

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan waktu penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Siliwangi dan *green house* Balai Perlindungan Tanaman Pangan dan Hortikultura Sub Unit Pelayanan PTPH Wilayah V Kota Tasikmalaya Jawa Barat yang dilaksanakan pada bulan September hingga Desember 2023.

3.2 Alat dan bahan penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu jarum ose, bunsen, korek api, cawan petri, tabung reaksi, gelas ukur, enlemeyer, mikropipet, autoclave, laminar air flow, timbangan, tray pot, polybag ukuran 30 cm x 40 cm, gembor, cangkul, kertas, saringan, plastik tahan panas, label, meteran, jangka sorong, kamera, dan alat tulis.

Adapun bahan yang digunakan yaitu benih tomat, pupuk kandang, pupuk NPK, beras menir, PDA, PDB, isolat *Trichoderma harzianum*, PGPR, *Fusarium oxysporum*, aquades, benih tomat varietas Tymoti.

3.3 Metode penelitian

a. Uji di laboratorium

Uji untuk mengetahui persentase penghambatan oleh *Trichoderma harzianum* terhadap *Fusarium oxysporum*, dengan metode biakan ganda yang dilakukan dengan menempatkan potongan miselium *Fusarium oxysporum* dan *Trichoderma harzianum* pada media *Potato Dextrose Agar* (PDA) dalam satu cawan petri.

b. Uji di lapangan

Metode yang digunakan dalam penelitian ini yaitu metode eksperimental dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan perlakuan sebagai berikut:

A : Kontrol (tanpa *T. harzianum* + tanpa PGPR)

B : *T. harzianum* 10 g/tanaman

C : *T. harzianum* 20 g/tanaman

D : *T. harzianum* 10 g/tanaman + PGPR 15 ml/tanaman

E : *T. harzianum* 10 g/tanaman + PGPR 30 ml/tanaman

F : *T. harzianum* 20 g/tanaman + PGPR 15 ml/tanaman

G : *T. harzianum* 20 g/tanaman + PGPR 30 ml/tanaman

Percobaan ini terdiri dari 7 perlakuan dan diulang sebanyak 4 kali ulangan sehingga terdiri dari 28 unit percobaan.

Model linier dari Rancangan Acak Lengkap (RAL) adalah sebagai berikut:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

Dengan:

I : 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10

j : 1,2,3

Keterangan:

γ_{ij} : Pengamatan pada perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

μ : Rataan umum

τ_i : Pengaruh perlakuan ke-i

ε_{ij} : Pengaruh acak pada perlakuan ke-i ulangan ke-j

Berdasarkan metode linear tersebut disusun dalam daftar sidik ragam sebagai berikut:

Tabel 1. Daftar Sidik Ragam

Sumber	Db	JK	KT	F hitung	F tabel 5%
Keragaman					
Perlakuan	$7 - 1 = 6$	JKP	KTP	$\frac{KTP}{KTG}$	2,57
Galat	$7(4 - 1) = 21$	JKG	KTG		
Total	$7.4 - 1 = 27$	JKT			

Sumber: Gomez dan Gomez, (2010)

Pengaruh yang diberikan terhadap tanaman tomat diketahui dengan menggunakan uji F.

Tabel 2. Kaidah Pengambilan Keputusan

Hasil analisis	Kesimpulan analisa	Keterangan
$F_{hit} \leq F_{0.05}$	Berbeda tidak nyata	Tidak ada pengaruh antar perlakuan
$F_{hit} > F_{0.05}$	Berbeda nyata	Ada perbedaan pengaruh antar perlakuan

Sumber: Gomez dan Gomez, (2010)

Jika nilai F menunjukkan perbedaan nyata maka dilakukan uji lanjut dengan Uji Jarak Berganda Duncan pada taraf nyata 5% dengan rumus sebagai berikut:

$$LSR = SSR.S_x$$

$$SSR = (\alpha, dBg, p)$$

Nilai S_x dapat dicari menggunakan rumus sebagai berikut:

$$S_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{KT \text{ galat}}{r}}$$

Keterangan :

S_x : Galat baku rata-rata (*Standard Error*)

KTG : Kuadrat tengah galat

R : Jumlah ulangan pada tiap nilai tengah perlakuan yang dibandingkan

SSR : *Significant Studentized Range*

α : Taraf nyata

dBg : Derajat bebas galat

P : Jarak antar perlakuan (range)

LSR : *Least Significant Range*

3.4 Prosedur penelitian

3.4.1 Pelaksanaan uji di Laboratorium

a. Sterilisasi alat

Sterilisasi alat yang digunakan yaitu:

1. Pemijaran (dengan api langsung): membakar alat seperti jarum ose pada api secara langsung.
2. Sterilisasi dengan menggunakan autoclave: sebelum dimasukkan ke dalam autoclave alat-alat yang terbuat dari kaca dibungkus dengan kertas dan kantong plastik tahan panas, disterilisasi dengan suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 30 menit.

b. Persiapan inokulum

Sumber Agen hayati *Trichoderma harzianum* dan PGPR diperoleh dari Klinik Tanaman Balai Perlindungan Tanaman Pangan dan Hortikultura Sub Unit Pelayanan PTPH Wilayah V Kota Tasikmalaya dan *Fusarium oxysporum*

diperoleh dari Balai Perlindungan Tanaman Pangan dan Hortikultura Provinsi Jawa Barat.

c. Pembuatan media inokulum *Trichoderma harzianum*

Media yang digunakan untuk inokulasi jamur yaitu media PDA (*Potato Dextrose Agar*) sebanyak 3,12 gram yang ditambahkan aquades steril sebanyak 80 ml dihomogenkan menggunakan hot plat dengan magnetic stirrer. Media PDA digunakan untuk peremajaan *Trichoderma harzianum*, *Fusarium oxysporum*, dan pengujian uji daya hambat. Media PDB (*Potato Dextrose Broth*) sebanyak 19,59 gram yang ditambahkan aquades steril sebanyak 500 ml dihomogenkan menggunakan hot plat magnetic stirrer, 1 ose jamur *Fusarium oxysporum* diinokulasikan ke dalam media PDB dan digojog menggunakan shaker rotator selama 10 menit. Media PDB digunakan untuk inokulasi *Fusarium oxysporum* dalam media cair.

d. Uji agen hayati *Trichoderma harzianum* dengan patogen *Fusarium oxysporum* secara in-vitro

Uji daya hambat dilakukan dengan cara, inokulum diletakkan pada cawan petri yang sudah diisi media PDA, dan untuk pengujian diberi dua titik dan dibuat garis tegah pada cawan petri. Untuk mengetahui interaksi *Trichoderma harzianum* dan *Fusarium oxysporum* tersebut maka diinkubasi selama 1 sampai 7 hari pada suhu kamar untuk menentukan mana yang lebih dominan antara agen hayati *Trichoderma harzianum* dan patogen *Fusarium oxysporum*.

e. Perbanyak inokulum *Trichoderma harzianum*

Media tumbuh agen hayati yaitu dengan menggunakan beras menir yang dicuci terlebih dahulu kemudian direndam selama 30 menit, lalu dimasukkan ke dalam kantong plastik anti panas dan ditimbang, kemudian disteam menggunakan autoclave selama 2 jam dengan suhu 121°C yang bertujuan untuk mensterilisasikan dari mikroba. Isolat murni sebanyak 0,9 g dimasukkan ke dalam kantong plastik berisi beras menir kemudian dicampur rata. Setelah isolat dengan media tercampur rata, kantong plastik dilipat dan disimpan di ruangan dengan suhu kamar (Pratiwi dan Firmansyah, 2022).

f. Penyiapan *Trichoderma harzianum* dan PGPR

Trichoderma harzianum pada media beras ditimbang sesuai dengan dosis perlakuan, kerapatan spora yang terkandung yaitu 10^6 spora/ml dan PGPR dengan kerapatan koloni 10^9 cfu (*Colony Forming Unit*)/ml ditakar sesuai dengan dosis perlakuan.

g. Penyiapan suspensi inokulum *Fusarium oxysporum*

Fusarium oxysporum dari media cair (PDB) disuspensikan dengan mengambil 1 ml *Fusarium oxysporum* kemudian menambahkan 9 ml aquades steril kemudian diaduk menggunakan mikropipet dan dilakukan pengenceran bertingkat dengan cara dimasukan ke dalam 6 tabung reaksi yang sudah berisi aquades steril, masing-masing tabung diberi 1 ml *Fusarium oxysporum* dengan konsentrasi yang digunakan untuk aplikasi adalah 10^6 spora/ml.

3.4.2 Pelaksanaan uji di lapangan

a. Penyemaian

Media persemaian terdiri dari tanah dan pupuk kandang dimasukan ke dalam tray pot. Benih disemai selam 3 minggu dan dilakukan penyiraman setiap hari sampai benih siap dipindahkan ke polybag penanaman.

b. Penyiapan media tanam

Media tanam yang digunakan yaitu tanah top soil dan pupuk kandang yang sudah dihitung takarannya dimasukan ke dalam polybag berukuran 35 cm x 40 cm sebanyak 10 kg per polybag. Setiap plot perlakuan terdiri dari 4 polybag dan jarak 60 cm.

c. Penanaman

Penanaman dilakukan setelah bibit yang sudah berumur 3 minggu. Penanaman dilakukan pada pagi hari, terlebih dahulu siram menggunakan air agar tanah menjadi padat untuk menghindari terputusnya akar bibit tanaman tomat.

d. Aplikasi *Trichoderma harzianum* dan PGPR

Trichoderma harzianum dan PGPR diaplikasikan saat pindah tanam dengan cara diinokulasikan di dekat perakaran tanaman.

e. Inokulasi *Fusarium oxysporum*

Fusarium oxysporum diaplikasikan setelah tanaman berumur 7 hari setelah tanam (HST). Masing-masing polybag diberi sebanyak 10 ml.

f. Pemeliharaan

1. Penyiraman

Penyiraman dilakukan dua kali sehari yaitu pada waktu pagi dan sore hari.

2. Pemupukan

Pemupukan terdiri dari pemupukan dasar dan pemupukan susulan. Pemupukan dasar terdiri dari pemberian pupuk kandang sebagai pupuk dasar dengan dosis 20 t/ha (100 g/polybag). Pupuk NPK dosis 500 kg/ha (2,5 g/polybag) diberikan pada umur 15 HST, dan 30 HST. Pemberian pupuk yaitu dengan memberi garit atau lubang disamping tanaman kemudian pupuk ditaburkan dan ditutup kembali dengan tanah.

3. Pemasangan ajir

Ajir dipasang pada tanaman berumur \pm 7 HST. Ajir dibuat dari batang bambu yang dibelah setinggi 80 sampai 100 cm dan lebar 2 sampai 4 cm. Penggunaan ajir ini bertujuan untuk mencegah tanaman agar tidak mudah rebah dan tetap tegak.

4. Penyiangan

Penyiangan dilakukan dengan mencabut gulma secara manual yang tumbuh di dalam polybag. Hal ini dilakukan untuk mencegah gulma mengganggu pertumbuhan tanaman tomat.

5. Pemangkasan tunas air

Pada masa pertumbuhan vegetatif umur 0 sampai 30 HST muncul tunas-tunas air di setiap ketiak daun. Pemangkasan tunas air dilakukan dengan cara memotong menggunakan gunting stek atau menggunakan tangan.

6. Pengendalian hama tanaman

Pengendalian hama dilakukan sesuai dengan serangan pada tanaman tomat. Pengendalian hama dilakukan secara fisik atau mekanis dengan cara mengumpulkan hama yang ada di area pertanaman tomat dan memusnahkannya.

g. Panen

Buah tomat mulai dipanen pada saat tanaman berumur 56 HST. Panen dilakukan 9 kali panen dengan selang waktu 3 hari dengan cara dipetik. Kriteria buah yang siap dipetik dapat dilihat dari warna kulit buah, ukuran buah, keadaan daun dan batang tanaman, yaitu batang menguning, tepi daun tua mengering, dan kulit buah hijau berubah warna kuning kekuning-kuningan, tingkat kematangan hijau kemerahan dan merah.

3.5 Parameter pengamatan

3.5.1 Pengamatan penunjang

Parameter penunjang yaitu pengamatan informasi yang diperoleh dari temuan penelitian yang tidak dianalisis secara statistik. Pengamatan penunjang ini yaitu untuk mengidentifikasi pengaruh dari luar yang mungkin mempengaruhi penelitian. Pengamatan yang dilakukan antaralain :

- a. Uji agen hayati *Trichoderma harzianum* dan PGPR dengan patogen *Fusarium oxysporum* secara *in-vitro*

Pengamatan dilakukan dengan pengamatan pertumbuhan radial koloni (Ainy dkk, 2015) persentase penghambatan pertumbuhan ditentukan berdasarkan persamaan:

$$P (\%) = \frac{R1 - R2}{R1} \times 100\%$$

Keterangan:

P : merepresentasikan persentase penghambatan

R1 : jari-jari koloni *Fusarium oxysporum* yang tumbuh berlawanan dengan mikroorganisme antagonis

R2 : jari-jari koloni *Fusarium oxysporum* yang tumbuh ke arah mikroorganisme antagonis

- b. Suhu dan kelembaban udara
 c. Analisis tanah
 d. Analisis PGPR
 e. Umur mulai berbunga dan umur mulai panen
 f. Hama tanaman

3.5.2 Pengamatan utama

Pengamatan utama yaitu pengamatan pada setiap variabel, data yang dihasilkan dianalisis secara statistik.

a. Tinggi tanaman

Tinggi tanaman diukur dengan menggunakan meteran dari mulai permukaan tanah sampai titik tumbuh. Pengukuran dilakukan pada umur 2, 4, dan 6 MST.

b. Diameter batang

Pengamatan terhadap diameter batang dilakukan dengan menggunakan jangka sorong pada umur 2, 4, dan 6 MST.

c. Jumlah daun

Perhitungan jumlah daun dilakukan pada umur 2, 4, dan 6 MST.

d. Intensitas serangan penyakit

Setiap minggu dilakukan perhitungan setelah timbulnya gejala awal serangan (Sudirman, Sumardiyono, dan Widyastuti, 2011) menggunakan rumus:

$$I_s = \frac{\sum(ni \times vi)}{ZN} \times 100\%$$

Keterangan:

I_s : intensitas serangan penyakit (%)

n_i : jumlah tanaman yang terserang

v_i : nilai kategori dari tanaman terserang

N : nilai kategori tertinggi

Z : jumlah seluruh tanaman yang diamati

Skala intensitas penyakit layu *Fusarium* tomat yaitu:

0 : tidak ada gejala layu

1 : gejala layu ringan

2 : pengerdilan dan klorosis daun

3 : 10% dari daun atau 10% dari tanaman menunjukkan gejala layu

4 : 11-25% dari daun atau 11-25% dari tanaman menunjukkan gejala layu

5 : 26-50% dari daun atau 26-50% dari tanaman menunjukkan gejala layu

6 : 51-100% layu atau tanaman mati.

e. Jumlah buah per tanaman

Perhitungan jumlah buah per tanaman dilakukan saat panen pertama sampai panen akhir pada setiap perlakuan.

f. Bobot buah per buah

Pengamatan bobot buah per buah dilakukan pada saat panen dengan menggunakan timbangan digital.

g. Bobot buah per tanaman

Pengamatan bobot buah per tanaman dilakukan pada saat panen dengan menggunakan timbangan digital.