

III. BAHAN DAN METODE

3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Penyakit Tumbuhan, Jurusan Proteksi Tanaman Fakultas Pertanian Universitas Lampung dan di perkebunan kakao milik rakyat di Desa Wiyono Kecamatan Gedong Tataan Kabupaten Pesawaran Provinsi Lampung dari bulan Mei sampai dengan Agustus 2011.

3.2. Alat dan bahan

Alat – alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah : cawan petri, tabung reaksi, erlenmeyer, gelas ukur, gelas piala (*beaker glass*), pipet tetes, jarum ose, otoklaf, timbangan elektrik, *laminar air flow*, pisau, kertas *tissue*, nampang, botol semprot, kantong plastik tahan panas, *aluminium foil*, kertas saring, spidol, bor gabus, larutan kloroks, kompor, karet gelang, kertas label, pinset, penggaris, kapas alat ukur (penggaris dan meteran), kertas milimeter.

Bahan – bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah : aquades, alkohol 70%, media PDA, media V8, isolat *P. palmivora*, buah kakao yang terserang *P. palmivora*, dan kitosan berbahan bubuk kulit udang yang diproduksi oleh PT Araminta Sidhakarya di Tangerang Banten.

3.3. Metode Penelitian

Penelitian ini disusun menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) dengan 6 perlakuan termasuk kontrol negatif menggunakan air, kontrol positif menggunakan suspensi fungisida metalaksil serta Suspensi kitosan konsentrasi 2,5%, 5%, 7,5% dan 10%. Keenam perlakuan dilakukan pada satu pohon. Masing-masing perlakuan diulang tiga kali dan masing-masing kelompok dilakukan pada tiga pohon yang berbeda. Perlakuan yang diuji adalah P0 (kontrol berupa air), P1 (kitosan konsentrasi 2,5%), P2 (kitosan konsentrasi 5%), P3 (kitosan konsentrasi 7,5%), P4 (kitosan konsentrasi 10%) dan P5 (fungisida metalaksil konsentrasi 2%).

3.4. Pelaksanaan

1.4.1. Isolasi, identifikasi, dan perbanyakan jamur *P. palmivora*

Jaringan buah kakao yang menunjukkan gejala busuk buah diperoleh dari desa Wiyono, diisolasi dengan cara memotong jaringan buah kakao antara yang busuk dan sehat. Potongan jaringan buah berukuran 5 mm. Potongan jaringan buah dicelupkan dalam larutan NaOCl 0,5% selama 30 detik dan dibilas dengan aquades steril. Setelah itu potongan jaringan buah diinkubasikan dalam media PDA dan diinkubasi selama 7 hari sampai jamur tumbuh memenuhi cawan petri. Biakan jamur yang tumbuh diidentifikasi dan direisolasi kembali pada media V8 sehingga diperoleh biakan murni jamur *P. palmivora*.

3.4.2. Penyiapan suspensi kitosan untuk aplikasi di lapang

Bubuk kitosan hasil produksi PT Araminta Sidhakarya Tangerang ditimbang sebanyak 2,5 mg, 5 mg, 7,5 mg dan 10 mg dan dilarutkan dalam cuka makan (asam asetat 5%) sebanyak 100 ml yang berarti suspensi induk kitosan konsentrasi 2,5% hingga 10%. Suspensi kitosan dalam asam asetat tersebut harus diencerkan dengan aquades steril sebanyak 100 ml sehingga diperoleh konsentrasi kitosan 2,5% hingga 10% dalam pelarut aquades steril.

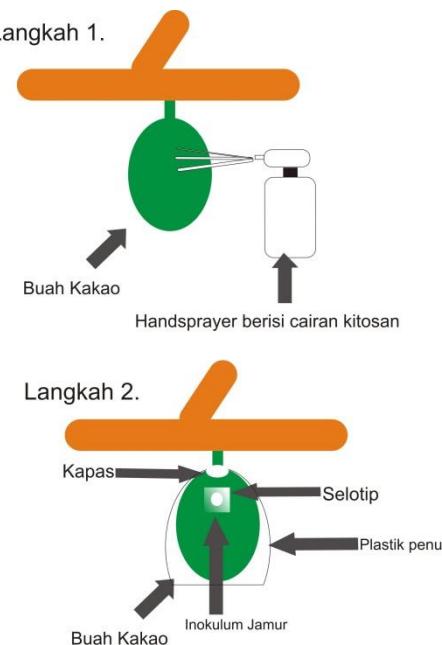
3.4.3. Aplikasi suspensi kitosan di lapang

Dalam perlakuan ini digunakan kontrol negatif berupa air dan fungisida berbahan aktif metalaksil sebagai kontrol positif serta empat taraf Suspensi kitosan. Aplikasi suspensi kitosan dilakukan dengan cara menambahkannya dengan air dan selanjutnya menyemprotkan suspensi kitosan pada buah kakao dengan *handsprayer* sebanyak 10 kali semprotan setiap buah atau sama dengan 25 ml suspensi kitosan.

3.4.4. Inokulasi *P. palmivora* pada buah kakao

Inokulasi *P. palmivora* dilakukan terhadap bagian permukaan buah kakao berukuran diameter 22 cm, dengan cara menempelkan biakan murni *P. palmivora* sebesar 5 mm pada permukaan. Selanjutnya potongan biakan murni tersebut dilekatkan dengan selotip pada permukaan buah kakao tersebut. Untuk menjaga kelembaban buah setelah inokulasi *P. palmivora* maka tangkai buah dililiti kapas yang telah dibasahi dengan air steril sehingga keadaan buah menjadi lembab. Setelah itu, buah kakao dibungkus dengan plastik yang telah diberi label perlakuan, kemudian diikat dengan tali plastik pada pangkalnya. Tahapan aplikasi

Suspensi kitosan dan inokulasi *P. palmivora* pada buah kakao di lapang disajikan pada Gambar 3.



Gambar 3. Cara aplikasi kitosan

3.4.5. Pengamatan dan pengumpulan data

Pengamatan dilakukan setelah timbulnya gejala bercak berwarna coklat pada bagian permukaan buah kakao yang diinokulasi dengan *P. palmivora*.

Selanjutnya setelah timbul gejala bercak coklat dilakukan pengamatan dengan interval waktu satu minggu sekali. Pengamatan keparahan penyakit dilakukan dengan cara mengukur luas gejala busuk yang timbul pada buah kakao.

Pengamatan dihentikan apabila gejala busuk buah pada perlakuan kontrol (yaitu buah kakao yang tidak diberi senyawa penghambat apapun) sudah memenuhi permukaan buah.

Pengamatan keparahan penyakit busuk buah kakao dihitung dengan rumus yang digunakan pada penuntun praktikum epidemiologi dan pengendalian penyakit tumbuhan (Sudiono *et al.*, 2005) sebagai berikut.

$$KP = \frac{\sum ni \times vi}{N \times V} \times 100\%$$

Keterangan:

KP : Keparahan penyakit
 ni : Jumlah buah tiap skor gejala
 vi : Nilai skor tiap gejala
 N : Jumlah buah yang diamati
 V : Skor tertinggi

Pemberian skor gejala busuk pada buah kakao dilakukan menurut metode Suryaningsih (1991) yang digunakan pada penelitian penyakit antraknosa pada buah pepaya yang dimodifikasi dengan skor disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1.Skor gejala busuk buah kakao

Skor	Gejala Penyakit
0	Tidak ada gejala
1	Luas gejala bercak 1%-19%
2	Luas gejala bercak 20%-39%
3	Luas gejala bercak 40%-59%
4	Luas gejala bercak 60%-79%
5	Luas gejala bercak 80%-100%

Data keparahan penyakit busuk buah kakao selanjutnya dihitung dalam total luas area yang ada di bawah kurva perkembangan penyakit (AUDPC adalah *Area Under the Disease Progress Curve*) (Louws *et al.*, 1996), dengan menggunakan rumus:

$$AUDPC = \sum_i^{n-1} \left[\frac{y_i + y_{i+1}}{2} \right] (t_{i+1} - t_i)$$

Keterangan :

Y_{i+1} : Data pengamatan ke $i+1$
 t_{i+1} : Waktu pengamatan ke $i+1$
 Y_i : Data pengamatan ke-1
 t_i : Waktu pengamatan ke-1

Selanjutnya nilai AUDPC digunakan untuk menghitung persentase penghambatan penyakit busuk buah kakao akibat pengaplikasian kitosan, metalaksil maupun tanpa perlakuan apapun. Persentase penghambatan dihitung berdasarkan rumus (Hersanti, 2004) sebagai berikut :

$$P = \left(1 - \frac{AUDPC_{perlakuan}}{AUDPC_{kontrol}} \right) \times 100\%$$

Selanjutnya setelah diperoleh gejala busuk buah kakao pada permukaan buah seluruh unit percobaan kakao kontrol maka penelitian dihentikan. Seluruh buah kakao yang menjadi unit percobaan dipetik dan dibelah serta dikeluarkan bijinya. Biji basah ditimbang dan kemudian dikeringkan, dan setelah kering biji ditimbang lagi untuk mengetahui bobot produksi. Data diolah menggunakan sidik ragam dan selanjutnya nilai tengah antar perlakuan diuji dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) dengan tingkat kepercayaan 5%.