

## IV. METODOLOGI PENELITIAN

Tahap awal penelitian ini adalah peremajaan aktinomisetes lalu dilanjutkan penyeleksian isolat aktinomisetes yang memiliki aktivitas antifungal terhadap *R. solani* dengan metode *agar disk*. Setelah diperoleh aktinomisetes yang berpotensi menghasilkan senyawa bioaktif diuji dalam media fermentasi untuk mengetahui waktu inkubasi terbaik yang dimiliki oleh masing-masing aktinomisetes terpilih terhadap *R. solani* dengan metode difusi agar. Aktinomistes yang memiliki aktivitas selanjutnya dilakukan karakterisasi.

Tahun pertama (2008) dilakukan kegiatan penelitian yang meliputi:

### IV.1. Peremajaan aktinomisetes

Isolat aktinomisetes (41 isolat) merupakan koleksi Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi FMIPA Universitas Riau. Aktinomisetes merupakan isolat hasil isolasi dari tanah gambut di Riau. Aktinomisetes diremajakan terlebih dahulu. Isolat-isolat tersebut sebelumnya disimpan di dalam gliserol 20% yang disimpan pada refrigerator. Peremajaan dilakukan dengan cara memindahkan isolat aktinomisetes ke dalam medium Casein Gliserol Agar (CGA). Biakan kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 7-14 hari sampai koloni tumbuh.

### IV.2 Peremajaan *Rhizoctonia solani*

*Rhizoctonia solani* diperoleh dari Laboratorium Hama dan Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Riau. *R. solani* merupakan jamur patogen pada tanaman sawi. *R. solani* ditumbuhkan pada medium PDA (*Potato Dextrosa Agar*) dengan komposisi: air rebusan kentang 500 ml, dextrosa 10 g, agar 15 g, akuades hingga volume akhir 1000 ml .

#### IV.2.1 Menyiapkan populasi *Rhizoctonia solani*.

*R. solani* disiapkan populasi mempergunakan metode pengenceran. Pengenceran dilakukan dengan mempergunakan NaCl 0,85%. Penghitungan jumlah populasi *R. solani* yang digunakan untuk uji aktivitas yaitu:  $10^6$ /ml CFU.

### **IV.3 Seleksi aktinomisetes yang memiliki aktivitas terhadap *R. solani***

#### **IV.3.1 Metode Agar Disk (metode potongan agar)**

Isolat aktinomisetes ditumbuhkan pada medium CGA pada suhu kamar pada cawan petri selama 7 hari. *R. solani* ditanam secara *pour plate* ke dalam medium PDA dengan populasi  $10^6$ . Aktinomisetes yang telah diinokulasikan selama 7 hari dipotong dengan ukuran 6 mm lalu ditransfer ke cawan PDA yang telah diinokulasikan spora *R. solani*, selanjutnya kultur diinkubasi pada suhu kamar selama 7 hari. Aktivitasnya dilihat dengan mengukur diameter zona hambatnya (Aghighi *et al.* 2004).

#### **IV.3.2 Aktivitas aktinomisetes dalam media fermentasi terhadap *R. solani***

Aktinomisetes yang memiliki aktivitas terhadap *R. solani* selanjutnya dilakukan pengujian dengan menggunakan media fermentasi. Secara aseptis, diambil 20  $\mu$ l kultur Aktinomisetes ditumbuhkan di dalam media CG cair sebanyak 50 ml dalam flask 100 ml di shaker dengan kecepatan 150 rpm pada suhu kamar diinkubasi selama 15 hari. setiap 24 jam di mulai pada hari ke 7. Pada cawan petri yang berisi medium PDA yang telah diinokulasikan spora *R. solani*, dibuat sumuran 6 mm menggunakan *cork borer*, setelah itu dimasukkan kultur aktinomisetes dan diinkubasi pada suhu kamar selama 3 hari. Pengamatan masa inkubasi dalam media fermentasi bertujuan untuk melihat pada hari ke berapa aktinomisetes memiliki aktivitas tertinggi (Singh dan Agrawal 2001).

### **IV. 4 Karakterisasi Aktinomisetes**

#### **IV.4.1 Karakterisasi medium**

Karakterisasi dilakukan menumbuhkan isolat-isolat aktinomisetes ke medium lain, yaitu: *Starch Casein Agar* (SCA) dengan komposisi: 10 g pati, 0,3 g kasein, 2 g  $\text{KNO}_3$ , 2 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,05 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,02 g  $\text{CaCO}_3$ , 0,01 g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2 g NaCl, 18 g agar yang dilarutkan dalam 1000 ml akuades Singh dan Agrawal (2001; Panday *et al.* 2002) serta medium *Glycerol Yeast Extract Agar* (GYEA) dengan komposisi 5 gram

gliserol, 2 gram yeast ekstrak, 0,1 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 20 gram pepton, 15 gram agar yang dilarutkan dalam 1000 ml akuades (Oskay *et al.* 2004).

#### IV.4.2 Enzym protease dan amilase

Mengkarakterisasi aktinomisetes yang memiliki kemampuan menghidrolisis kasein. Bahan yang digunakan untuk medium seleksi adalah pepton 10 g, ekstrak yeast 5 g, NaCl 10 g, agar 19 g, semua bahan dilarutkan ke dalam 1000 ml akuades diatur pH hingga 7, lalu dihomogenkan dengan menggunakan *stirer*. Larutan yang telah homogen disterilkan dengan *autoklaf* selama 15 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 15 psi. Dicek kembali agar pH akhir 7. Setelah itu ditambahkan 10 g kasein sehingga medium mengandung kadar kasein 1% ke dalam Erlenmeyer yang berisi medium *Nutrien Agar* (NA). Ke dalam cawan petri yang sudah berisi medium ditotolkan aktinomisetes, lalu diinkubasi pada suhu ruang selama 3 hari. Aktinomisetes yang memiliki aktivitas ditandai dengan terbentuknya zona bening disekitar koloni.

Aktivitas amilase dapat diketahui dengan menumbuhkan isolat aktinomisetes dalam medium NA yang sebelumnya sudah ditambahkan 1% pati. Kedalam cawan petri yang sudah berisi medium ditotolkan isolat aktinomisetes. Setelah tiga hari ditetesi dengan iodium. Isolat yang dipinggirnya memiliki zona bening artinya isolat tersebut mampu menghasilkan enzim amilase.

#### IV.4.3 Hidrolisis Tween 80

Medium NA ditambahkan 1% Tween 80 yang sebelumnya telah disterilkan. Pada cawan petri yang berisi medium ditotolkan isolat aktinomisetes lalu inkubasi selama 3 hari. Reaksi positif apabila disekitar isolat terjadi perombakan/hidrolisis dari medium

#### IV.4.4 Slide agar kultur

Karakterisasi aktinomisetes untuk mengamati miselium aerial dan miselium substrat dengan teknik slide agar pada kaca objek. Objek glas ditetesi dengan medium agar setelah itu pada pinggiran medium

diinokulasikan inokulum aktinomisetes, lalu inkubasi selama 3 hari. Amati di bawah mikroskop Olympus CX-41

#### IV.4.5 Medium Fermentasi Karbohidrat

Medium fermentasi karbohidrat dibuat dengan cara mencampurkan 3 g ekstrak daging, 5 g pepton, 5 g sumber karbon yang diuji (selobiosa, dekstrosa, fruktosa, galaktosa, glukosa, laktosa, manitolsukrosa dan silosa) 2 tetes indikator merah fenol, yang dilarutkan dengan 1000 ml akuades sehingga homogen. Sterilkan dengan autoklaf dengan suhu 121 °C selama 15 menit dengan tekanan 15 psi (Hadioetomo 1993). Reaksi positif jika medium berubah menjadi berwarna merah dan reaksi negatif jika medium berwarna kuning.