

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### 3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Riau; Laboratorium UPT Pengujian Material Dinas Pekerjaan Umum Provinsi Riau pada bulan Juni 2016 sampai dengan November 2016.

#### 3.2. Rancangan Percobaan

Penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) terhadap produksi GA, pH medium dan parameter perkecambahan. Setiap perlakuan isolat dilakukan pengulangan 4 kali.

#### 3.3. Cara Kerja

##### 3.3.1. Produksi hormon GA oleh isolat jamur

Duapuluh lima isolat jamur lokal diseleksi kemampuannya memproduksi GA. GA diproduksi pada 100 ml medium cair Czapek-Dox dan Potato Dextrosa broth dalam Erlenmeyer 250 ml. Isolat ditumbuhkan pada PDA di cawan petri selama 7 hari. Empat potongan disk isolat dengan diameter 5 mm dinokulasi ke 100 ml medium produksi dan diinkubasi pada suhu ruang dengan kecepatan agitasi 150 rpm/menit selama 7 hari dalam kondisi gelap (Bilkay *et al*, 2010 ; Hasan, 2002). Setelah masa inkubasi diukur produksi GA oleh isolat menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 254 nm, pH medium akhir dan biomassa kering isolat.

### 3.3.2. Analisis produksi giberelin

Pengukuran produksi giberelin (GA) menggunakan metode dari Holbrook *et al.*(1961) dengan sedikit modifikasi (Kumar *et al.*, 2012). Medium kultur disaring dengan kertas saring Whatman. Supernatan yang diperoleh diambil sebanyak 15 ml dan ditambahkan reagen asetat. Larutan disentrifugasi pada 2000 rpm selama 15 menit. Supernatan diambil dan ditambahkan HCl 30%, campuran diinkubasi 20°C selama 75 menit. Sebagai blanko digunakan 5 ml HCl 5%. Konsentrasi giberelin (GA) dihitung absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 254 nm.

### 3.3.3. Pengukuran Pertumbuhan Isolat

Pertumbuhan isolat pada kultur diamati menggunakan metoda filtrasi melalui pengukuran berat kering. Medium pertumbuhan disaring menggunakan kertas saring Whatman yang telah dihitung beratnya. Biomassa dikeringkan dalam oven pada suhu 50°C, biomassa ditimbang sampai beratnya stabil.

### 3.3.4. Uji perkecambahan (Germination seeds)

#### 3.3.4.1. Pembuatan ekstrak kasar GA

Isolat yang menghasilkan produksi GA tertinggi digunakan untuk uji perkecambahan. Isolat *Aspergillus sp 2* dan *Penicillium PNE4* diremajakan pada petri yang berisi medium PDA. Isolat yang ditumbuhkan pada medium PDA kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 7 hari. Masing-masing isolat yang tumbuh di medium PDA dipotong sebanyak 6 bagian menggunakan pipet tip steril yang berdiameter 6 mm dan diinokulasikan ke dalam medium Czapek (150 ml). Kultur difermentasi pada suhu ruang selama 7 hari menggunakan shaker inkubator dengan

kecepatan 150 rpm. Ekstrak kasar GA isolat yang sudah difermentasikan diencerkan sebanyak 100 ppm, 200 ppm dan 300 ppm.

#### **3.3.4.2. Perendaman biji**

Biji karet yang digunakan adalah biji karet yang sehat, tidak pecah dan apabila dijatuhkan memiliki daya lenting yang baik, sedangkan biji cabe yang dipilih adalah biji yang apabila direndam akan tenggelam. Biji karet dan biji cabe yang sudah dipilih dilakukan sterilisasi permukaan menggunakan larutan NaOCl 2% selama 3 menit kemudian dibilas menggunakan akuades sebanyak 3 kali. Biji karet dan biji cabe steril direndam dalam ekstrak kasar GA konsentrasi 100 ppm, 200 ppm, 300 ppm dan kontrol (tanpa ekstrak GA) selama 24 jam.

#### **3.3.4.3. Penanaman biji karet dan biji cabe**

Biji karet yang sudah direndam selama 24 jam kemudian dikeluarkan dan ditanam pada media tanam yang sudah dipersiapkan terlebih dahulu. Tiap –tiap polibag diisi sebanyak 3 biji karet dengan jarak 5 cm sedangkan biji cabe ditanam sebanyak 6 biji dengan jarak 2 cm. Air sisa perendaman biji kemudian dituang sebanyak 50 ml pada setiap ulangan (polibag). Biji yang ditanam kemudian diamati selama 30 hari untuk tanaman karet sedangkan tanaman cabe diamati selama 15 hari

Parameter perkecambahan meliputi persentase perkecambahan, waktu perkecambahan, berat segar dan panjang shoot dan root kecambah .

#### **3.3.5. Uji antagonis isolat terhadap jamur patogen**

Uji antagonis dilakukan menggunakan teknik *dual culture* (Mohan, 2015). Isolat indigenus dan isolat jamur patogen ditumbuhkan pada cawan petri secara terpisah

selama 5 hari. Disk miselia berdiameter 5 mm dipotong dan diletakkan pada sisi berlawanan di cawan petri yang sama dengan jarak 3 cm. Cawan petri yang hanya diletakkan 1 potongan miselia patogen ditengah cawan, berfungsi sebagai kontrol. Cawan petri tersebut diinkubasi selama 5-7 hari. Kemampuan organisme menghambat pertumbuhan koloni *F. oxysporum* f.sp *capsici* dan *G. phillippi* dihitung melalui persentase penghambatan dengan rumus:

$$PGI (\%) = \frac{KR - R1}{KR} \times 100$$

Keterangan : KR = jarak dari titik inokulasi ke pinggir cawan petri

R1 = jarak pertumbuhan koloni dari titik inokulasi ke pinggir koloni menuju antagonis.

### 3.3.6. Analisis Data

Data isolat yang mampu menghasilkan GA3 dan data uji perkecambahan dianalisis secara statistik dengan ANOVA menggunakan SPSS versi 17.0. Jika hasil uji menunjukkan berbeda nyata, maka dilanjutkan dengan uji Duncan's Multiple Range Test (DMRT) pada taraf 5%.