BAB III. METODOLOGI

3.1.Tempat dan Waktu

Penelitian dilakukan secara *in vitro* di Laboratorium Mikologi II jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya Malang dan lahan pertanian seledri di dusun Klerek, desa Turungrejo, kecamatan Bumiaji, kota Batu sejak Maret 2014 sampai Januari 2015.

3.1.1 Alat

Alat yang digunakan meliputi autoclave, mikroskop, enlemeyer, alumunium foil, plastik wraping, korek api, buku identifikasi, cawan petri, LAFC, beaker glass, shaker, pipet, cock borer 0,5 cm, scapel, pinset, bunsen, kamera, penggaris, alat tulis, dan tisu.

3.1.2 Bahan

Bahan yang digunakan meliputi daun seledri terserang patogen *Colletotrichum* sp dan daun seledri sehat, media PDA, alkohol 70%, aquades setril, khlorox (NaOCl 2%).

3.2 Persiapan Penelitian

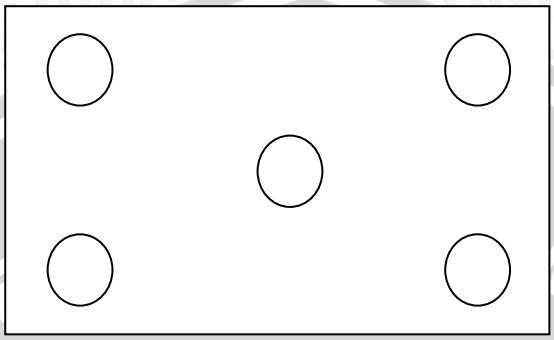
3.2.1 Pengambilan sampel patogen

Sampel patogen *Colletotrichum* sp. didapatkan dari lahan pertanian seledri di dusun Klerek, desa Turungrejo, kecamatan Bumiaji, kota Batu. Sampel didapatkan dengan mengambil daun seledri yang menunjukkan gejala antraknosa. Daun seledri bergejala diambil sebanyak 10 helai daun kemudian dibawa ke laboratorium Mikologi Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya untuk diidentifikasi. Setelah isolat patogen *Colletotrichum* sp. didapatkan, dilakukan perbanyakan isolat untuk uji antagonis dengan mikroorganisme filoplane.

3.2.2 Pengambilan sampel jamur filoplane

Sampel filoplane didapatkan dari lahan pertanian seledri di dusun Klerek, desa Turungrejo, kecamatan Bumiaji, kota Batu. Sampel daun seledri sehat diambil secara diagonal, dimana terdapat lima titik

pengambilan sampel. Pada setiap titik sampel digunakan 3 tanaman. Sampel daun yang digunakan diambil pada daun atas, tengah, dan bawah. Daun seledri atas yaitu daun yang berada di dekat tunas, daun seledri tengah yaitu daun yang berada di bagian tengah tanaman, dan daun seledri bawah yaitu daun yang tumbuh 10 cm di atas permukaan tanah.



Gambar 5. Titik pengambilan sampel

3.3 Pelaksanaan

Penelitian ini terdiri atas 3 tahap percobaan. Tahap pertama adalah isolasi dan identifikasi jamur patogen. Tahap kedua adalah eksplorasi dan identifikasi jamur filoplane. Tahap ketiga adalah uji antagonis jamur filoplae terhadap jamur patogen *Colletotrichum* sp. secara *in vitro* di laboratorium Mikologi Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan Fakulltas Pertanian Universitas Brawijaya.

3.3.1 Isolasi dan identifikasi patogen

Tujuan : mendapatkan isolat jamur *Colletotrichum* sp. dari lapang dan merangsang sporulasinya di media buatan yang sesuai.

Langkah-langkah: pertama, daun seledri yang menunjukkan gejala dibungkus dengan kertas agar mikroorganisme yang berada di permukaan daun tidak mati. Di laboratorium, daun-daun tersebut dipotong kecil-kecil dengan scapel steril berukuran 1x1 cm^2 dengan perbandingan jaringan yang sehat ¼ dan yang sakit ¾ bagian (Sastrahidayat, 1997). Kemudian potongan daun tersebut dimasukkan ke dalam Klorox (NaOCl 2%), alkohol 70%, dan direndam aquades sebanyak dua kali masing-masing selama 2 menit. Kemudian spesimen daun ditiriskan di tisu lalu ditanam di

media PDA. Hal ini dimaksudkan untuk mendapatkan isolat jamur *Colletrotichum* sp. Pemurnian terus dilakukan sampai didapatkan satu koloni jamur yang dimaksud.

3.3.2 Isolasi dan identifikasi jamur filosfer

Tujuan : mendapatkan mikroorganisme yang berasal dari permukaan daun seledri.

Pada tahap ini, metode yang digunakan adalah metode *leaf imprint* (Gambar 6). Sampel daun seledri diambil dari lahan pertanian seledri di dusun Klerek, desa Turungrejo, kecamatan Bumiaji, kota Batu. Sampel diambil secara diagonal, dimana terdapat lima titik pengambilan sampel dan di setiap titik digunakan 3 tanaman seledri. Sampel daun yang digunakan adalah daun pada bagian atas, tengah, dan bawah.

Langkah-langkah: bagian permukaan atas daun seledri yang sehat ditempel di permukaan media selama 4 jam dengan ditekan pada seluruh bagian permukaan daun agar mikroorganisme yang menempel dapat berpindah ke media, kemudian diinkubasi. Lakukan hal yang sama pada bagian bawah permukaan daun (Aneja, 2003).

Daun seledri sehat

↓

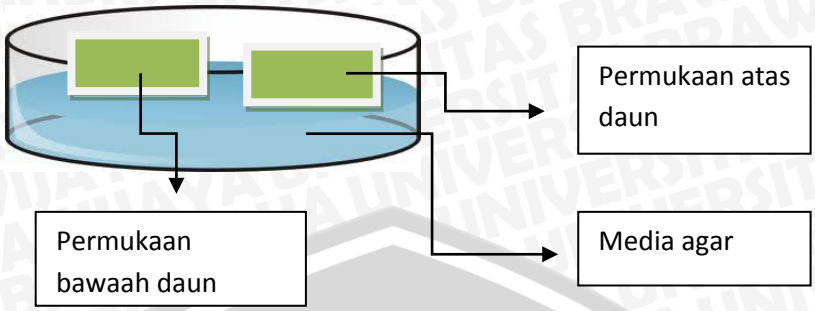
Ditempel di permukaan media ± 4 jam dengan ditekan pada seluruh bagian permukaan daun

↓

Daun diambil

↓

Media diinkubasi



Gambar 6. Penempelan daun pada metode *leaf imprint*

Isolat jamur diidentifikasi sampai tingkat genus. Jamur diambil dari biakan untuk dimurnikan dan diamati morfologi jamur yang didapat meliputi bentuk, warna, dan ukuran konidia/spora, konidiofor, dan miselium. Pengamatan mikroorganisme mengacu pada buku identifikasi mikroflora untuk dapat menentukan spesies organisme yang didapatkan.

Identifikasi dilakukan berdasarkan panduan identifikasi jamur, Barnett dan Hunter (1972) dan Sastrahidayat (2011). Kunci identifikasi yang digunakan untuk mengidentifikasi jamur filoplane ada pada Lampiran 1. Pengamatan makroskopis meliputi warna koloni, bentuk koloni dalam cawan petri (konsentris dan tidak konsentris), tekstur koloni dan pertumbuhan koloni (cm/hari). Data pengamatan makroskopis berada pada Lampiran 2. Pengamatan secara mikroskopis meliputi ada tidaknya septa pada hifa (bersekat atau tidak bersekat), pertumbuhan hifa (bercabang atau tidak bercabang), warna hifa dan konidia (gelap atau hialin transparan), ada atau tidaknya konidia, dan bentuk konidia (bulat, lonjong, berantai atau tidak beraturan).

3.3.3 Uji antagonis jamur filoplane dengan *Colletotrichum* sp.

Tujuan : mengetahui besarnya hambatan jamur filoplane terhadap pertumbuhan *Colletotrichum* sp. secara in vitro.

Pada uji antagonis digunakan metode oposisi langsung. Metode oposisi langsung yaitu metode uji antagonis dengan membiakkan isolat jamur patogen dan satu jamur antagonis secara berhadapan dalam satu cawan petri berdiameter 9 cm yang berisi media PDA. Pemotongan jamur

dengan menggunakan chock borer berdiameter 0,5 cm. Diameter awal masing-masing jamur patogen dan jamur filoplane adalah 0,5 cm. Jarak antara jamur patogen dan jamur filoplane adalah 3 cm. Biakan diinkubasikan dalam suhu kamar dan diamati bersama dengan jamur kontrol selama 7 hari.

3.4 Parameter Pengamatan

1. Hasil identifikasi jamur patogen dan jamur filoplen

Cendawan yang diperoleh dalam biakan murni, diidentifikasi secara makroskopis dan mikroskopis. Secara makroskopis yaitu pengamatan langsung dengan melihat ciri khas koloni berupa warna, tipe pertumbuhan dan karakteristik lain yang bisa dilihat dengan mata telanjang. Sedangkan secara mikroskopis yaitu identifikasi dengan bantuan mikroskop binokuler dan buku identifikasi mikroflora. Pengamatan ini untuk mengidentifikasi ciri dan karakteristik koloni cendawan seperti: spora, hifa, konidia, konidiofor dan klamidospora.

2. Presentase penghambatan mikroorganisme antagonis.

Penghambatan jamur antagonis diamati untuk mengetahui kemampuan suatu jamur dalam menghambat atau membunuh mikroorganisme lain baik secara antibiosis, kompetisi nutrisi, maupun parasitisme. Kemampuan antagonisme dapat digunakan untuk menghetahui daya hambat suatu mikroorganisme sebagai agen hayati bagi patogen tanaman.

3.5 Analisis Data

1. Presentase penghambatan mikroorganisme

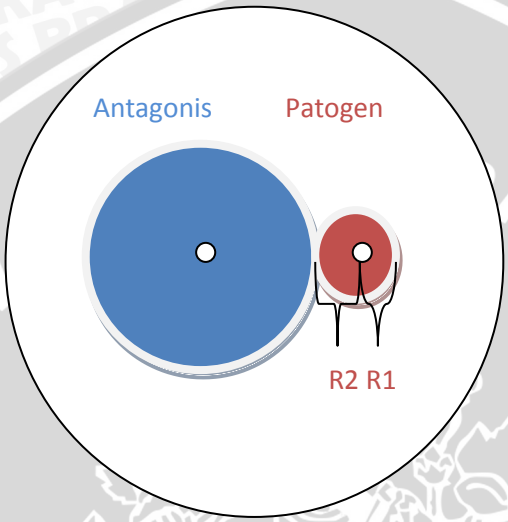
a. Metode oposisi langsung

$$P = \frac{R1-R2}{R1}\ x\ 100\%$$

P = Presentase penghambatan

R1 = jari-jari jamur patogen yang arahnya berlawanan dengan jamur antagonis

R2 = jari-jari jamur antagonis yang arahnya berlawanan dengan jamur patogen



Gambar 7. Ilustrasi uji antagonis metode oposisi langsung

Keterangan:

R1 = titik tumbuh patogen ke koloni paling luar

R2 = titik tumbuh antagonis ke titik paling luar koloni jamur patogen