

III. METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat

Penelitian dilaksanakan pada bulan Juli sampai September 2011 di Laboratorium Penyakit Tumbuhan Jurusan Proteksi Tanaman Fakultas Pertanian Universitas Lampung.

3.2. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain cawan petri, tabung reaksi, erlenmeyer, mikroskop, gelas ukur, bor gabus, otoklaf, timbangan elektrik, nampan plastik, aluminium foil, plastik tahan panas, *laminar air flow hood*, pinset, pipetmikro 1000 µl, *cutter*, kaca preparat, *cover glass*, spidol permanen, tabung reaksi, gelas penyebar driglaski, lampu spirtus, jarus oze, kertas tisu, kertas label, karet, kertas saring steril, *rotamixer*.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain isolat *Phytophthora palmivora*, *Trichoderma viride*, *Pseudomonas fluorescens*, alkohol 70%, NaOCl 0,5%, aquades steril, spirtus, media kultur jamur (V8 dan PDA), serta media King's B.

3.3. Rancangan Percobaan

Percobaan disusun secara faktorial dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan lima ulangan. Faktor pertama adalah penggunaan agens pengendali yaitu isolat *T. viride*, suspensi *P. fluorescens* dengan pengenceran 10^{-6} per ml air, kontrol air, dan kontrol metalakasil dengan konsentrasi 1%. Faktor kedua meliputi penggunaan media tumbuh berupa PDA, V8 dan King's B. Data yang diperoleh merupakan ukuran jari-jari koloni jamur *P. palmivora* yang menjauhi dan mendekati perlakuan kemudian dihitung persentase penghambatan pertumbuhan jamur *P. palmivora*. Persentase penghambatan tersebut diolah dengan sidik ragam (ANOVA) dan dianalisis menggunakan uji beda nyata terkecil (BNT) pada taraf 5%.

3.4. Pelaksanaan Penelitian

3.4.1. Penyiapan Media PDA, V8 dan King's B

a. Media PDA (*Potato Dextrose Agar*)

Untuk membuat media PDA sebanyak 1 liter, dibutuhkan 20 gram agar batang yang telah dipotong-potong, 20 gram *dextrosa*, dan 200 gram kentang. Kentang dipotong kecil – kecil lalu direbus di dalam 1 liter air sambil diaduk, setelah itu rebusan bahan – bahan disaring dengan saringan ke dalam tabung erlenmeyer ukuran 1 liter. Selanjutnya tabung erlenmeyer berisikan PDA tersebut disterilkan dengan otoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm selama ± 120 menit.

b. Media V8 (*Vegetable Eight*)

Untuk membuat media V8 sebanyak 1 liter, dibutuhkan suspensi sari sayuran V8 sebanyak 200 ml, yang disaring menggunakan saringan kasa sebanyak 3 kali penyaringan. Selanjutnya suspensi sari sayuran V8 tersebut dimasukkan ke dalam tabung erlenmeyer ukuran 1 liter dan ditambahkan 800 ml air steril, 15 gram agar batangan yang telah dipotong-potong, dan 3 gram CaCO_3 , lalu diaduk sehingga menjadi homogen dan direbus. Setelah direbus, tabung erlenmeyer disterilkan dengan otoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm selama ± 120 menit.

c. Media King's B

Untuk membuat media King's B dibutuhkan 20 gr *protease peptone*, 10 ml *glyserol*, 1,5 gr K_2HPO_4 , 1,5 gr $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dan 15 gr agar. Bahan tersebut dimasukkan ke dalam erlenmeyer ukuran 1 liter dan ditambahkan 1000 ml air steril, lalu diaduk sehingga menjadi homogen dan direbus. Setelah direbus, tabung erlenmeyer disterilkan dengan otoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm selama ± 120 menit. Setelah proses sterilisasi selesai, media King's B didinginkan hingga 50°C , lalu dituang ke dalam cawan petri.

3.4.2. Penyiapan biakan murni *P. palmivora* sebagai sumber inokulum

Isolat jamur *P. palmivora* diisolasi dari jaringan buah kakao yang sakit di lapang. Buah pada tanaman kakao sakit pada umumnya bagian kulit buah berbercak berwarna coklat. Metode isolasi jamur *P. palmivora* yaitu dengan membuat beberapa potongan segi empat ukuran 5 sampai 10 mm yang dipotong dari jaringan buah kakao sakit berikut jaringan disebelahnya yang masih menunjukkan

jaringan sehat. Potongan jaringan tersebut didesinfeksi dengan cara direndam dalam larutan NaOCl 0,525% selama 30 sampai 60 detik lalu dibilas dengan aquades steril dalam tiga air steril yang berbeda dan ditiriskan menggunakan tisu di *laminar air flow*. Potongan kakao tersebut ditanam pada media PDA dan diinkubasikan selama \pm 3 hari. Jamur *P. palmivora* yang tumbuh pada media PDA tersebut selanjutnya dimurnikan pada media V8 dan diremajakan lagi menggunakan media V8 yang baru untuk pengujian lebih lanjut.

3.4.3. Perbanyak biakan *T. viride*

Isolat *T. viride* diperoleh dari koleksi Klinik Tanaman Jurusan Proteksi Tanaman Fakultas Pertanian Universitas Lampung dan diperbanyak pada cawan petri menggunakan media PDA.

3.4.4. Perbanyak biakan *P. fluorescens*

Isolat *P. fluorescens* berasal dari koleksi Balai Penelitian Gading Rejo yang diperoleh dari tanah sekitar tanaman pisang milik Balai Penelitian Solok, Sumatera Barat. Isolat *P. fluorescens* tersebut diperbanyak menggunakan media King's B dengan metode penggosan.

3.4.5. Uji antagonisme *Trichoderma viride* dan *Pseudomonas fluorescens* terhadap *Phytophthora palmivora* pada 3 macam media yang berbeda

Uji antagonisme dilakukan dengan metode kultur ganda yaitu pada satu cawan petri ditumbuhkan dua patogen secara berlawanan. Pengujian antagonisme ini dilakukan pada 3 macam media yang berbeda yaitu PDA, V8 dan King's B.

Cawan petri yang telah berisi media padat dibalik dan pada bagian belakangnya dibuat garis saling berpotongan pada tengah cawan petri menggunakan spidol permanen. Kemudian pada garis tersebut ditentukan dua titik yang berjarak 3 cm dari tepi cawan secara berlawanan. Titik-titik tersebut digunakan sebagai tempat infestasi *P. palmivora* dan agens pengendali.

a. Uji antagonisme *T. viride* dan *P. palmivora*

Uji antagonisme ini dilakukan dengan menggunakan biakan isolat *T. viride* dan biakan murni isolat *P. palmivora* yang masing-masing berumur 3 hari. Masing-masing isolat jamur diambil dengan menggunakan bor gabus dan diinfestasikan pada titik-titik yang telah ditentukan pada cawan petri.

b. Uji antagonisme *P. fluorescens* dan *P. palmivora*

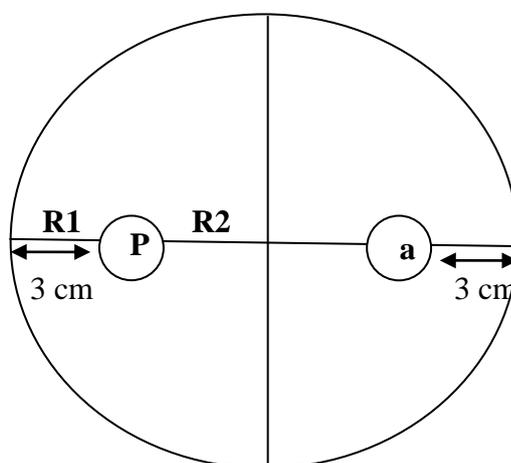
Uji antagonisme dengan menggunakan biakan isolat *P. fluorescens* terlebih dahulu dibuat suspensi. Koloni bakteri *P. fluorescens* yang berumur 3 hari ditambahkan air steril 10 ml ke dalam cawan petri. Suspensi tersebut dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan dihomogenkan menggunakan *rotamixer*. Kemudian diambil 1 ml dari 10 ml suspensi *P. fluorescens* dan dicampurkan pada tabung reaksi lain yang telah berisi 9 ml air steril. Hal ini terus dilakukan sampai 6 kali sehingga didapatkan pengenceran *P. fluorescens* 10^{-6} per ml air. Selanjutnya, potongan kertas saring steril berbentuk cakram berdiameter 0,5 mm dicelupkan dalam suspensi *P. fluorescens* dan diinfestasikan pada cawan berisi media bersamaan dengan isolat *P. palmivora* pada titik yang telah ditentukan.

c. Uji antagonisme kontrol metalaksil dan *P. palmivora*

Untuk uji antagonisme kontrol metalaksil 1% terlebih dahulu dibuat suspensi.

Perlakuan kontrol metalaksil menggunakan konsentrasi 1% dengan cara sebanyak 0,01 ml fungisida metalaksil ditambahkan kedalam tabung reaksi yang berisi 9 ml air steril dan dihomogenkan menggunakan *rotamixer*. Selanjutnya, potongan kertas saring steril berbentuk cakram berdiameter 0,5 mm dicelupkan dalam suspensi metalaksil tersebut dan diinfestasikan pada cawan berisi media bersamaan dengan isolat *P. palmivora* pada titik yang telah ditentukan.

Untuk uji antagonisme menggunakan kontrol air dengan cara mencelupkan potongan kertas saring steril berbentuk cakram berdiameter 0,5 mm dalam air steril dan diinfestasikan pada cawan berisi media bersamaan dengan isolat *P. palmivora* pada titik yang telah ditentukan.



Gambar 5. Skema letak jamur *P. palmivora* dan agens pengendali pada uji antagonisme dalam cawan petri.

Keterangan : P = biakan *P.palmivora*; a= pengujian berupa *T.viride*, *P.fluorescens*, kontrol berupa air dan fungisida metalaksil 1%

3.5. Pengamatan

Pengamatan dilakukan setiap hari setelah inokulasi untuk mengukur jari-jari koloni *P. palmivora* yang terpanjang dan yang terpendek/mendekati perlakuan berupa *T. viride*, *P. fluorescens*, kontrol air serta kontrol metalaksil. Pengukuran jari-jari dimaksudkan untuk mengetahui pertumbuhan jamur *P. palmivora* pada hasil infestasi yang telah dilakukan, sehingga diketahui kemampuan *T. viride* dan *P. fluorescens* dalam menghambat pertumbuhan *P. palmivora* secara *in vitro*. Pengamatan dihentikan apabila koloni jamur *P. palmivora* pada kontrol air sudah mengenai tepi cawan petri.

Data yang diperoleh berupa jari-jari koloni *P. palmivora* kemudian dihitung persentase penghambatan menggunakan rumus (Mahadnanapuk dkk., 2007) :

$$PR = \frac{R1 - R2}{R1} \times 100\%$$

Keterangan :

PR = Persen penghambatan pertumbuhan jamur.

R1 = Jari-jari koloni *P. palmivora* terpanjang/menjauhi perlakuan berupa *T. viride*, *P. fluorescens*, kontrol air serta kontrol metalaksil.

R2 = Jari-jari koloni *P. palmivora* terpendek/mendekati perlakuan berupa *T. viride*, *P. fluorescens*, kontrol air serta kontrol metalaksil.