III. METODE PELAKSANAAN

3.1. Tempat dan Waktu

Penelitian dilaksanakan secara *in vitro* di laboratorium Mikologi jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya mulai bulan April 2015 hingga bulan Oktober 2015.

3.2. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian adalah autoklaf, objek glass, cover glass, cawan Petri, mikroskop *compound*, *beaker glass*, jarum ose, kok borer diameter 0,5 cm, pinset, korek api, *alumunium foil*, plastik *wrap*, kompor listrik, saringan, pengaduk, bunsen, timbangan Ohauss, pisau, penggaris, spayer, plastik PP, alat tulis, buku identifikasi Barnett dan Hunter (1972), Sastrahidayat (2011), dan Watanabe (2002), serta kamera digital.

Bahan yang digunakan untuk penelitian adalah isolat jamur *Colletotrichum* sp., tanaman anthurium sehat, agar, dekstrose, kentang, *streptomycin*, aquades, kloroks, alkohol, dan *ethylen blue*.

3.3. Persiapan Penelitian

3.3.1. Pengambilan Sampel Patogen

Sampel patogen *Colletotrichum* sp. didapatkan dari daun tanaman anthurium yang menunjukkan gejala penyakit yang ditanam di taman Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya, Malang. Daun anthurium yang bergejala diambil dua helai untuk dibawa ke laboratorium Mikologi Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya untuk diidentifikasi. Identifikasi yang dilakukan meliputi ciri makroskopis dan mikroskopis dengan mengacu pada buku identifikasi. Kemudian isolat patogen diperbanyak pada media PDA untuk uji antagonis dengan jamur filoplen.

3.3.2. Pengambilan Sampel Jamur Filoplen

Sampel jamur filoplen didapatkan dari tanaman athurium yang ditanam di rumah warga Desa Kedungpedaringan Kecamatan Kepanjen Kabupaten Malang.

Sampel diambil dari daun tanaman sehat secara acak sebanyak dua helai daun dan dimasukkan ke dalam plastik. Kemudian sampel daun dibawa ke laboratorium Mikologi Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya Malang.

3.3.3. Penyiapan medium PDA (*Potato Dextrose Agar)*

Persiapan media PDA dilakukan dengan cara membuat campuran sari kentang, *dextrose*, dan agar. Kentang 250 gr dikupas dan dicuci bersih lalu dipotong kecil-kecil dan direbus dalam 1 liter aquades. Setelah kentang lunak, kemudian disaring dan sari kentang dicampur dengan 20 gr agar dan 20 gr dekstrose. Campuran tersebut dipanaskan kembali agar terlarut di atas air mendidih. Kemudian dimasukkan ke dalam botol serta disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121 °C tekanan 1 atm selama 30 menit. Media PDA yang sudah disterilkan ditambahkan *streptomycin* sebelum dituangkan ke cawan Petri berdiameter 9 cm.

3.4. Pelaksanaan Penelitian

Penelitian yang dilakukan terdiri dari 3 (tiga) tahap percobaan. Tahap pertama adalah isolasi dan identifikasi jamur patogen. Tahap kedua adalah eksplorasi dan identifikasi jamur filoplen. Tahap ketiga adalah uji antagonis jamur patogen *Colletotrichum* sp. dengan jamur filoplen secara *in vitro* di laboratorium Mikologi Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya.

3.4.1. Isolasi dan Identifikasi Jamur Patogen

Tahap ini bertujuan untuk mendapatkan isolat jamur *Colletotrichum* sp. dari lapangan dan dapat diperbanyak di media PDA. Sampel daun berpenyakit yang menunjukkan gejala serangan *Colletotrichum* sp. diambil dan dimasukkan ke dalam kantong plastik agar jamur tetap berada di jaringan tanaman. Sampel daun tersebut dibawa ke laboratorium untuk dipotong ukuran 1 cm x 1 cm dengan bagian 3/4 jaringan sakit dan 1/4 jaringan sehat (Sastrahidayat dan Djauhari, 2012). Kemudian potongan daun direndam selama satu menit ke dalam kloroks (NaOCl 2%), alkohol 70%, dan aquades dua kali. Lalu potongan daun ditiriskan pada tissu untuk di tanam pada media PDA di dalam LAFC. Setelah koloni jamur tumbuh dilakukan pemurnian sampai ditemukan jamur *Colletotrichum* sp. yang dimaksud.

3.4.2. Uji Postulat Koch

Postulat Koch merupakan salah satu metode yang dapat dilakukan untuk membuktikan penyebab suatu penyakit. Metode yang diperkenalkan oleh Robert Koch (1884) digunakan untuk membuktikan suatu patogen apakah benar-benar dapat menimbulkan penyakit pada inangya atau tidak. Penerapan metode ini tidak bisa dilakukan pada patogen yang bersifat parasit obligat, karena patogen tidak dapat dimurnikan dalam media buatan.

Uji postulat Koch dilakukan setelah didapatkan isolat murni *Colletotrichum* sp. pada daun anthurium. Sebanyak lima plong patogen pada media PDA diambil dengan jarum ose dan dilarutkan dalam 20 ml aquades. Kemudian diaduk hingga terbentuk suspensi untuk disemprotkan pada daun tanaman sehat. Sebanyak tiga daun sehat yang disemprot dengan suspensi patogen.

Pengamatan dilakukan setiap hari sampai muncul gejala sesuai dengan gejala pada tanaman yang sakit. Daun yang bergejala diisolasikan pada media PDA dan dilakukan purifikasi hingga didapatkan isolat murni. Jamur yang ditemukan diamati secara makroskopis dan mikroskopis dan disesuaikan patogen awal yang ditemukan. Jika hasil identifikasi kedua jamur tersebut sesuai dinyatakan bahwa jamur tersebut adalah jamur patogen.

3.4.3. Isolasi dan Identifikasi Jamur Filoplen

Tahap ini bertujuan untuk mendapatkan isolat jamur filoplen dari permukaan daun anthurium untuk diujikan dengan jamur patogen. Metode yang digunakan untuk isolasi jamur filoplen yaitu menggunakan metode perendaman (Wijaya *et al.*, 2014). Dua helai daun anthurium yang sehat direndam dan dikocok dalam 100 ml aquades selama 30 menit. Hal ini dimaksudkan agar spora jamur yang berada di permukaan daun dapat tercampur dengan aquades untuk diisolasikan pada media PDA. Sebanyak ±1 ml larutan dituang pada media PDA dan dibiarkan sampai koloni jamur tumbuh.

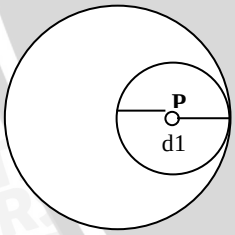
Pengamatan koloni yang terbentuk dilakukan setiap enam jam untuk memudahkan pemindahan masing-masing koloni ke PDA baru. Setiap koloni yang berbeda secara makroskopis dipurifikasi sampai terbentuk koloni murni. Purifikasi dilakukan dengan memperhatikan perbedaan warna dan bentuk koloni jamur dengan cara mengambil sedikit miselium jamur dengan jarum ose ke media

baru. Pengamatan jamur secara makroskopis dan mikroskopis dilakukan selama 7 hari. Kemudian masing-masing koloni yang tumbuh dilakukan identifikasi sampai tingkat genus dengan mengacu pada buku Ilustrated genera of imperfect fungi (Barnett dan Hunter, 1972), Ilmu Jamur (Sastrahidayat, 2011), dan Pictorial atlas of soil and seed fungi (Watanabe, 2002).

3.4.4. Uji Antagonis

Perlakuan yang digunakan dalam penelitian ini adalah RAL (Rancangan Acak Lengkap) dengan lima kali ulangan. Pengujian antagonisme jamur filoplen potensial dengan *Colletotrichum* sp. dilakukan pada medium PDA secara oposisi langsung atau kultur ganda (Skidmore dan Dickinson, 1976). Masing-masing jamur filoplen dan *Colletotrichum* sp. ditanam secara berhadapan dengan jarak 3 cm pada cawan Petri berdiameter 9 cm. Kemudian diinkubasikan selama sembilan hari pada suhu kamar. Pada hari terakhir dilakukan pengamatan secara mikroskopis terhadap penghambatan pertumbuhan *Colletotrichum* sp. oleh jamur antagonis.

Presentase penghambatan jamur filoplen secara oposisi langsung dibandingkan dengan kontrol. Jamur patogen ditumbuhkan pada media PDA tanpa jamur antagonis sebagai kontrol. Pengamatan dilakukan setiap hari dimulai dari hari pertama setelah inokulasi sampai hari ke-9. Berdasarkan Pradana *et al.* (2012) kontrol patogen dapat digambarkan sebagai berikut:

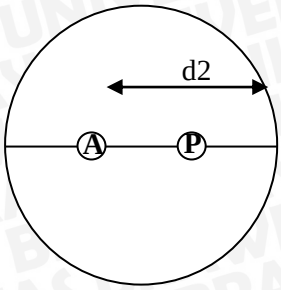


Keterangan:
P : koloni jamur patogen
d1 : diameter koloni patogen kontrol

3.5. Parameter Percobaan

3.5.1. Presentase Penghambatan

Tingkat penghambatan antagonis dihitung dengan rumus serta diadakan pengamatan mikroskopis terhadap adanya kerusakan hifa jamur patogen yang berinteraksi dengan jamur antagonis. Penghambatan pertumbuhan miselium jamur patogen oleh jamur antagonis dihitung berdasarkan rumus yang diadaptasikan dari rumus yang dikemukakan oleh Pradana *et al.* (2012) yaitu:



$$PP = \frac{d1 - d2}{d1} \times 100\%$$

Keterangan.

PP: Presentase penghambatan, P: koloni jamur patogen, A: koloni jamur antagonis, d1: diameter patogen kontrol, d2: diameter patogen yang diantagoniskan

3.5.2. Mekanisme Antagonisme

Mekanisme interaksi yang terjadi antara jamur patogen dengan jamur antagonis didasarkan pada kriteria yang dikemukakan oleh Skidmore & Dickinson (1976) *dalam* Amaria *et al*. (2015), yaitu:

a. Kompetisi, apabila koloni jamur antagonis menutupi koloni patogen dan pertumbuhan jamur antagonis lebih cepat untuk memenuhi cawan Petri berdiameter 9 cm.
b. Antibiosis, apabila terbentuk zona kosong di antara jamur patogen dengan jamur antagonis, terdapat perubahan bentuk hifa patogen, dan dihasilkan pigmen di permukaan bawah koloni jamur antagonis.
c. Parasitisme, apabila hifa jamur antagonis tumbuh di atas hifa patogen, pada daerah kontak ditemukan hifa jamur antagonis melilit hifa patogen, serta mengalami lisis.

3.6. Analisis Data

Analisis data dilakukan secara deskriptif dan dengan uji statistik. Secara deskriptif yaitu dengan menyajikan data dalam bentuk tabel dan grafik beserta deskripsinya. Analisis data secara statistik dalam penelitian ini adalah dengan uji ANOVA dan jika hasilnya berbeda nyata akan diuji lanjutan menggunakan Duncan dengan taraf kesalahan 5%.