

IV. METODE PENELITIAN

A. Lokasi dan waktu penelitian

Penelitian dilakukan mulai Oktober 2017 hingga Januari 2018. Observasi lapangan dilakukan di 4 Desa Yaitu Desa Sukomoro, Ngrami, Bagor Wetan dan Kapas yang berada di Kecamatan Sukomoro, Kabupaten Nganjuk, tahapan isolasi dan identifikasi patogen dilakukan di Laboratorium PT Petrokimia Kayaku dan dilanjutkan identifikasi sampel di Laboratorium Agrobioteknologi Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

B. Metode penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan 2 tahap yaitu :

Tahap 1. Observasi lapangan dan pengambilan sampel patogen pada tanaman bawang merah

Metode survei dalam penelitian digunakan untuk mengumpulkan data atau informasi dari pertanaman bawang merah pada suatu wilayah yang besar dengan menggunakan sampel yang relatif lebih kecil. Metode survei digunakan untuk mendapatkan data dari tempat tertentu yang alamiah (bukan buatan) metode survei memudahkan peneliti dalam memperoleh data untuk tujuan pemecahan masalah.

Inventarisasi jamur dilakukan menggunakan metode survei dari pertanaman bawang merah di Kecamatan Sukomoro, Kabupaten Nganjuk, Jawa Timur. Pengambilan sampel jamur dilakukan menggunakan metode *purposive*, menurut Sugiyono (2009) metode *purposive* sampling adalah teknik penentuan

sampel dengan pertimbangan tertentu seperti kondisi lingkungan atau lokasi pengambilan sampel. sampel diambil secara diagonal untuk tiap lahan dan Diputuskan berdasarkan fenomena yang telah terjadi di lapangan dengan merumuskan permasalahan yang menyebabkan perlunya dilakukan penelitian. Dari Kecamatan Sukomoro diambil 4 Desa yang menjadi sentra bawang merah sebagai unit sampel pengamatan Desa Sukomoro, Kapas, Ngrami, Dan Bagor Wetan (Lampiran 2). Setiap desa diambil 3 lahan dan setiap 1 lahan diambil 5 titik berdasarkan diagonal

Tahap 2. Identifikasi jamur patogen di laboratorium

Identifikasi jamur merupakan salah satu tugas yang penting dilakukan di laboratorium. Identifikasi merupakan membandingkan gejala yang ada atau yang ditemukan dengan yang terdapat pada pustaka/buku identifikasi. Jamur tidak mempunyai ciri-ciri anatomi yang terlihat jelas, oleh karena itu identifikasinya berdasarkan morfologi sifat biakan. Morfologi mikroorganisme berdasarkan ukuran dan perataan, bentuk, biasanya belum bisa untuk identifikasi. Ciri lainnya seperti pertumbuhan koloni, perwarnaan, reaksi pertumbuhan pada karbohidrat dan penggunaan asam amino sangat membantu dalam proses identifikasi mikroorganisme (Lay, 1994). Menurut Soni (2010), identifikasi mikroorganisme seringkali memerlukan pemindahan biakan lama ke biakan segar tanpa terjadi kontaminasi. Tahapan yang harus di lakukan untuk mengidentifikasi yaitu :

1. Isolasi sampel
2. Peremajaan
3. Pengamatan mikroskopis
 - a. Isolasi sampel

Isolasi ialah proses pengambilan mikroorganisme dari lingkungan untuk kemudian ditumbuhkan dalam suatu medium di laboratorium. Proses ini menjadi penting dalam mempelajari identifikasi mikrobial, uji morfologi, fisiologi dan serologi. Sedangkan

pengujian sifat sifat tersebut mustahil dilakukan di alam terbuka, (Pelczar, 1986) prinsip dari isolasi mikroba adalah memisahkan mikroba dengan mikroba lainnya yang berasal dari mikroba mikroba lainnya (Sutedjo dalam Krisno, 2011) isolasi dilakukan untuk mempermudah pengamatan dan kegiatan mikrobiologis yang membutuhkan satu biakan murni, menurut Dwidjoseputro (2003) teknik dalam mengisolasi suatu mikroorganisme antara lain :

- 1) Isolasi tunggal merupakan metode isolasi dengan cara meneteskan bahan yang mengandung mikroorganisme pada suatu kaca penutup dengan menggunakan mikropipet, yang kemudian diteliti dibawah obyektif mikroskop.
- 2) Isolasi gores merupakan metode isolasi dengan cara menggeser atau menggoreskan ujung jarum ose yang telah mengandung mikroorganisme dengan hati-hati di atas permukaan agar secara zig-zag yang dimulai dari dasar tabung menuju ke bagian atas tabung.
- 3) Tebar adalah metode isolasi dengan menebarkan bahan yang sudah terdapat mikroorganisme pada permukaan atas tabung. Tuang merupakan metode isolasi dengan cara mengambil sebagian kecil sampel campuran jamur yang telah diencerkan kemudian disebar di dalam suatu medium tertentu.

b. Peremajaan

Peremajaan adalah proses meremajakan mikroba hasil isolasi agar didapatkan mikroba muda yang diharapkan akan berkembang dengan baik yang nantinya akan digunakan sesuai dengan fungsinya, proses peremajaan ini cukup mudah yaitu dengan mengambil mikroba dari hasil isolasi kemudian di tumbuhkan ke media baru secara goresan maupun tusukan pada media cair atau media padat.

c. Pengamatan mikroskopis

Pengamatan yang digunakan untuk identifikasi jamur adalah spora dan fruktifikasi (tubuh buah), atau bagian yang menghasilkan spora dan beberapa sifat tubuh jamur (miselium atau plasmodium). Warna, bentuk, ukuran dan pola susunan spora pada sporofor atau badan buah merupakan sifat-sifat yang cukup untuk diamati. Sifat-sifat tersebut pada kasus ini bisa dimanfaatkan untuk menjajaki jamur tersebut melalui kunci analisis jamur yang dipublikasikan untuk menentukan genus, dan akhirnya termasuk jenis spesies jamur tersebut (Agrios, 1996).

C. Tata Laksana

Penelitian ini telah di laksanakan dalam 2 tahap yaitu ;

Tahap 1. Observasi lapangan dan pengambilan sampel patogen pada tanaman bawang merah

Pengambilan sampel jamur dilakukan dengan survei dan koleksi jamur penyebab penyakit pada pertanaman bawang merah di Kecamatan Sukomoro dari Kecamatan Sukomoro diambil 4 Desa yang menjadi sentra bawang merah sebagai unit sampel pengamatan, dari masing masing desa diambil 3 lahan atau lokasi untuk pengambilan sampel dan setiap lahan diambil 5 tanaman yang diduga terserang penyakit.

Pengambilan sampel setiap lahan pada pertanaman bawang merah diambil 5 blok untuk dijadikan sampel yang diambil secara acak (Lampiran 1) dan setiap blok diambil 3 sampel tanaman. Sampel jamur penyebab penyakit yang didapat berdasarkan ciri morfologinya dengan cara mengoleksi jaringan tanaman yang menunjukkan gejala terserang jamur, setelah pengambilan sampel dimasukkan kedalam wadah yang sudah ditentukan kemudian dibawa ke laboratorium untuk dilakukan indentifikasi lebih lanjut

Tahap 2. Identifikasi jamur patogen di laboratorium dengan 4 tahap yaitu :

a. Pembuatan media PDA

Pembuatan media PDA 1000 gr kentang dikupas, diiris sebesar dadu dan direbus dengan air sebanyak 1,5 liter selama 1 jam kemudian di saring dengan kain saring. Sebanyak 68 gr

direbus dengan air sebanyak 1200 ml (Lampiran 3b). Selanjutnya larutan agar dan dektros dicampur dengan air rebusan kentang dan dididihkan selama 10 menit. Setelah tercampur merata, media dituangkan kedalam gelas erlenmeyer dan disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C (Lampiran 3d), tekanan 1 atm selama 15 menit. Pembuatan PDA untuk stok isolasi selanjutnya pemuatan PDA menggunakan PDA instan 32g untuk 1 liter air.

b. Isolasi jamur

Bagian tanaman yang sudah diambil dari lahan kemudian dilakukan identifikasi di laboratorium yang bertujuan untuk memastikan jenis OPT yang menyerang tanaman, disebabkan oleh jamur. Cara ini digunakan untuk mengetahui penyebab penyakit yang disebabkan oleh jamur adalah dengan mengambil bagian tanaman yang menunjukkan gejala serangan penyakit dengan benda kecil dan dilihat di bawah mikroskop (Imas dkk., 1989). Apabila jamur penyebab penyakit sudah diidentifikasi, maka diisolasi ke dalam media PDA. Tahap identifikasi lanjut dilakukan pada bagian tanaman yang tidak ditemukan ciri-ciri jamur atau spora yaitu dengan cara bagian tanaman terserang penyakit dipotong berukuran ± 1 cm kemudian dicuci dengan akuades dan dibilas dengan alkohol 70%. Potongan tersebut dipisahkan ke dalam cawan petri yang dialaskan kertas saring lembab dan diinkubasi pada suhu ruang selama dua sampai dengan lima hari. Apabila terdapat hifa pada potongan tanaman, maka penyebab penyakit adalah jamur. Hifa jamur ditumbuhkan pada media PDA dan diinkubasi selama sekitar lima hari kemudian diidentifikasi untuk memastikan jamur penyebab penyakit adalah jamur. Jamur hasil identifikasi selanjutnya diperbanyak dan diremajakan kembali dengan metode fragmentasi hifa (5x5 mm) dari jamur dan ditumbuhkan di media PDA dalam cawan petri (Agrios dkk., 1996) dalam (Miratun, 2016).

c. Peremajaan jamur patogen

Peremajaan dilakukan dengan mengambil biakan dari hasil isolasi yang telah dilakukan di tahap sebelumnya, biakan diambil kemudian di pindahkan ke dalam media PDA, kemudian di inkubasi selama 3 sampai 5 hari.

d. Pengamatan dan identifikasi

Biakan jamur diisolai kembali ke dalam media biakan baru sampai diperoleh kultur murninya. Kemudian dilakukan identifikasi jamur, biakan murni jamur diamati di bawah mikroskop binokuler dengan perbesaran 10×10, 10×20, 10×40 dan 10×100 (Daniel Erikson, dkk., 2014). Identifikasi Jamur dilakukan dengan cara membersihkan gelas preparat cekung dengan alkohol, kemudian dipanaskan sampai bebas lemak dan debu. Preparat tersebut diberi media PDA pada bagian cekungan, kemudian jamur diambil secara aseptis menggunakan jarum ose dan diletakkan di atas PDA. Preparat ditutup dengan kaca penutup dan di tunggu sampai jamur tersebut tumbuh sekitar 3 hari. Identifikasi makroskopis dan mikroskopis dilakukan dengan mencocokkan karakteristik jamur yang didapatkan dari hasil pengamatan dengan buku identifikasi *Compendium of Soil Fungi* karya Domsch, *et al.* (1980), Pengenalan Kapang Tropik Umum oleh Ganjar, dkk (1999) dan *Illustrate Genera of Imperfect Fungi* H.L Barnett.