

III. MATERI DAN METODE

3.1. Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium *Plant Protection Section*, PT. Arara Abadi, Kecamatan Tualang, Kabupaten Siak. Pada bulan November 2017 – Februari 2018.

3.2. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan adalah *laminar air flow*, *microskop*, *shaker*, *incubator*, *autoclave*, *vortex*, timbangan, tabung reaksi, erlenmeyer, *petridish*, kawat ose (lup), *cork borer*, mikropipet, *glassbeed*, kamera dan alat tulis.

Bahan yang digunakan adalah sampel tanah gambut dari Desa Wonosari Kecamatan Bengkalis Kabupaten Bengkalis, mikroorganisme target *Fusarium* sp yang berasal dari koleksi Laboratorium *Plant Protection Section* PT. Arara Abadi. Media yang digunakan yaitu media *Glycerol Yeast Extract Agar* (GYEA), dan media *Potato Sucrose Agar* (PSA). Bahan tambahan lainnya yaitu larutan garam fisiologis (NaCl) 0,85%, antifungi *Cyclohexamide* 1%, aquades, dan *Alcohol* 70%.

3.3. Metodologi

Metode yang digunakan dalam penelitian ini merupakan metode observasi, yaitu dengan mengambil sampel tanah gambut yang ditentukan dengan cara *purposive sampling* (penentuan titik sampel) dengan menentukan jenis vegetasi tumbuhan, di antaranya adalah: vegetasi pohon-pohonan berdaun lebar, vegetasi paku-pakuan, vegetasi palem-paleman, dan vegetasi tumbuhan merambat dari Desa Wonosari Kecamatan Bengkalis Kabupaten Bengkalis. Melakukan pengenceran sampel tanah gambut, mengisolasi serta mengidentifikasi Actinomycetes yang didapat secara makroskopis dan mikroskopis. Selanjutnya melakukan peremajaan isolat *Fusarium* sp, dan uji *Dual culture* dengan mengukur diameter zona bening di sekitar isolat Actinomycetes secara *in-vitro*.

3.4. Pelaksanaan

3.4.1. Pengambilan Sampel

Lokasi pengambilan sampel dilakukan di areal tanah Negara bebas (Hutan) seluas 10 Ha pada tanah gambut hutan Wonosari Desa Wonosari Kecamatan Bengkalis Kabupaten Bengkalis. Penentuan sampel tanah adalah dengan cara ditentukan secara *purposive sampling* (penentuan titik sampel). Penentuan titik sampel ditentukan dengan cara memilih sejumlah vegetasi tumbuhan yang menurut pengamatan dapat mewakili jenis vegetasi tumbuhan seluruh areal lahan percobaan. Pengambilan titik sampel dibagi dalam 4 macam tumbuhan, di antaranya adalah : vegetasi pohon-pohonan, vegetasi paku-pakuan, vegetasi palem-paleman dan vegetasi tumbuhan merambat. Pengambilan sampel tanah yang digunakan adalah dengan cara diambil secara acak. Pada setiap macam tumbuhan dilakukan pengambilan 2 titik sampel dengan kedalaman 0 – 30 cm sehingga diperoleh 8 titik sampel. Penentuan titik sampel ditentukan dengan cara membagi 2 lahan yaitu, lahan luar dan lahan dalam dengan jarak 5 Ha. Titik pengambilan sampel dapat dilihat pada gambar 3.1.



Gambar 3.1. Titik Pengambilan Sampel Tanah

Pengambilan sampel dilakukan dengan menggunakan bor tanah yang sudah bersih dan steril. Lokasi pengambilan sampel dibersihkan dari serasah, kemudian bor dibersihkan dengan air dan disiram dengan alkohol 70%. Selanjutnya melakukan pengambilan tanah dengan menggunakan bor yang

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

Hak Cipta Diindungi Undang-Undang

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

ditekan kedalam tanah, lalu tanah yang berada di dalam bor diambil menggunakan spatula. Sampel tanah yang diambil dimasukkan ke dalam plastik sampel, melakukan hal yang sama saat pengambilan titik sampel selanjutnya. Sampel yang telah ditutup rapat diberi label dan kemudian dibawa ke Laboratorium Plant Protection Section PT. Arara Abadi.

3.4.2. Sterilisasi Alat

Peralatan yang akan digunakan untuk kegiatan penelitian terlebih dahulu disterilkan dengan cara dicuci sampai bersih dan ditiriskan hingga kering. Peralatan berbahan gelas dibungkus dengan plastik dan peralatan berbahan plastik dibungkus dengan kertas dan disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 20 menit.

3.4.3. Pembuatan dan Sterilisasi Media

A. Media GYEA

Media *Glycerol Yeast Extract Agar* (GYEA) digunakan untuk isolasi dan purifikasi Actinomycetes. Komposisi media GYEA (g/L) adalah *Yeast extract* 2 g, K_2HPO_4 1 g, Agar 20 g, dan *Glycerol* 5 mL, *Cyclohexamide* 1% ditambahkan sebelum media digunakan.

Cara membuat media adalah seluruh bahan kecuali agar dimasukkan ke dalam wadah dan ditambahkan air hingga 1 L, kemudian dipanaskan menggunakan Microwave. Setelah homogen masukkan media ke dalam Erlenmeyer yang sudah terdapat agar. Erlenmeyer ditutup menggunakan plastik dan kertas dan diikat menggunakan tali. Media kemudian disterilkan di dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 20 menit.

B. Media PSA

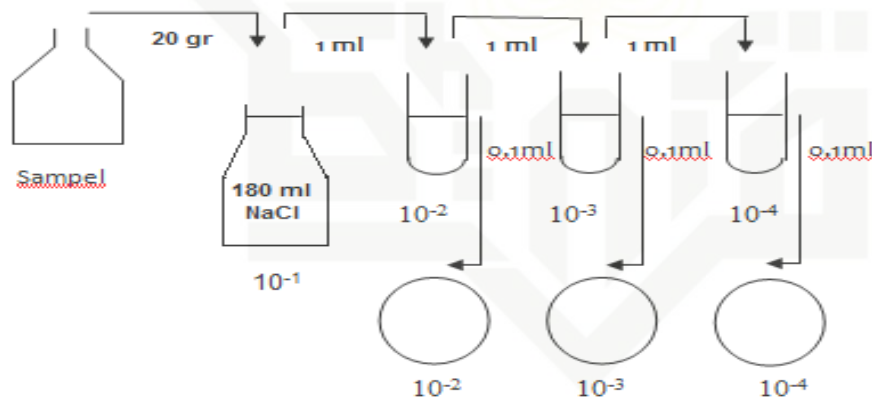
Media *Potato Sucrose Agar* (PSA) digunakan untuk peremajaan *Fusarium sp* dan untuk uji aktivitas. Komposisi media PSA (g/L) yaitu Kentang 200 g, *Sucrose* 20 g dan Agar 20 g. Cara membuatnya adalah kentang dikupas dan dipotong-potong menjadi sebesar potongan dadu dengan ukuran 1 cm x 1 cm, lalu ditambahkan air sebanyak 1 L dan dimasukkan ke dalam Microwave hingga mendidih sampai kentang lunak. Air rebusan tersebut kemudian disaring dan

diambil sarinya. Seluruh bahan dan sari pati kentang dimasukkan ke dalam Erlenmeyer. Erlenmeyer ditutup menggunakan plastik dan kertas dan diikat menggunakan tali. Media kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C, tekanan 1 atm selama 20 menit.

3.4.4. Isolasi dan Karakterisasi Actinomycetes

Isolasi Actinomycetes dilakukan dengan mengambil gambut dari Desa Wonosari Kecamatan Bengkalis Kabupaten Bengkalis. Gambut terlebih dahulu dipanaskan menggunakan oven dengan suhu 40°C selama 1 jam. Pemanasan ini bertujuan untuk mencegah pertumbuhan bakteri lain (Ambarwati dan Azizah, 2009), mencegah pertumbuhan cendawan dan untuk mendapatkan Actinomycetes yang tahan terhadap lingkungan ekstrem.

Gambut ditimbang sebanyak 20 g dan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer berisi larutan garam fisiologis (NaCl 0,85%) sebanyak 180 mL. Larutan tersebut digoyang menggunakan *shaker* dengan kecepatan 120 rpm selama 20 menit. Larutan kemudian diencerkan dengan pengenceran 10^{-2} , 10^{-3} dan 10^{-4} .



Gambar 3.2. Metode Pengenceran.

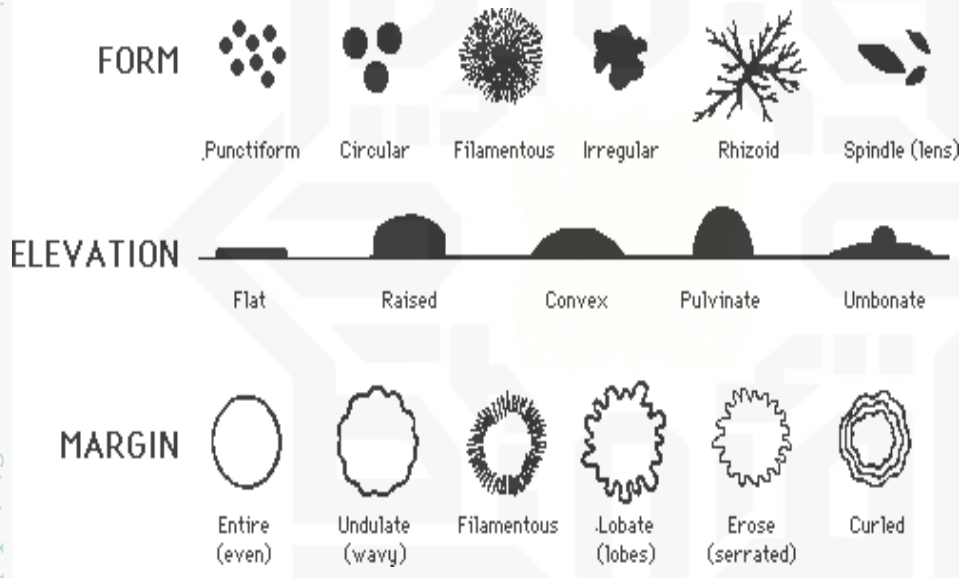
Masing-masing pengenceran diinokulasi ke *petridish* yang telah berisi media GYEA sebanyak 0,1 mL, kemudian diinkubasi di dalam *incubator* dengan suhu 27°C selama 7 hari. Isolat yang tumbuh dan diduga Actinomycetes selanjutnya dimurnikan pada media GYEA dengan menggunakan metode *kuadran* (teknik menggores 4 kali zig-zag) dan diinkubasi selama 7 hari di dalam *incubator* dengan suhu 27°C.

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

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

3.4.5. Pengamatan Karakter Fisik Actinomycetes

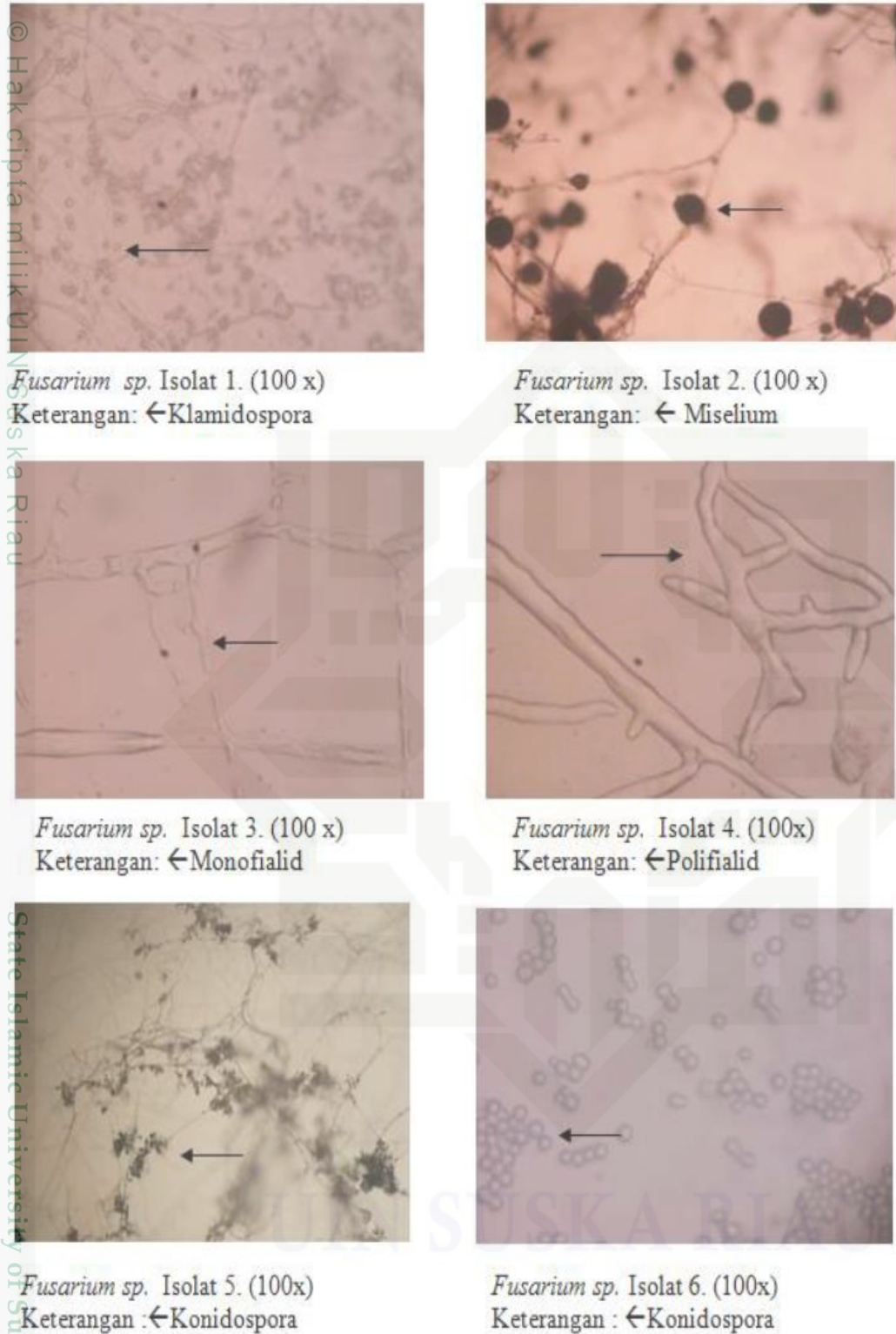
Dalam penelitian ini Actinomycetes yang didapat akan dikarakterisasi dengan pengamatan makroskopis dan mikroskopis. Pengamatan makroskopis yaitu mengamati ciri-ciri koloni meliputi bentuk isolat, tepi isolat, permukaan isolat, elevasi, bau, konsistensi, warna miselium udara dan warna miselium vegetatif. Pengamatan mikroskopis yaitu dilakukan dengan cara miselium yang akan diamati diambil dengan menggunakan jarum ose dan diletakkan pada gelas objek yang telah diberi air, kemudian diamati di bawah mikroskop dan difoto. Isolat yang telah dikarakterisasi kemudian disimpan pada media GYEA miring sebagai kultur stok dan kultur kerja.



Gambar 3.3. Bentuk isolat, tepi isolat, dan permukaan isolat Actinomycetes (Cain *et al.*, 2014).

3.4.6. Peremajaan Isolat *Fusarium* sp

Isolat *Fusarium* sp. yang digunakan adalah isolat koleksi Laboratorium *Plant Protection Section*. Isolat diremajakan atau ditumbuhkan kembali dengan cara isolat *Fusarium* sp. dicetak dengan *cork borer* ukuran 6 mm. Isolat *Fusarium* sp. yang telah dicetak ditempatkan pada bagian tengah media PSA dengan menggunakan jarum ose, kemudian diinkubasi pada *incubator* dengan suhu 27°C selama 3 hari.



Gambar 3.4. Hasil pengamatan *Fusarium sp.* pada Mikroskopis (Ngittu dkk., 2014).

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.

1.4.7. Uji Aktivitas Actinomycetes terhadap *Fusarium* sp Menggunakan Uji Dual Culture

Isolat Actinomycetes yang telah dimurnikan selanjutnya diuji untuk melihat kemampuan isolat tersebut dalam menghambat pertumbuhan *Fusarium* sp.. Uji aktivitas dilakukan dengan metode dua biakan (*dual culture method*) pada cawan petridis berdiameter 9 cm yaitu dengan menempatkan isolat *Fusarium* sp. dan isolat Actinomycetes yang berumur 7 hari pada satu cawan petri yang berisi media GYEA. Inokulasi kedua isolat tersebut dilakukan pada hari yang berbeda karena dari penelitian sebelumnya terlihat keduanya mempunyai laju pertumbuhan yang berbeda.

Actinomycetes diinokulasi terlebih dahulu, pada hari ketiga baru inokulasi isolat *Fusarium* sp.. Masing-masing isolat Actinomycetes dan isolat *Fusarium* sp. diambil kemudian diinokulasi pada media menggunakan jarum ose. Isolat Actinomycetes digores dengan jarak 3 cm dari batas tepi cawan petridis, sedangkan isolat *Fusarium* sp. dicetak dengan *cork borer* ukuran 6 mm, dilatakkan pada jarak 3 cm dari batas tepi cawan petridis. Isolat diinkubasi pada suhu 27°C. Pengamatan zona bening dilakukan pada hari ke-5 sampai hari ke-7.

1.4.8. Kecepatan Daya Hambat Actinomycetes

Pengamatan kecepatan daya hambat Actinomycetes dilakukan pada saat zona hambat mulai tampak, yaitu setelah 5 hari, 6 hari dan 7 hari inkubasi. Pengamatan kecepatan daya hambat untuk mengetahui persentase daya hambat minimum, persentase daya hambat maksimum dan untuk mengetahui persentase kecepatan pertumbuhan Actinomycetes pada hari ke-5 sampai hari ke-7 dalam menghambat jamur *Fusarium* sp.. Pengamatan dilakukan dengan mengukur persentase daya hambat.

Rumus Persentase Daya Hambat :

$$P = \frac{R_1 - R_2}{R_1} \times 100 \%$$

1.4.9. Pengamatan Uji Aktivitas Actinomycetes

Pengamatan aktivitas hambatan Actinomycetes ditandai adanya zona bening di sekitar populasi, apabila di sekitar populasi terdapat zona bening, maka Actinomycetes dikatakan mampu menghambat pertumbuhan *Fusarium* sp.. Pengamatan dilakukan dengan mengukur persentase daya hambat. Pengukuran dilakukan dengan menggunakan penggaris.

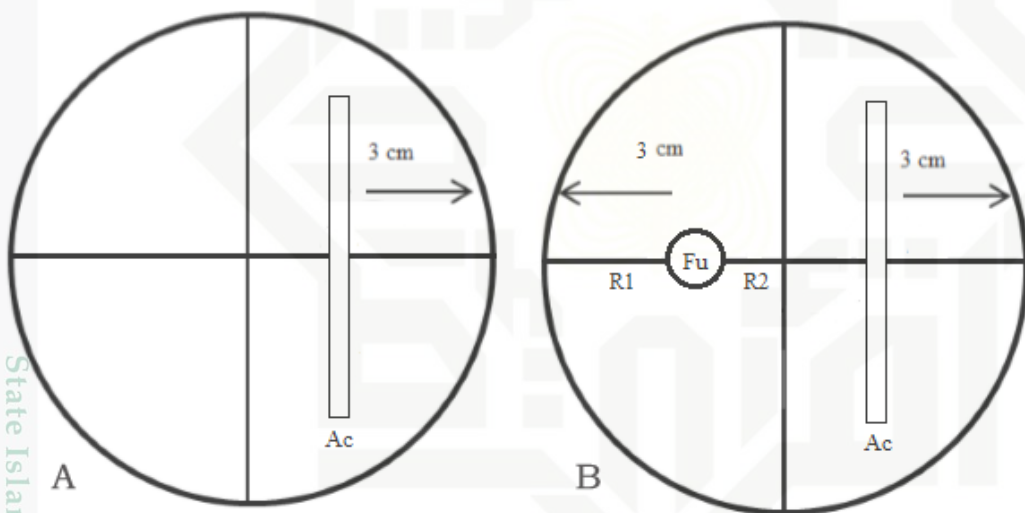
Persentase daya hambat yang dihasilkan kemudian diurutkan menurut kriteria Otter *et al.* (2004), yaitu:

Persentase daya hambat < 0% = tidak dapat menghambat pertumbuhan patogen (-)

Persentase daya hambat 0% - 30% = lemah (+)

Persentase daya hambat 30% - 60% = sedang (++)

Persentase daya hambat > 60% = kuat (+++)



Gambar 3.5. Skema uji aktivitas Ac (Actinomycetes), Fu (isolat *Fusarium* sp.).

A. Penggoresan isolat Actinomycetes,

B. Setelah 3 hari, inokulasi isolat *Fusarium* sp..

Rumus Persentase Daya Hambat :

$$P = \frac{R_1 - R_2}{R_1} \times 100 \%$$

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.

Keterangan :

P : Persentase daya hambat %

R₁ : Rata-rata diameter pertumbuhan koloni *Fusarium* sp yang berlawanan dengan pusat antagonis Actinomycetes (mm)

R₂ : Rata-rata diameter pertumbuhan koloni *Fusarium* sp yang menuju pusat antagonis Actinomycetes (mm)

3.5. Analisis Data

Hasil isolasi Actinomycetes secara makroskopis dan mikroskopis disajikan dalam bentuk deskriptif. Pengolahan data uji aktivitas *Dual culture* dianalisis menggunakan *Microsoft Excell* dengan mengelompokkan kedalam kriteria lemah, sedang dan kuat berdasarkan kriteria Otter *et al.* (2004) dari persentase daya hambat.