 bulan. Masing-masing perlakuan diulang sebanyak tiga kali. Daun tanaman *Eucalyptus* dilukai menggunakan jarum, isolat yang telah dipersiapkan diambil menggunakan kawat ose dengan ukuran 3 mm. Kemudian isolat *Cylindrocladium* diinokulasikan pada bagian yang dilukai, bagian yang diinokulasi dibalut dengan menggunakan selotip selama 7 hari.



Gambar 3.1 Uji Virulensi pada daun *Eucalyptus pellita*

3.4.3 Ekstraksi RNA

Ekstraksi RNA Total *Cylindrocladium* dilakukan dengan menggunakan Presto™ Mini RNA Yeast Kit Geneaid. Cara ekstraksi dilakukan sesuai dengan prosedur yang diinstruksikan oleh perusahaan.

- a. Miselium dipanen dengan cara menggores bagian permukaan dengan scalpel (0,04 - 0,1 g) kemudian dibekukan di dalam nitrogen cair, selanjutnya dihaluskan dengan menggunakan mortar hingga menjadi bubuk.
- b. RB Buffer 500 µl ditambahkan untuk membentuk bubur, kemudian dipindahkan ke tabung mikrosentrifug ukuran 1,5 ml dan diletakkan pada es batu.
- c. Lima µl β-mercaptoethanol ditambahkan, kemudian divortex. Selanjutnya di sentrifugasi dengan kecepatan 12000 rpm selama 3 menit.
- d. Supernatan dipindahkan pada tabung mikrosentrifug yang baru, lalu ditambahkan etanol 70% sebanyak 900 µl, tabung dibolak-balikkan secara perlahan. Kemudian campuran dipipet untuk dipindahkan ke RB Kolom dan dilanjutkan dengan sentrifugasi 12.000 rpm selama 1 menit, buang fase air

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.

b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar UIN Suska Riau.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin UIN Suska Riau.

yang berada di bawah. Masukkan lagi campuran yang tersisa kedalam RB Kolom yang sama, kemudian sentrifugasi lagi 12.000 rpm selama 1 menit, selanjutnya fase air yang berada dibawah dibuang.

- e. DNase 100 µl ditambahkan kedalam RB Kolom, kemudian inkubasi pada suhu ruang selama 10 menit.
- f. Selanjutnya 400 µl W1 Buffer ditambahkan ke dalam RB Kolom dilanjutkan dengan sentrifugasi 12.000 rpm selama 1 menit, kemudian fase airnya dibuang.
- g. Wash Buffer dimasukkan kedalam RB Kolom sebanyak 600 µl, kemudian sentrifugasi 12.000 rpm selama 1 menit, fase airnya dibuang. Proses ini dilakukan sebanyak dua kali. Selanjutnya RB kolom disentrifugasi lagi 12.000 rpm selama 3 menit.
- h. Saringan RB Kolom dimasukkan ke dalam tabung mikrosentifug yang baru, lalu ditambahkan RNase-free Water sebanyak 50 µl tepat di bagian tengah saringan dan diinkubasi selama 3 menit pada suhu ruang.
- i. Terakhir RB Kolom disentrifugasi 12.000 rpm selama 1 menit untuk mendapatkan RNA murni.

3.4.4 Visualisasi Hasil Ekstraksi RNA (Elektroforesis)

Gel agarosa 0,5 % dibuat dengan melarutkan 0,5 g agarosa dalam 100 ml TAE-DEPC 1x, dipanaskan hingga mendidih, kemudian ditambahkan 4 µl etidium bromid lalu didinginkan sehingga suhunya menjadi 40-50⁰ C, selanjutnya dituang pada baki gel agarosa dan dibiarkan hingga memadat. Gel agarosa diletakkan dalam elektroforesis *chamber* dan direndam TAE-DEPC 1x. Sampel RNA 25 µl dicampur dengan *loading dye* sebanyak 5 µl. Campuran ini dimasukkan kedalam sumul gel agarosa sebanyak 12 µl, lalu elektroforesis dimulai dengan medan listrik 100 volt selama 80 menit. Pita-pita RNA diamati dengan UV transluminator.

3.5. Parameter Pengamatan

3.4.4 Karakteristik morfologi

Karakteristik morfologi yang diamati diantaranya adalah warna koloni, miselium udara dan profil koloni. Pengamatan dilakukan setiap hari hingga hari koloni memenuhi cawan petri secara maksimal.

3.4.5 Laju pertumbuhan koloni

Laju pertumbuhan cendawan diketahui dengan cara mengukur pertambahan diameter koloni (mm) masing-masing cendawan setiap hari sampai miselium memenuhi cawan petri secara maksimal 9 hari.

3.4.6 Uji virulensi

Diameter infeksi dilakukan dengan cara mengukur lebar dan panjang lesio pada daun *Eucalyptus* setiap hari sampai hari ke-7 hsl dengan menggunakan *skate mate*.

3.4.7 Hasil Ekstraksi RNA

Hasil elektroforesis berupa gambar pita-pita RNA diamati dan diambil gambarnya dengan UV transluminator.

3.5 Analisis Data

3.5.1 Analisis deskriptif

Analisis deskriptif dilakukan terhadap karakter morfologi dari 6 isolat cendawan *Cylindrocladium* dan hasil visualisasi RNA virus.

3.5.2 Analisis kuantitatif

Menurut Supiyani (2015) Analisis kuantitatif dilakukan terhadap laju pertumbuhan koloni di petri dan lesio infeksi pada daun tanaman *Eucalyptus Pellita*. Rancangan percobaan uji laju pertumbuhan isolat dilakukan dengan RAL (rancangan acak lengkap) perlakuan 6 isolat cendawan masing-masing 3 ulangan. Analisa statistik dengan analisa sidik ragam RAL faktor tunggal dan uji lanjut DMRT dapat dilihat pada Tabel 3.1. Sidik Ragam Rancangan Acak Lengkap

Hak Cipta Diindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.

b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar UIN Suska Riau.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin UIN Suska Riau.

| Sumber Keragaman (SK) | Derajat Bebas (DB) | Jumlah Kuadrat (JK) | Kuadrat Tengah (KT) | F Hitung | F tabel | |
|-----------------------|--------------------|---------------------|---------------------|----------|---------|----|
| | | | | | 5% | 1% |
| Perlakuan | t - 1 | JKP | KTP | KTP/KTG | | |
| Galat | t (r-1) | JKG | KTG | | | |
| Total | (rt - 1) | JKT | | | | |

Keterangan:

$$\text{Faktor Koreksi (FK)} = \frac{Y_{..}^2}{t \cdot r}$$

$$\text{Jumlah Kuadrat Total (JKT)} = \sum Y_{ij}^2 - \text{FK}$$

$$\text{Jumlah Kuadrat Perlakuan (JKP)} = \frac{\sum Y_{ij}}{r} - \text{FK}$$

$$\text{Jumlah Kuadrat Galat (JKG)} = \text{JKT} - \text{JKP}$$

Jika perlakuan berbeda nyata maka dilakukan uji lanjut dengan uji lanjut dengan Uji Jarak Duncan (UJD) pada taraf 5%. Model Uji Jarak Duncan yaitu:

$$\text{UJD}\alpha = R\alpha (\rho, \text{db galat}) \times \sqrt{\text{KTG}/\text{Ulangan}}$$

Keterangan:

α = Taraf uji nyata

ρ = Banyaknya perlakuan

R = Nilai dari tabel Uji Jarak Duncan (UJD)

KTG = Kuadrat Tengah Galat

Hak Cipta Diindungi Undang-Undang

1. Diarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.

b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar UIN Suska Riau.

2. Diarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin UIN Suska Riau.