

III. METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Agrobioteknologi dan *Green House* Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Penelitian dilaksanakan pada Oktober 2017 sampai dengan Maret 2018.

B. Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian meliputi media PDA, *aquadest*, *clorox*, isolat jamur *Trichoderma harzianum* dan sampel sulur buah naga yang terkena penyakit busuk sulur.

Alat yang digunakan dalam penelitian meliputi *cawan petri*, mistar, spidol, ose, alkohol 75%, spiritus, autoklaf, tabung reaksi, gelas beaker, kaca preparat, deglas, botol suntik, erlenmeyer, drigalski, timbangan, mikro pipet dan alat tulis menulis.

C. Metode Penelitian

Penelitian yang diujikan terdiri dari lima tahap, yaitu: tahap 1 isolasi jamur patogen penyebab busuk pada sulur buah naga, tahap 2 pemurnian jamur patogen penyebab busuk pada sulur buah naga, tahap 3 karakterisasi jamur patogen penyebab busuk pada sulur buah naga, tahap 4 reinokulasi jamur patogen penyebab busuk pada sulur buah naga, dan tahap 5 uji daya hambat jamur *Trichoderma harzianum* dengan jamur penyebab busuk pada sulur buah naga.

Tahap 1: Isolasi Jamur Patogen Penyebab Busuk pada Sulur Buah Naga

Isolasi jamur penyebab busuk batang dilakukan dengan dua cara. Cara pertama yaitu dengan mengoleksi batang yang terserang penyakit busuk batang. Selanjutnya batang yang terdapat penyakit tersebut dipotong $\pm 1,5 \text{ cm} \times 1,5 \text{ cm} \times 1,5 \text{ cm}$ dan ditanam di media PDA cawan petri. Dalam 1 cawan petri ditanam 4 potongan di sisi yang berbeda. Cara kedua yaitu dengan menggunakan metode permukaan (*surface plating method*). Cawan petri yang sudah mengandung sampel tanaman kemudian di inkubasi hingga jamur tumbuh dengan baik.

Tahap 2: Pemurnian Jamur Patogen Penyebab Busuk pada Sulur Buah Naga

Pemurnian merupakan cara memindahkan atau memisahkan mikroba tertentu dari lingkungannya. Pemurnian ini dilakukan dengan tujuan untuk memperoleh kultur murni. Pemurnian jamur patogen penyebab penyakit busuk sulur dilakukan dengan memindahkan jamur yang telah diisolasi ke dalam media PDA baru yang masih steril.

Tahap 3: Karakterisasi Jamur Patogen Penyebab Busuk pada Sulur Buah Naga

Karakterisasi jamur dilakukan dengan mengidentifikasi jamur berdasarkan ciri-ciri mikroskopis dengan mengamati morfologi jamur (bentuk, hifa, konidia dan spora) yang terbetuk melalui mikroskop binokuler.

Tahap 4: Uji Daya Hambat Jamur *Trichoderma harzianum* dengan Jamur Patogen Penyebab Busuk pada Sulur Buah Naga

Uji daya hambat dilakukan menggunakan metode titik, yaitu dengan cara menitikkan jamur yang akan diuji diatas media PDA cawan petri. Jumlah dan letak titik disesuaikan dengan tujuan penelitian. Setelah dilakukan inkubasi,

pertumbuhan jamur diamati dengan melihat ada tidaknya daerah hambatan dan luas hambatan di sekeliling titik.

Tahap 5: Aplikasi *Trichoderma harzianum* dan Jamur Patogen pada Sulur Buah Naga

Reinokulasi dilakukan dengan menggunakan faktor tunggal, yang disusun dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL). Perlakuan yang diujikan adalah beberapa jamur penyebab penyakit busuk sulur pada tanaman buah naga, yang terdiri atas 10 perlakuan, yaitu 5 jamur penyebab penyakit dan 5 jamur penyebab penyakit yang di uji dengan *Trichoderma harzianum* Setiap perlakuan diulang sebanyak 3 kali, sehingga didapatkan 30 unit percobaan. Dengan rincian sebagai berikut: Jamur A, Jamur B, Jamur C, Jamur D, Jamur A dan Jamur *Trichoderma harzianum*, Jamur B dan Jamur *Trichoderma harzianum*, Jamur C dan Jamur *Trichoderma harzianum*, Jamur D dan Jamur *Trichoderma harzianum*.

D. Tata Cara Penelitian

Penelitian ini terdiri dari lima tahap, yaitu sebagai berikut:

Tahap 1: Isolasi Jamur Patogen Penyebab Busuk pada Sulur Buah Naga

1. Pengambilan Sampel Penyakit

Pengambilan sampel penyakit dilakukan dengan cara mengambil sampel secara acak pada kebun buah naga. Pengambilan sampel dilakukan pada 3 lokasi (blok) yang berbeda dalam satu kebun buah naga. Sampel dipilih dari sulur yang memiliki gejala penyakit yang paling parah. Sampel didapat dengan cara memotong satu sulur yang terkena penyakit kemudian menyimpannya kedalam plastik dan segera dibawa ke laboratorium.

2. Sterilisasi alat

Sterilisasi dilakukan untuk menghilangkan dan membunuh mikroba yang terdapat pada alat dan bahan agar tidak menyebabkan kontaminasi. Alat-alat yang perlu di sterilisasi meliputi cawan petri, botol suntik, tabung reaksi, erlenmeyer, gelas beaker. Sterilisasi dimulai dengan cara membersihkan dan menghilangkan bahan-bahan sisa yang terdapat dalam alat, seperti agar, *aquadest*, dll. Setelah bersih alat-alat tersebut direbus hingga air didalamnya mendidih, kemudian dicuci bersih dan dikeringkan. Setelah kering cawan petri dimasukkan dalam plastik dengan ketebalan 0,5 mm, tabung reaksi dan erlenmeyer ditutup menggunakan kapas dan dilapisi menggunakan kertas payung lalu diikat menggunakan karet gelang. Semua alat tersebut dimasukkan dalam autoklaf dan di sterilkan pada suhu 121⁰C selama 30 menit.

3. Pembuatan media PDA

Pembuatan media PDA menggunakan bahan-bahan seperti dextrose 15 gram, agar 20 gram, ekstrak kentang 250 gram, chloramphenicol 0,1%, *aquadest* steril dan pH *stick* 6-7. Pembuatan media dimulai dengan menghitung kebutuhan media. Setelah didapat jumlah media yang dibutuhkan bahan-bahan untuk membuat media ditimbang sesuai kebutuhan. Setelah kentang ditimbang, kentang direbus dengan menggunakan *aquadest* dua kali lipat dari kebutuhan. Selanjutnya air rebusan kentang di saring hingga hangat hangat kuku dan ditambahkan dextrose dan diaduk hingga homogen, setelah itu dicek pH. Selanjutnya dicampur dengan agar dan diaduk hingga homogen. Setelah itu dipanaskan di atas kompor hingga benar-benar homogen. Setelah homogen media dimasukkan kedalam erlenmeyer dan ditutup dengan kapas dan kertas payung.

4. Sterilisasi Bahan

Bahan yang akan digunakan adalah media PDA dan *aquadest*. Sterilisasi media PDA dimulai dengan memasukkan bahan yang sudah siap untuk digunakan ke dalam erlenmeyer, setelah itu tutup erlenmeyer dengan kapas dan kertas payung. Sterilisasi *aquadest* dimulai dengan mengisi botol suntik dengan air sebanyak 99 ml, tabung reaksi diisi air 9 ml dan ditutup dengan plastik diikat menggunakan karet gelang, sebagian. Setelah itu masukkan erlenmeyer ke dalam autoclaf dan di sterilkan pada suhu 121⁰C selama 20 menit. Setelah steril, alat dan bahan tersebut dimasukkan dalam ruang penyimpanan.

5. Isolasi Jamur Penyebab Busuk pada Sultur Buah Naga

Isolasi jamur penyebab busuk sultur dilakukan dengan dua cara. Cara pertama dilakukan dengan mengoleksi batang yang terserang penyakit busuk sultur yang kemudian dimasukkan ke dalam plastik untuk dibawa ke laboratorium. Selanjutnya bagian batang yang terkena penyakit busuk sultur dipotong kecil (1,5 cm x 1,5 cm x 1,5 cm). Setelah itu potongan tersebut direndam dalam 1% larutan *calcium hypochlorite* selama 2 menit. Kemudian dimasukkan ke dalam *aquadest* steril selama 1 menit. Setelah itu potongan tersebut diambil dan ditiriskan, kemudian potongan balok tersebut ditanam di media PDA. Dalam 1 cawan petri ditanam 4 potongan di sisi yang berbeda (lampiran 1a).

Cara kedua dilakukan dengan merendam batang buah naga yang telah terinfeksi penyakit dan selanjutnya dilakukan pengenceran. Setelah itu diambil 0,1 ml dari pengenceran dan dimasukkan ke dalam cawan petri berisi media PDA. Selanjutnya dilakukan *surface* dengan menggunakan drigalski agar merata ke

seluruh permukaan media. Setelah jamur tumbuh dengan baik dilakukan pemurnian jamur.

Tahap 2: Pemurnian Jamur Patogen Penyebab Busuk pada Sulur Buah Naga

Pemurnian bakteri dilakukan dengan cara menyiapkan cawan petri yang telah ditumbuhi jamur patogen penyebab penyakit busuk sulur yang telah diidentifikasi dengan melihat bentuk dan warna koloni jamur tersebut. Koloni yang terpisah dan tumbuh dengan baik selanjutnya dipilih dan ditanam kembali pada media PDA yang baru. Pemurnian dilakukan dengan menggunakan metode titik, yaitu mengambil 1 ose jamur pada isolat dan menanamnya kembali dengan cara menitikkan jamur tersebut pada media PDA baru (Lampiran 1b).

Tahap 3: Karakterisasi Jamur Patogen Penyebab Busuk pada Sulur Buah Naga

Karakterisasi jamur dilakukan dengan meletakkan 1 ose jamur yang telah tumbuh di atas kaca preparat yang telah diberi sedikit media PDA, selanjutnya kaca preparat ditutup dengan menggunakan deglas. Setelah jamur tumbuh, jamur diamati dibawah mikroskop dan identifikasi bentuk, hifa, konidia dan spora (Lampiran 1c).

Tahap 4: Uji Daya Hambat Jamur *Trichoderma harzianum* dengan Jamur Patogen pada Sulur Buah Naga

1. Perbanyak jamur *Trichoderma harzianum*

Isolat yang siap digunakan adalah isolat murni *Trichoderma harzianum* yang sudah tumbuh memenuhi media PDA (*Potato Dextrose Agar*). Sebelum perlakuan terlebih dahulu dedak dikukus di atas api kecil selama 2 jam, kemudian di kering anginkan. Kemudian diberikan *Trichoderma harzianum* yang telah dilarutkan ke dalam air dan setelah itu disimpan dan ditutup dengan plastik

bening. Perbanyak juga dapat dilakukan dengan mengambil 1 ose *Trichoderma harzianum* dari isolat murni *Trichoderma harzianum* dan mengisolasinya ke dalam media PDA miring.

2. Perbanyak jamur patogen pada sulur tanaman buah naga

Perbanyak dilakukan dengan memindahkan jamur yang telah ditumbuhkan dan diisolasi di dalam media PDA agar miring ke dalam media PDA cawan petri baru yang masih steril.

3. Uji Daya Hambat

Uji daya hambat dilakukan dengan metode titik untuk mengetahui reaksi dan daya hambat *Trichoderma harzianum* terhadap beberapa jamur penyebab busuk sulur. Uji daya hambat dilakukan dengan cara menitikkan jamur pada media PDA cawan petri. Jumlah titik yang dibuat dalam satu cawan petri media PDA ada dua, satu titik untuk jamur *Trichoderma harzianum* dan satu titik lagi untuk jamur penyakit busuk sulur buah naga.

Setelah itu dilakukan inkubasi pada suhu 35°C selama 24 jam dan kemudian diamati. Pengamatan dilakukan selama 7 hari berturut-turut untuk mengamati pertumbuhan jamur dan melihat ada tidaknya daerah hambatan di sekeliling lubang (Lampiran 1d).

Tahap 5: Aplikasi *Trichoderma harzianum* dan Jamur Patogen Penyebab Busuk pada Sulur Buah Naga

1. Penanaman Tanaman Buah Naga

Penanaman dilakukan di *Green House* Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Penanaman dilakukan dengan memotong bibit \pm 30 cm, selanjutnya bibit ditanam dalam polybag berisi 5 kg pupuk dan tanah dengan perbandingan 1 banding 4. Proses penanaman terdapat pada lampiran 3b.

2. Pengaplikasian jamur *Trichoderma harzianum* pada tanaman buah naga

Jamur *Trichoderma harzianum* pada media PDA agar miring diperbanyak dalam media alternatif. Selanjutnya jamur *Trichoderma harzianum* sebanyak 10 gram dengan kerapatan $2,65 \times 10^7$ diaplikasikan kedalam pupuk kompos yang akan digunakan sebagai media tanam bagi tanaman buah naga. Sebelum diaplikasikan pupuk di inkubasi selama 1 minggu agar *Trichoderma harzianum* dapat tumbuh dan menyesuaikan diri dengan lingkungan barunya.

3. Reinokulasi jamur patogen busuk sulur pada tanaman buah naga

Hasil pemurnian jamur dikembangbiakkan pada media miring PDC dan ditumbuhkan. Setelah itu untuk pengaplikasian jamur pada tanaman dilakukan penggojokan terlebih dahulu pada tabung reaksi yang telah berisi jamur dengan media PDC sesuai dengan jumlah kebutuhan. Selanjutnya hasil suspensi dapat diaplikasikan pada tanaman dengan cara menyuntikkan hasil suspensi disekitar perakaran tanaman yang telah dilukai (Lampiran 1e).

E. Parameter yang Diamati

Variabel pengamatan pada penelitian ini yaitu:

Tahap 1: Isolasi Jamur Patogen Penyebab Busuk pada Sulur Buah Naga

Mengamati beberapa jenis jamur patogen penyebab busuk sulur yang tumbuh pada tahap isolasi, meliputi warna dan mengukur diameter luas koloni dari jamur yang tumbuh. Pengamatan ini dilakukan setiap hari hingga jamur yang di isolasi tumbuh sempurna.

Tahap 2: Pemurnian Jamur Patogen Penyebab Busuk pada Sulur Buah Naga

Mengamati keseragaman pertumbuhan jamur yang telah dimurnikan. Pengamatan ini dilakukan setiap hari setelah jamur di murnikan hingga kurang lebih 7 hari setelah pemurnian.

Tahap 3: Karakterisasi Jamur Patogen Penyebab Busuk pada Sulur Buah Naga

Karakterisasi jamur meliputi hifa, konidia, dan spora yang selanjutnya di klasifikasikan berdasarkan ciri yang didapat. Pengamatan dilakukan seminggu setelah jamur dimurnikan.

Tahap 4: Uji Daya Hambat Jamur *Trichoderma harzianum* dengan Jamur Patogen Penyebab Busuk pada Sulur Buah Naga

1. Pertumbuhan jamur *Trichoderma harzianum*

Pengamatan pertumbuhan jamur *Trichoderma harzianum* diamati dengan cara menumbuhkan jamur *Trichoderma harzianum* pada media PDA. Kemudian diukur diameter luas koloni pertumbuhan jamur tersebut dengan menggunakan mistar.

2. Pertumbuhan beberapa jamur patogen busuk sulur

Pengamatan pertumbuhan beberapa jamur penyebab penyakit busuk sulur diamati dengan cara menumbuhkan beberapa jamur penyebab penyakit busuk sulur pada media PDA. Setelah itu diukur diameter luas koloni pertumbuhan jamur dengan menggunakan mistar.

3. Uji daya hambat *Trichoderma harzianum* terhadap beberapa jamur penyebab busuk sulur

Uji ini dilakukan pada media PDA yang ditentukan dengan mengukur daerah zona bening, metode yang digunakan oleh Dwiastuti, dkk. (2015).

Persentase daya hambat dihitung dengan rumus :

$$\text{Daya hambat} = \frac{\text{Diameter bercak kontrol} - \text{Diameter bercak perlakuan}}{\text{Diameter bercak kontrol}} \times 100\%$$

Tahap 5: Aplikasi *Trichoderma harzianum* dan Jamur Patogen pada Sultur Buah Naga

Melihat dan mengamati gejala penyakit yang timbul pada tanaman yang telah di aplikasikan penyakit. Setelah itu diamati tingkat keparahan penyakit dan dihitung berapa banyak tanaman yang terserang penyakit. Keparahannya dihitung dengan mengukur panjang sultur yang terserang penyakit menggunakan penggaris (cm). Pengukuran dimulai dari ujung sultur yang terkena penyakit hingga ujung lain sultur yang terkena penyakit. Persentase tanaman terserang dihitung menggunakan rumus yang digunakan oleh Resti, dkk. (2013).

$$\text{Persentase tanaman terserang} = \frac{\text{Jumlah tanaman yang bergejala}}{\text{Jumlah tanaman yang diamati}} \times 100\%$$

F. Analisis data

Pengaruh dari berbagai perlakuan disajikan dalam bentuk tabel dan grafik. Hasil pengamatan kuantitatif dianalisis dengan menggunakan sidik ragam atau *analysis of variance* (ANOVA) pada taraf ketelitian 5% dan diadakan uji lanjut dengan menggunakan metode DMRT.