

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Waktu dan tempat percobaan

Percobaan dilaksanakan pada bulan Desember 2024 sampai dengan Februari 2025 bertempat di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Pertanian Universitas Siliwangi.

3.2 Alat dan bahan percobaan

Bahan yang digunakan pada percobaan ini adalah 3 Isolat *Fusarium* sp., *Trichoderma asperellum*, Media potato destrose agar (PDA), aquadest, NaCl fisiologis dan alkohol. *Fusarium* sp. dan *T. asperellum* adalah koleksi Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Pertanian Universitas Siliwangi. Alat yang digunakan adalah cawan petri, *Erlemeyer*, gelas ukur, *beaker glass*, botol kaca, spatula, tabung reaksi, *laminar air flow*, *autoklaf*, neraca analitik, plastik tahan panas, jarum ose, mikropipet, baki, plastik transparan, *shaker*, pisau steril, *hot plate*, *magnetic stirrer*.

3.3 Metode penelitian

Penelitian disusun berdasarkan Rancangan Acak Lengkap (RAL) Non Faktorial yang terdiri atas 6 perlakuan dan 5 ulangan sehingga diperoleh 30 unit percobaan. Data yang diperoleh dianalisis dengan analisis ragam (ANOVA) dan dilakukan uji LSD (*Least Significance Different*) taraf 5%.

3.4 Analisis data

Setiap unit percobaan terdiri atas *T.asperellum* sehingga secara keseluruhan terdiri atas 30 unit percobaan. Adapun perlakuan yang diujikan yaitu:

$A_0 = \textit{Fusarium}$ sp. kode AK1

$A_1 = \textit{T.asperellum}$ dan *Fusarium* sp. kode AK1

$B_0 = \textit{Fusarium}$ sp. kode AK2

$B_1 = \textit{T.asperellum}$ dan *Fusarium* sp. kode AK2

$C_0 = \textit{Fusarium}$ sp. kode AK3

$C_1 = \textit{T.asperellum}$ dan *Fusarium* sp. kode AK3

Penentuan ulangan dengan menggunakan rumus:

$$t(r-1) \geq 15$$

Keterangan:

t = perlakuan dalam penelitian

r = ulangan dalam penelitian

3.5 Pelaksanaan percobaan

3.5.1 Sterilisasi alat dan bahan

Alat yang digunakan seperti *petridish*, *erlenmeyer*, beaker *glass*, gelas ukur, botol kaca, cawan petri, tabung reaksi dibungkus dengan kertas koran dan plastik transparan kemudian disterilisasi dengan *autoklaf* pada suhu 121°C selama 15 menit. Alat-alat logam disterilisasi dengan disemprotkan alkohol 70% kemudian dilewatkan di atas api bunsen. Adapun sterilisasi alat-alat yang tidak tahan panas yaitu dengan menyemprotkan alkohol 70% (Rodiah, Indriarti dan Fifendy, 2022).

3.5.2 Pembuatan media PDA

Pembuatan media *Potato Dextrose Agar* (PDA) sesuai dengan penelitian Putri (2019) sebagai berikut:

- a) Menimbang 20 gram serbuk PDA dengan neraca analitik, kemudian melarutkan serbuk PDA menggunakan akuades mencapai 1 L pada erlenmeyer.
- b) Memanaskan larutan media dengan menggunakan *hot plate* and *magnetic stirrer* pada suhu 80°C
- c) Medium dimasukkan ke dalam masing-masing erlenmeyer, kemudian ditutup dengan plastik tahan panas hingga rapat
- d) Sterilisasi medium dilakukan dengan *autoklaf* selama 15 menit pada suhu 121°C.
- e) Menuangkan medium pada 40 cawan petri. Adapun 40 cawan petri tersebut diantaranya 10 cawan untuk peremajaan dan 30 cawan untuk pengujian antifungi.

3.5.3 Peremajaan *Fusarium* sp.

Prosedur peremajaan *Fusarium* sp. berdasarkan penelitian Rodiah, Indriarti

dan Fifendy (2022) diantaranya:

- a) Mengambil koloni *Fusarium* sp. dari biakan murni dengan menggunakan jarum ose.
- b) Meletakkan koloni tersebut pada cawan petri yang berisi media PDA.
- c) Media yang berisi fungi tersebut diinkubasi selama 2 x 24 jam pada inkubator.

3.5.4 Cara kerja uji in vitro

Isolat *Trichoderma asperellum* diperbanyak pada media PDA untuk mendapatkan biakan murni. *Trichoderma* yang umum digunakan dalam pengendalian hayati dan dapat tumbuh dengan cepat pada media PDA. Pada fase awal pertumbuhan, koloni fungi ini tampak berwarna putih atau bening, kemudian secara bertahap berubah menjadi hijau, dan pada tahap lanjut membentuk lingkaran konsentris berwarna hijau tua. Perubahan warna ini mencerminkan proses pematangan konidia (Badan Standarisasi Nasional, 2014).

Uji antagonis dilakukan dengan pengujian *dual culture* antara 3 patogen *Fusarium* sp. dengan 1 jenis fungi *Trichoderma*. Uji antagonis dilakukan untuk menguji kemampuan agen antagonis dalam menghambat pertumbuhan dan perkembangan patogen tanaman (Seema dan Devaki, 2012).

3.6 Variabel pengamatan

3.6.1 Parameter penunjang

- a. Mekanisme antagonis *Trichoderma asperellum* terhadap *Fusarium* sp.

Pengamatan mekanisme antagonis dilakukan ketika koloni fungi antagonis dan patogen bertemu. Pengamatan ini dilakukan secara makroskopis melalui pengamatan langsung dan secara mikroskopis dengan pengamatan di bawah mikroskopis. Menurut Farida (1992) dalam Octriana (bahwa mekanisme antagonis meliputi:

1. Kompetisi terjadi apabila koloni fungi antagonis menutupi koloni patogen dan pertumbuhan fungi antagonis lebih cepat untuk memenuhi cawan petri berdiameter 9 cm.

2. Antibiosis dapat terjadi apabila terbentuk zona kosong diantara patogen dengan fungi antagonis, terdapat perubahan bentuk hifa patogen, dan dihasilkan pigmen di permukaan bawah koloni fungi antagonis.
3. Lisis dapat ditentukan apabila hifa fungi antagonis tumbuh di atas hifa patogen. Pada daerah kontak ditemukan hifa fungi antagonis melilit hifa patogen serta mengalami lisis.

b. Karakteristik makroskopis *Fusarium* sp.

Pengamatan karakteristik makroskopis isolat *Fusarium* sp. dilakukan secara visual terhadap masing-masing isolat pada medium PDA mulai dari 7 hari setelah inkubasi (HSI), meliputi:

1. Warna miselium. Pengamatan warna miselium dilakukan 7 hari setelah inkubasi.
2. Arah pertumbuhan miselium. Arah pertumbuhan miselium diamati apakah tegak ke atas atau ke samping, yang dilakukan 7 hari setelah inkubasi.
3. Bentuk miselium. Bentuk miselium diamati apakah miselium halus atau kasar, yang dilakukan 7 hari setelah inkubasi.

c. Karakteristik mikroskopis *Fusarium* sp.

Pengamatan karakteristik mikroskopis dilakukan pada isolat *Fusarium* sp. 7 HSI dengan metode preparat basah dengan menggunakan mikroskop binokuler meliputi:

1. Hifa, Pengamatan dilakukan terhadap warna (berwarna atau hialin/tidak berwarna), sekat (ada atau tidak), dan tekstur koloni depan (*forward*) dan kebalikan (*reverse*).
2. Konidiofor. Pengamatan dilakukan terhadap konidiofor (bercabang atau tidak).
3. Mikrokonidia atau konidia alfa. Pengamatan dilakukan terhadap mikrokonidia (berwarna atau hialin) dan bentuk (bulat, elips, gada, bulan sabit atau ganda).
4. Makrokonidia atau konidia beta. Pengamatan dilakukan terhadap

makrokonidia (berwarna atau hialin) dan bentuk (bulat, elips, gada, bulan sabit atau ganda).

5. Klamidospora. Pengamatan dilakukan terhadap kehadiran dan ciri Klamidospora.

3.6.2 Parameter utama

- a. Diameter koloni *Fusarium* sp.

Pengamatan dilakukan dengan mengukur diameter koloni masing-masing *Trichoderma asperellum*. Pengukuran diameter koloni dilakukan pada media dengan menggunakan jangka sorong secara vertikal dan horizontal, pengukuran mengacu pada pertumbuhan koloni terpanjang dan terpendek yang berpotongan tepat pada titik tengah koloni pada bagian bawah petridish. Pengamatan dilakukan dari hari ke-1 sampai dengan ke-7 setelah inkubasi. Cara penghitungan berdasarkan rumus:

$$D = \frac{d_1 + d_2}{2}$$

Keterangan:

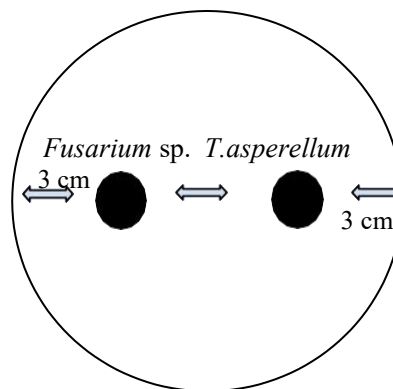
D = Diameter koloni *Fusarium* sp.

d_1 = Jari-jari vertikal koloni fungi *Fusarium* sp.

d_2 = Jari-jari horizontal koloni fungi *Fusarium* sp.

- b. Uji antagonis antara patogen *Fusarium* sp. dengan fungi *Trichoderma asperellum*

Uji antagonis dilakukan dengan pengujian dual culture antara patogen 3 isolat *Fusarium* sp. dengan satu jenis fungi *Trichoderma asperellum*. Satu koloni patogen diletakkan 3 cm dari tepi cawan petri dan koloni *Trichoderma asperellum* diletakkan berseberangan 3 cm dari tepi cawan petri seperti pada Gambar 7.



Gambar 7. Gambar Pengujian *Fusarium* sp. pada cawan petri.
(Sumber : Singh dan Kumar, 2011)

Persentase penghambatan pertumbuhan (*Percentage Growth Inhibition* PGI)
(Ahlem *et al.* 2012, Singh dan Kumar 2011) ditentukan berdasarkan persamaan:

$$PA = \frac{D_1 - D_2}{D_1} \times 100\%$$

Keterangan:

PA = Persentase Antagonis (%)

D1 = Rata-rata pertumbuhan diameter koloni patogen pada kontrol.

D2 = Rata-rata pertumbuhan diameter koloni patogen pada perlakuan.

Persentase penghambatan didasari oleh growth inhibition category (GIC), dengan skala 0–4 (Zivkovic *et al.*, 2010). Kategori tersebut yaitu:

- 1) Skala 0 = tidak ada penghambatan pertumbuhan patogen
- 2) Skala 1 = 1–25% penghambatan pertumbuhan patogen
- 3) Skala 2 = 26–50% penghambatan pertumbuhan patogen
- 4) Skala 3 = 51–75% penghambatan pertumbuhan patogen
- 5) Skala 4 = 76– 100% penghambatan pertumbuhan patogen.

Penentuan kategori kemampuan antagonis dikelompokkan menjadi empat kategori berdasarkan persentase zona penghambatan (Prastya, Supriyadi dan Kusdiyanto, 2014) yaitu:

- 1) Kuat : > 40%
- 2) Sedang : 30% – 40%

- 3) Lemah : $< 30\%$
- 4) Tidak menghambat : 0%