

III. METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Penyakit Tumbuhan Jurusan Proteksi Tanaman Fakultas Pertanian Universitas Lampung dari Juli sampai dengan Desember 2011. Pengambilan sampel tanah untuk isolasi *Trichoderma* dilakukan di Kabupaten Lampung Timur, Pringsewu, dan Tanggamus, sedangkan sampel buah kakao sakit sebagai sumber isolat *Phytophthora* diambil dari perkebunan kakao milik petani di Desa Bauh Gunung Sari Kecamatan Sekampung Udik, Kabupaten Lampung Timur.

3.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian antara lain cawan petri, mikroskop majemuk, *haemocytometer*, *laminar air flow hood*, oven, erlenmeyer, *rotamixer*, tabung reaksi, gelas ukur, pipet mikro, bunsen, alat potong, pinset, autoclave, *aluminium foil*, alat penghitung, plastik tahan panas, kaca preparat, kaca penutup, bor gabus, jarum ose, jarum ent, tabung reaksi, selotip, *sprayer*, plastik, karet gelang, penggaris dan alat tulis.

Bahan –bahan yang digunakan antara lain tujuh isolat *Trichoderma* spp., biakan *P. palmivora*, buah kakao sehat dan sakit, alkohol 70%, NaOCl 1%, media PDA (*Potato Dextrose Agar*), kertas tisu, dan aquades.

3.3 Rancangan Percobaan

Penelitian dilakukan dalam dua tahap percobaan, yaitu: percobaan pertama adalah uji penghambatan tujuh isolat *Trichoderma* spp. terhadap *P. palmivora* penyebab penyakit BBK secara *in vitro*. Percobaan kedua adalah uji penghambatan tujuh isolat *Trichoderma* spp. terhadap perkembangan gejala penyakit busuk pada buah kakao akibat *P. palmivora* di laboratorium.

Perlakuan pada masing-masing percobaan disusun dalam rancangan acak lengkap (RAL) dengan lima ulangan pada uji *in vitro* dan tiga ulangan pada uji penghambatan gejala pada buah di laboratorium. Perlakuan pada uji penghambatan secara *in vitro* terdiri atas tujuh isolat *Trichoderma* spp. Tiga isolat *Trichoderma* berasal dari koleksi Laboratorium Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung, 1 isolat berasal dari Laboratorium Balintanbun Tegineneng, 1 isolat berasal dari Kabupaten Tanggamus, 1 isolat berasal dari Kabupaten Lampung Timur, 1 isolat berasal dari Kabupaten Pringsewu. Pada uji penghambatan gejala pada buah kakao, perlakuan yang digunakan sama dengan uji penghambatan secara *in vitro* ditambah kontrol (aquades steril) (K). Data hasil pengamatan dianalisis menggunakan sidik ragam dan perbedaan nilai tengah antarperlakuan diuji dengan uji Jarak Berganda Duncan pada taraf nyata 5%.

3.4 Pelaksanaan Percobaan

3.4.1 Penyiapan *P. palmivora*

P. palmivora diisolasi secara langsung dari buah kakao yang menunjukkan gejala busuk, yang berasal dari kebun petani di Desa Bauh Gunun Sari Kecamatan Sekampung Udik, Kabupaten Lampung Timur. Jaringan kulit buah yang menunjukkan gejala dipotong pada bagian perbatasan antara bagian yang sakit dan yang sehat (± 5 mm), kemudian potongan direndam dalam larutan alkohol 70% selama 2 menit, selanjutnya direndam dalam larutan NaOCl 1% selama 2 menit, dan dibilas dengan aquades steril sebanyak tiga kali. Selanjutnya potongan kulit buah tersebut ditanam dalam cawan petri yang berisi media PDA dan diinkubasi dalam suhu ruang selama 4 hari. Jamur yang tumbuh kemudian dimurnikan dan diidentifikasi berdasarkan ciri-ciri morfologinya (Erwin dan Ribeiro, 1996).

3.4.2 Penyiapan Biakan *Trichoderma* spp.

Empat isolat *Trichoderma* spp. yang digunakan yaitu tiga isolat berasal dari koleksi Laboratorium Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Lampung yaitu *T. viride*, *T. harzianum* dan *T. koningii*, dan 1 isolat berasal dari laboratorium Balai Tanaman Perkebunan Tegineneng ditumbuhkan dan diperbanyak dalam cawan petri yang berisi media PDA dan diinkubasi selama 4 hari pada suhu ruang. Kegiatan ini dilakukan untuk meremajakan dan memperbanyak inokulum yang digunakan dalam percobaan.

Tiga isolat *Trichoderma* yang lain diisolasi secara langsung dari tanah dengan cara pengenceran. Tanah yang digunakan adalah tanah yang terdapat dibawah pohon kakao yang bergejala busuk buah.

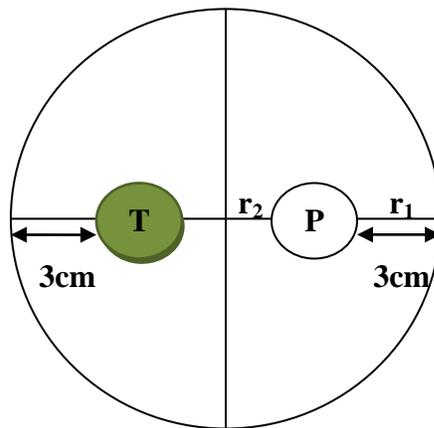
Sampel tanah dari lapang diencerkan terlebih dahulu, yaitu 1 gr tanah dimasukkan kedalam tabung reaksi berisi 9 ml aquades steril lalu dikocok menggunakan *rotamixer* selama ± 1 menit selanjutnya didiamkan selama 15 menit. Kemudian suspensi tanah dari pengenceran pertama tersebut diambil 1 ml dan dimasukkan dalam tabung reaksi lain yang berisi 9 ml aquades steril dan dikocok kembali selama ± 1 menit sehingga diperoleh pengenceran 10^{-2} . Kegiatan ini dilakukan sampai diperoleh pengenceran 10^{-6} . Selanjutnya suspensi hasil pengenceran yang terakhir diambil 0,5 ml lalu dituang dalam cawan petri berisi media PDA yang telah diberi Rose Bengal. Suspensi tanah diratakan pada seluruh permukaan media cawan menggunakan gelas penyebar (*dryglasky glass*) dan diinkubasi dalam suhu ruang selama ± 4 hari. Jamur *Trichoderma* yang tumbuh diidentifikasi berdasarkan buku Cook & Baker (1983), selanjutnya biakan *Trichoderma* murni diperbanyak dalam cawan petri berisi media PDA yang selanjutnya akan digunakan dalam percobaan.

1.4.3 Uji Penghambatan *Trichoderma* spp.

3.4.3.1 Uji penghambatan tujuh isolat *Trichoderma* spp. terhadap *P. palmivora* penyebab penyakit busuk buah kakao secara *in vitro*

Uji penghambatan *Trichoderma* spp. terhadap *P. palmivora* dilakukan dengan metode kultur ganda (Mahadtanapuk *et al.*, 2007). Pada permukaan luar cawan berdiameter 9 cm ditentukan dua titik yang berlawananan masing-masing dengan jarak 3 cm dari

tepi cawan petri. Titik-titik tersebut digunakan sebagai tempat infestasi jamur *Trichoderma* spp. dan *P. palmivora* (Gambar 1). Potongan biakan *Trichoderma* spp. dan *P. palmivora* yang masing-masing berumur 3 hari dengan ukuran diameter ± 5 mm diinfestasikan pada titik-titik yang telah ditentukan, kemudian diinkubasi dalam suhu ruang selama 3-4 hari.

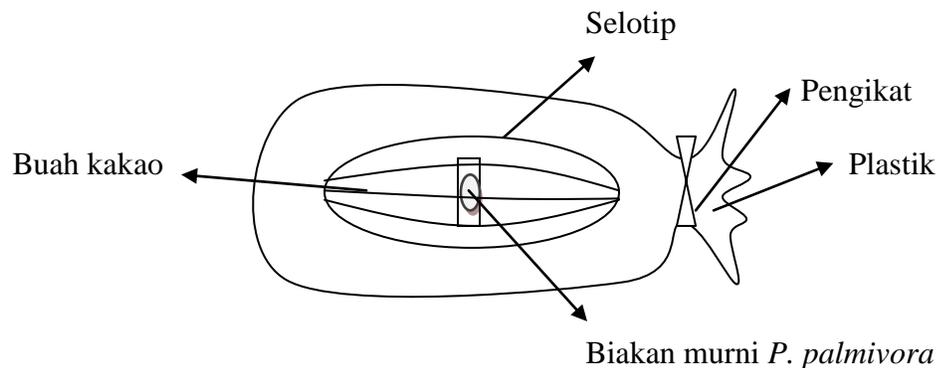


Gambar 1. Letak jamur *Trichoderma* spp. dan *P. palmivora* pada uji penghambatan secara *in vitro*. P = biakan *P. palmivora*, T = biakan *Trichoderma* spp., r_1 = jari-jari koloni *P. palmivora* yang berlawanan arah dengan jamur *Trichoderma* spp., r_2 = jari-jari koloni *P. palmivora* yang menuju ke arah jamur *Trichoderma* spp.

3.4.3.2 Uji penghambatan tujuh isolat *Trichoderma* spp. terhadap perkembangan gejala penyakit busuk pada buah kakao *P. palmivora* di laboratorium

Suspensi *Trichoderma* yang digunakan dalam uji penghambatan ini disiapkan dengan cara sebagai berikut: spora jamur *Trichoderma* spp. dipanen dari biakan berumur 7 hari dengan cara menambahkan 10 ml aquades steril ke dalam cawan lalu biakan *Trichoderma* spp. dikeruk dengan sendok steril dan disuspensikan. Suspensi *Trichoderma* spp. selanjutnya diencerkan untuk memperoleh kerapatan spora 10^6 spora/ml.

Metode pengujian penghambatan *Trichoderma* spp. terhadap gejala serangan *P. palmivora* pada buah kakao yang digunakan mengacu pada metode yang pernah dilakukan oleh Radix dan Aeny (2007). Pada uji penghambatan perkembangan gejala buah kakao sehat dengan lebar lingkaran tangan buah ± 25 cm yang diambil dari lapangan terlebih dahulu dicuci dibawah air mengalir kemudian didesinfeksi menggunakan alkohol 70% dengan cara menyemprotkan alkohol ke seluruh permukaan buah kemudian didiamkan selama ± 2 menit. Selanjutnya biakan murni *P. palmivora* dengan ukuran diameter bor gabus (5 mm) diletakkan secara terbalik pada bagian tengah buah kakao tersebut dan ditutup dengan selotip (Gambar 2). Buah kakao yang telah diperlakukan kemudian dibungkus dengan plastik selama 24 jam untuk menjaga kelembabannya dan diinkubasi dalam suhu ruang. Setelah buah kakao yang diberi perlakuan menunjukkan gejala busuk di semprot dengan suspensi *Trichoderma* spp. secara merata pada permukaannya.



Gambar 2. Cara pengujian penghambatan *Trichoderma* spp. terhadap gejala busuk buah akibat *P. palmivora* pada buah kakao

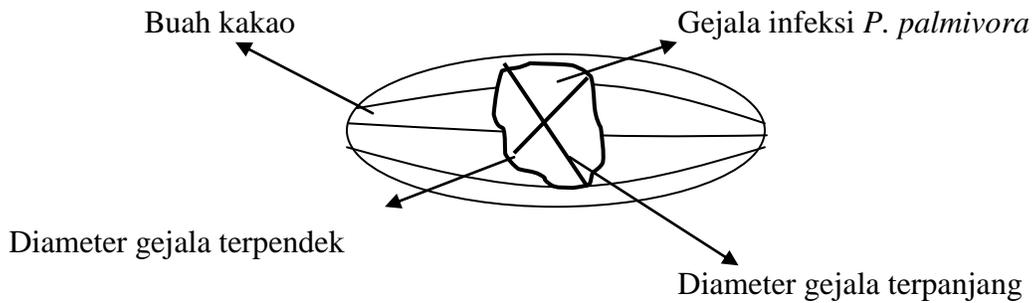
3.5 Pengamatan

Pengamatan pada percobaan pertama (Uji penghambatan tujuh isolat *Trichoderma* spp. terhadap *P. palmivora* penyebab penyakit BBK secara *in vitro*) dilakukan setiap hari dan pengamatan dihentikan ketika koloni kedua jamur dalam cawan telah bertemu. Pada setiap pengamatan diukur jari-jari koloni jamur *P. palmivora* baik yang berlawanan maupun yang menuju ke arah jamur *Trichoderma* spp. Data yang diperoleh selanjutnya digunakan untuk menghitung persentase penghambatan (restriksi disingkat dengan R) *Trichoderma* spp. terhadap *P. palmivora* dengan rumus sebagai berikut (Mahadnanapuk *et al.*, 2007):

$$\text{Presentase penghambatan} = \frac{r_1 - r_2}{r_1} \times 100\%$$

Dimana r_1 merupakan jari-jari koloni *P. palmivora* yang menjauh dari jamur *Trichoderma* spp., sedangkan r_2 merupakan jari-jari koloni *P. palmivora* yang menuju ke arah jamur *Trichoderma* spp.

Pengamatan pada percobaan kedua (uji penghambatan tujuh isolat *Trichoderma* spp. terhadap perkembangan gejala penyakit busuk pada buah kakao akibat *P. palmivora* di laboratorium) dilakukan setiap hari terhadap diameter gejala penyakit busuk buah yang terjadi. Pengamatan dihentikan ketika gejala pada kontrol telah penuh dalam satu sisi buah. Untuk mewakili sampel dari gejala perkembangan busuk pada buah kakao, maka pengukuran diameter dilakukan dua kali pada diameter gejala busuk yang terpanjang dan yang terpendek (Gambar 3). Selanjutnya dari rata-rata diameter tersebut, dihitung nilai jari-jari (r) gejala pada buah.



Gambar 3. Cara pengukuran diameter gejala serangan *P. palmivora*

Data yang diperoleh selanjutnya digunakan untuk menghitung persentase penghambatan ataupun stimulasi *Trichoderma* spp. terhadap *P. palmivora*.

Persentase stimulasi ditentukan apabila r_1 (jari-jari gejala akibat *P. palmivora* tanpa *Trichoderma* atau kontrol) lebih besar dari r_2 (jari-jari gejala akibat *P. palmivora* pada perlakuan). Sebaliknya, apabila r_2 lebih besar dari r_1 maka yang dihitung atau ditentukan adalah persentase penghambatan. Dari hasil penghitungan ini dapat diketahui apakah mempunyai efek menghambat perkembangan gejala (R) ataukah merangsang perkembangan gejala (S). Persentase penghambatan ditentukan dengan rumus sebagai berikut (Mahadnanapuk *et al.*, 2007):

$$\text{Persentase penghambatan} = \frac{r_1 - r_2}{r_1} \times 100\%$$

Dimana r_1 merupakan jari-jari gejala akibat *P. palmivora* tanpa *Trichoderma* atau kontrol, sedangkan r_2 merupakan jari-jari gejala akibat *P. palmivora* pada perlakuan

Persentase stimulasi (stimulasi atau disingkat S) perkembangan gejala BBK oleh *Trichoderma* spp terhadap *P. palmivora* dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut (Enikuomehin *et al.*, 2002):

$$\text{Persentase stimulasi} = \frac{r_2 - r_1}{r_2} \times 100\%$$

Dimana r_1 merupakan jari-jari gejala akibat *P. palmivora* tanpa *Trichoderma* atau kontrol, sedangkan r_2 merupakan jari-jari gejala akibat *P. palmivora* pada perlakuan.