

### III. METODE PENELITIAN

#### 3.1 Waktu dan Tempat Pelaksanaan

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kesehatan Tanaman I UPN “Veteran” Jawa Timur, Laboratorium UPT PTPH Jawa Timur, dan Green House UPT PTPH Jawa Timur pada bulan Desember hingga April 2019.

#### 3.2 Alat dan Bahan

##### 3.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain mesin granulator, *Laminar Air Flow* (LAF), tabung reaksi, gelas Beaker, cawan Petri berdiameter 9 cm, kamera, handcounter, timbangan analitik digital, autoclave, lampu bunsen, mikropipet, jarum ose, tachometer, sprayer, kompor, shaker, ayakan 710  $\mu\text{m}$ , ayakan 0,5 cm, sendok, haemocytometer neubauer, tabung labu.

##### 3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain isolat *Trichoderma* sp. yang merupakan koleksi dari Dr. Ir. Herry Nirwanto, MP., *Collectotrichum* sp. yang merupakan hasil eksplorasi lapangan, benih cabai, kompos produksi Fakultas Pertanian UPN “Veteran” Jawa Timur, tepung beras ketan putih, tepung beras, tepung tapioka, beras jagung, Media PDA (Potato Dekstrosa Agar), aquades steril.

#### 3.3 Metode Penelitian

Penelitian ini terdiri dari empat tahapan, diantaranya yaitu uji efisiensi granulasi, uji antagonis formulasi granular *Trichoderma* sp. terhadap *Collectotrichum* sp. secara *in vitro*, uji daya simpan formulasi granular *Trichoderma* sp. pada beberapa komposisi bahan pembawa, Dan uji formulasi Granular *Trichoderma* sp. sebagai biofertilizer pada tanaman cabai.

##### 3.3.1 Uji Efisiensi Granulasi

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui bahan pembawa yang paling efisien. Dilakukan dengan diulang sebanyak 3 kali.

Adapun perlakuan yang digunakan yaitu :

1. *Trichoderma* sp. kompos (TK)
2. *Trichoderma* sp. kompos 50% dan tepung ketan 50% (TKK)
3. *Trichoderma* sp. kompos 50% dan tepung beras 50% (TKB)

### **3.3.2 Uji Antagonis Formulasi Granular *Trichoderma* sp. terhadap *Colletotrichum* sp. secara In Vitro**

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui kemampuan *Trichoderma* sp. sebagai agens hayati dalam menekan pertumbuhan *Colletotrichum* sp. secara in vitro yang menggunakan 2 faktor yaitu komposisi bahan dan lama masa simpan, yang kemudian disusun menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang diulang sebanyak 3 kali. Adapun 2 faktor yang digunakan, diantaranya :

1. Faktor komposisi bahan, yaitu :
  - a. *Trichoderma* sp. kompos
  - b. *Trichoderma* sp. kompos 50% dan tepung ketan 50%
  - c. *Trichoderma* sp. kompos 50% dan tepung beras 50%
2. Faktor lama masa simpan, yaitu :
  - a. 5 minggu
  - b. 7 minggu
  - c. 9 minggu
  - d. 11 minggu

### **3.3.3 Uji Daya Simpan *Trichoderma* sp. pada Beberapa Komposisi Bahan Pembawa**

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pertumbuhan dan daya simpan *Trichoderma* sp. pada beberapa komposisi bahan pembawa yang menggunakan 2 faktor yaitu komposisi bahan dan lama masa simpan, yang kemudian disusun menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang diulang sebanyak 3 kali. Adapun 2 faktor yang digunakan, diantaranya :

1. Faktor komposisi bahan, yaitu :
  - a. *Trichoderma* sp. kompos
  - b. *Trichoderma* sp. kompos 50% dan tepung ketan 50%
  - c. *Trichoderma* sp. kompos 50% dan tepung beras 50%

2. Faktor lama masa simpan, yaitu :

- a. 5 minggu
- b. 7 minggu
- c. 9 minggu
- d. 11 minggu

### 3.3.4 Uji Formulasi Granular *Trichoderma* sp. Sebagai Biofertilizer Pada Tanaman Cabai

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui kemampuan formulasi granular *Trichoderma* sp. sebagai biofertilizer pada tanaman cabai yang menggunakan RAL (Rancangan Acak Lengkap) dengan 4 perlakuan diulang sebanyak 6 kali. Uji ini menggunakan lama simpan Formulasi Granular *Trichoderma* sp. berumur 7 minggu. Adapun perlakuan yang digunakan yaitu

1. Kontrol (K)
2. *Trichoderma* sp. kompos (TK)
3. *Trichoderma* sp. kompos 50% dan tepung ketan 50% (TKK)
4. *Trichoderma* sp. kompos 50% dan tepung beras 50% (TKB)

Berikut denah rancangan penelitian (Gambar 3.1)

K1	TK1	TK2	K4
TKK1	TKK2	TKB2	TKK6
TK5	TKB1	K2	TKB3
TKK5	K5	TKK3	TKK4
TKB6	TKB5	TKB4	TK4
TK6	K6	TK3	K3

Gambar 3.1 Denah Rancangan Percobaan Formulasi *Trichoderma* sp. Biofertilizer Pada Tanaman Cabai

Keterangan :

K : Kontrol (Tanpa Perlakuan)

TK : Pemberian *Trichoderma* sp. pada formulasi kompos

TKK : Pemberian *Trichoderma* sp. pada formulasi kompos 50% dan tepung ketan 50%

TKB : Pemberian *Trichoderma* sp. pada formulasi kompos 50% dan tepung beras 50%

### **3.4 Pelaksanaan Penelitian**

#### **3.4.1 Sterilisasi Alat**

Menyiapkan peralatan yang akan disterilkan, diantaranya cawan petri, tabung reaksi, dan Erlenmeyer. Mencuci ketiga alat tersebut menggunakan sabun dan dibilas dengan air hingga bersih kemudian dikeringkan. Membungkus cawan petri menggunakan kertas HVS putih. Menyumbat tabung reaksi dan Erlenmeyer menggunakan kapas. Kemudian untuk erlenmeyer, menutupnya dengan aluminium foil. Tabung reaksi setelah disumbat kapas, dimasukkan kedalam plastik. Selanjutnya, semua alat dimasukkan kedalam autoclave untuk disterilkan pada suhu 121°C, tekanan 1.5 atm selama 20 menit.

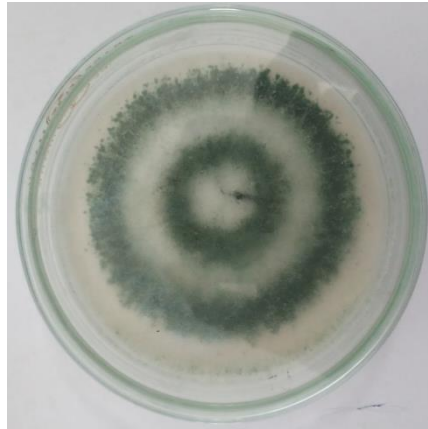
#### **3.4.2 Pembuatan Media Potato Dektrosa Agar (PDA)**

Menimbang 39 g bubuk *potato dextrose agar* dan Menyiapkan 1000 ml aquades dalam gelas beaker. Menambahkan semua bahan yang telah ditimbang ke dalam gelas beaker tersebut. Memasukkan gelas beaker (berisi media PDA) tersebut ke dalam panci yang berisi air. Mengaduk media PDA secara teratur hingga terlarut dan mendidih.

Media PDA yang telah siap, dituangkan kedalam erlenmeyer steril dan menutupnya dengan kapas. Setelah itu, mensterilkan kedalam autoclave pada suhu 121°C, tekanan 1.5 atm selama 15 menit. Memindahkan media PDA yang telah steril untuk disimpan pada suhu kamar (28°C).

#### **3.4.3 Peremajaan Isolat *Trichoderma* sp.**

Meremajakan isolat *Trichoderma* sp. (Gambar 3.2) dengan cara yaitu memindahkan hifa yang tumbuh pada biakan induk dengan menggunakan jarum ose steril pada cawan petri yang berisikan medium PDA. Memindahkan masing – masing isolat kedalam inkubator untuk di lakukan inkubasi selama 5-7 hari. Seluruh tahapan peremajaan dilakukan secara aseptis didalam Laminar Air Flow (LAF).



Gambar 3.2 *Trichoderma* sp.

#### **3.4.4. Pembuatan Media Beras Jagung Untuk Pertumbuhan *Trichoderma* sp.**

Mencuci beras jagung sebanyak 2 kg dengan menggunakan air yang mengalir. Mengukus beras jagung dilakukan selama 20 menit kedalam panci, setelah 10 menit diaduk dengan merata. Memindahkan beras jagung tersebut setelah setengah matang kedalam nampan. Menambahkan 40 gr gula dan 2 sendok kulit udang dan mengaduknya hingga merata pada beras jagung. Memasukkan 200 gram beras jagung kedalam plastik kemudian mensterilkannya kedalam autoclave dengan suhu 121°C, tekanan 1.5 atm selama 15 menit. Memindahkan media PDA yang telah steril untuk disimpan pada suhu kamar (28°C). Setelah sehari, menginokulasikan isolat *Trichoderma* sp. pada cawan petri kedalam media beras jagung. Menginkubasi selama 5-7 hari.

#### **3.4.5 Pembuatan Suspensi *Trichoderma* sp.**

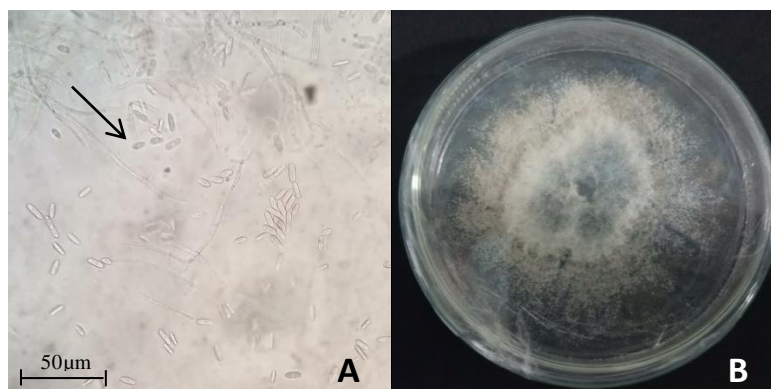
Pembuatan suspensi *Trichoderma* sp. dilakukan dengan menambahkan 4000 ml aquades steril dan 444,5 gr beras jagung yang berisikan biakan *Trichoderma* sp. kedalam tabung labu (Lampiran 5). Kerapatan cendawan *Trichoderma* sp. yang digunakan yaitu  $7,4 \times 10^8$  konidia/ml.

#### **3.4.6 Isolasi dan Identifikasi Cendawan *Colletotrichum* sp.**

Mencari tanaman cabai yang terserang *Colletotrichum* sp. dilahan pertanian tepatnya di Desa Bulu, Kecamatan Sugihwaras, Bojonegoro. Mengisolasi bagian cabai yang terserang patogen dengan cara membersihkan dengan air, kemudian mensterilkan dengan mengusapkan alkohol 70% pada bagian cabai yang akan diisolasi. Cabai tersebut di potong-potong berukuran 0,5

cm x 0,5 cm. Selanjutnya diinokulasi pada media PDA dan diinkubasi selama  $\pm$  3 hari.

Memurnikan cendawan yang tumbuh di sekitar bagian tanaman pada media PDA dan diinkubasi selama 7 hari. Mengamati bentuk konidia patogen *Colletotrichum* sp (Gambar 3.3 A). Apabila telah mendapatkan *Colletotrichum* sp. yang murni kemudian diperbanyak pada media PDA (Gambar 3.3 B).



Gambar 3.3 Patogen *Colletotrichum* sp. (A) konidia (tanda panah) (p.400x), (B) Isolat *Colletotrichum* sp. (7 HSI)

#### 3.4.7 Menghitung Kadar Air Bahan

Menimbang cawan petri dan 2 gram sampel bahan meliputi kompos, tepung ketan, dan tepung beras. Kemudian dioven pada suhu 110°C selama 24 jam (Lampiran 6). Memasukkan dalam desikator. Ketika sudah dingin menimbang kembali cawan petri dan bahan (Priyono, 2011).

#### 3.4.8 Sterilisasi Bahan

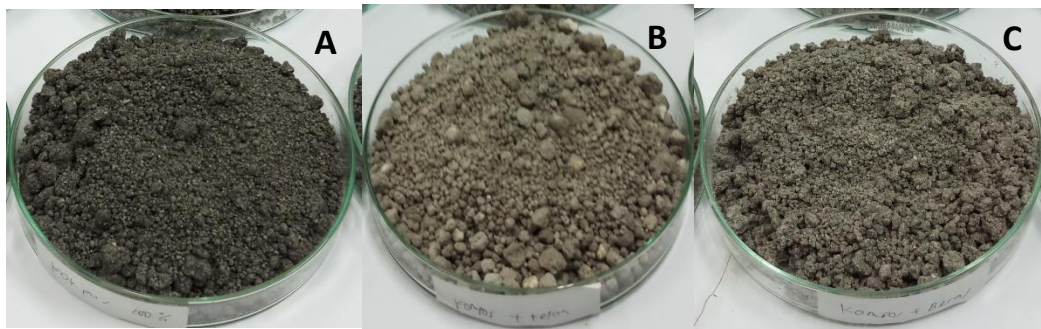
Menyiapkan bahan-bahan yang akan digunakan untuk media pertumbuhan dan bahan perekat, diantaranya kompos, tepung beras, tepung ketan, dan tepung tapioka. Menimbang bahan pembawa sebesar 100 gram dan bahan perekat 200 gram dan menempatkannya pada plastik polyethlen berukuran 1 kg. Mensterilkan bahan tersebut dengan menggunakan autoclave pada 121°C, 1,5 atm selama 15 menit. Setelah itu, menyimpan pada suhu kamar 28°C.

#### 3.4.9 Pembuatan Formulasi Granular

Suspensi *Trichoderma* sp. dimasukkan kedalam handsprayer sebanyak 130 ml. Meletakkan bahan pada bidang putar granulator diantaranya, kompos 100 gram, kompos 50 gram dan tepung ketan 50 gram, kompos 50 gram dan tepung

beras 50 gram, masing – masing dilakukan dengan pemberian 200 gram tepung tapioka sebagai perekat. Kemudian menyalakan mesin granulator.

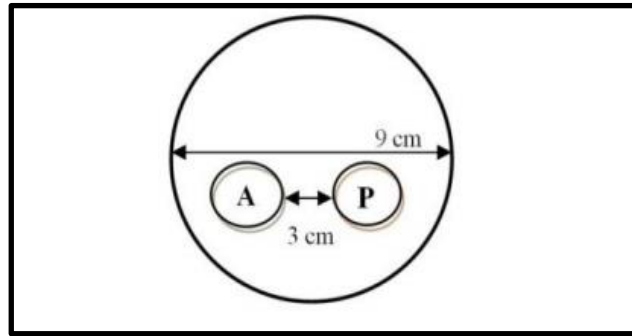
Menyemprotkan suspensi *Trichoderma* sp. dengan handsprayer, hingga terbentuk butiran-butiran gumpalan tepung berukuran kecil. Penyemprotan dilakukan secara merata agar tidak terjadi penggumpalan besar. Granul yang terbentuk dikering anginkan, setelah kering granul diayak (Gambar 3.4). Granul yang telah kering disimpan pada plastik kemudian diinkubasi dalam ruang sesuai dengan perlakuan. Lama penyimpanan sesuai dengan perlakuan yaitu 5, 7, 9, dan 11 minggu.



Gambar 3.4 Formulasi Granular *Trichoderma* sp. (A). Kompos, (B). Kompos & Tepung Ketan (50:50), (C). Kompos & Tepung Beras (50:50).

#### 3.4.10 Uji Antagonis *Trichoderma* sp. terhadap *Colletotricum* sp. secara in Vitro

Menurut Pratama *et al.* (2013) bahwa pengujian antagonis dilakukan dengan menggunakan metode kultur ganda (Gambar 3.5). Mengambil granul *Trichoderma* sp. berumur sesuai perlakuan penyimpanan dan *Colletotricum* sp. dengan ukuran 0,5 cm. Meletakkan *Trichoderma* sp. dan *Colletotricum* sp. pada masing-masing media sesuai dengan perlakuan secara berpasangan yang berjarak masing-masing 3 cm pada media PDA (*Potato Dextrose Agar*). Pengamatan dilakukan dalam waktu 3-5 hari, yaitu dengan mengukur jari-jari koloni isolat *Colletotricum* sp. yang menuju pusat antagonis dan yang menjauhi pusat antagonis (Rahmawati, Hastuti, & Prabaningtyas., 2016).



Gambar 3.5 Metode Kultur Ganda, (A) *Trichoderma* sp. (P) *Colletotricum* sp. (Alfizar *et al.*, 2013)

### 3.4.11 Persiapan Aplikasi Formulasi Granular Pada Tanaman Cabai

Persiapan aplikasi formulasi granular dilakukan dengan menyiapkan bibit tanaman cabai berumur 21 HST (hari setelah tanam), kemudian memindahkan bibit pada polybag yang berisi media tanam dengan tanah. Mengaplikasikan formula granular sebanyak 40 gram granular per polybag pada tanaman. Aplikasi dilakukan setelah 7 HST (hari setelah transplanting) dengan umur formula granular 7 minggu inkubasi (Pulungan *et al.* 2014). Tanaman dipelihara selama 30 hari setelah diinokulasi pupuk hayati untuk mengetahui efek pupuk hayati pada pertumbuhan awal tanaman.

### 3.5 Parameter Pengamatan

Adapun parameter pengamatan yang digunakan dalam penelitian ini, diantaranya :

#### 3.5.1 Efisiensi Granulasi

Efisiensi granulasi dapat dihitung menggunakan rumus dari Badan Standarisasi Nasional Indonesia (2011).

$$EG = BG / BBA \times 100 \%$$

Keterangan :

EG : efisiensi granulasi (%)

BG : bobot granular yang dihasilkan mesin granulator (kg)

BBA : bobot bahan baku awal yang dimasukkan ke dalam mesin granulator (kg)

#### 3.5.2 Daya Hambat *Trichoderma* sp. terhadap *Colletotrichum* sp. pada Uji Antagonis secara *in Vitro*

Pengamatan yang dilakukan dengan menghitung daya hambat *Trichoderma* sp. terhadap *Colletotrichum* sp. yang diletakkan secara berpasangan



pada cawan petri yang sama. Menurut Narayanasamy (2013) menyatakan bahwa perhitungan presentase daya hambat pada uji antagonis secara in vitro dengan rumus sebagai berikut:

$$R = (R_c - R_i) (R_c^{-1}) \times 100\%$$

Keterangan:

R = Presentasi daya hambat

R<sub>c</sub> = Jari-jari koloni jamur menjauhi pusat antagonis (cm)

R<sub>i</sub> = Jari-jari koloni menuju pusat antagonis (cm)

### 3.5.3 Jumlah *Konidia Trichoderma* sp. pada Formulasi Granular

Sebanyak 1 gram granul berumur 5, 7, 9, 11 minggu dihaluskan dan diencerkan dalam 9 ml aquades, kemudian dilakukan seri pengenceran tingkat 4. Selanjutnya suspensi diambil sebanyak 1 ml dan diteteskan pada *haemocytometer* kemudian ditutup dengan *cover glass*. Pengamatan dengan *haemocytometer* dilakukan dibawah mikroskop perbesaran 400x dengan bantuan alat penghitung handcounter. Perhitungan kerapatan konidia dapat dilakukan dengan rumus sebagai berikut:

$$K = t \times d \times 10^4$$

Keterangan:

K = Jumlah *Konidia Trichoderma* sp.

t = Total konidia dalam semua kotak hitung

d = Faktor pengenceran (Anonim, 2010).

### 3.5.4 Formulasi Granular *Trichoderma* sp. Sebagai Biofertilizer Pada Tanaman Cabai

Pengamatan dilakukan lima hari sekali selama 30 hari dengan parameter jumlah daun dan tinggi tanaman serta berat kering pada akhir pengamatan.

### 3.6 Analisis Data

Data hasil pengamatan dianalisis menggunakan analisis ragam (anova). Apabila nilai F hitung lebih besar daripada F tabel, maka dilakukan Uji lanjut menggunakan Uji Beda Nyata Jujur (BNJ) taraf kesalahan 5% dan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) taraf kesalahan 5%.