

III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian dilaksanakan pada Oktober 2011 sampai Maret 2012 di Rumah Kaca dan di Laboratorium Penyakit Tumbuhan Jurusan Proteksi Tanaman Fakultas Pertanian Universitas Lampung.

3.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu labu erlenmeyer, spatula, cawan petri, gelas ukur, tabung reaksi, nampan plastik, aluminium foil, plastik penutup, plastik tahan panas, jarum ose, jarum ent, pisau cutter, gunting kecil, spidol permanen, autoklaf, pot plastik, kapas, tisu, *laminar air flow*, lampu bunsen, pinset, gelas beker, pipet tetes, kertas label, mikroskop kompon, mikroskop stereo, gelas preparat, gelas penutup, dan solatif

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu *T. harzianum*, *P. capsici*, alkohol 70%, aquades steril, media kultur *potato dextrose agar* (PDA), media menir beras dan spiritus.

3.3 Rancangan Percobaan dan Analisis Data

Percobaan dilaksanakan dalam rancangan acak lengkap (RAL) dengan lima perlakuan dan enam ulangan. Setiap satuan percobaan terdiri atas tiga bibit lada.

Perlakuan dalam penelitian ini adalah empat isolat *T. harzianum* terbaik hasil dari penelitian sebelumnya (Febriansyah, 2011) dan satu kontrol yaitu tanaman lada yang tidak diberi perlakuan *T. harzianum*. Data hasil pengamatan dianalisis menggunakan sidik ragam dan perbedaan nilai tengah antar perlakuan diuji dengan uji jarak berganda Duncan (DMRT) pada α 0,05.

3.4 Pelaksanaan

3.4.1 Penyiapan tanaman lada

Bibit tanaman lada varietas belantung diambil dari Kebun Percobaan Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Industri (BALITRI) di Cahaya Negeri, Lampung Utara. Bibit lada yang masih dalam polibag selanjutnya dipindahkan dalam pot berdiameter 25 cm. Media tanam yang digunakan terdiri atas campuran tanah dan pasir dengan perbandingan 2:1. Sebelum digunakan, media tanam terlebih dahulu diautoklaf selama dua hari berturut turut. Setelah itu dimasukkan ke dalam pot kira-kira 3 - 4 kg/pot. Masing-masing pot ditanami tiga bibit lada dengan total pot sebanyak 30 pot.

3.4.2 Penyiapan biakan *P. capsici*

Biakan *P. capsici* diperoleh dari hasil isolasi dari daun yang menunjukkan gejala. Isolasi dilakukan dengan cara memotong jaringan tanaman di antara yang sakit dan sehat dengan ukuran kira-kira 2 x 2 mm. Potongan tersebut selanjutnya direndam dalam larutan NaOCl 0,525 % selama 1 - 2 menit dan setelah itu dibilas menggunakan aquades steril. Potongan-potongan daun tersebut dipindahkan ke

kertas tisu untuk menyerap kelebihan air. Potongan jaringan tanaman tersebut diletakkan ke dalam satu cawan petri yang telah berisi media PDA. Setelah kurang lebih 3 hari, biakan diamati ada atau tidak pertumbuhan jamur. Jika terbentuk koloni pada biakan, maka miselia jamur dipindahkan ke media PDA yang baru dengan cara memotong bagian koloni paling ujung dan direisolasi.

3.4.3 Penyiapan biakan *T. harzianum*

Biakan *T. harzianum* yang digunakan sebanyak empat isolat dari percobaan sebelumnya oleh Febriansyah (2011). Empat isolat *T. harzianum* terlebih dahulu diremajakan dan diperbanyak dengan menggunakan media PDA. Media menir beras sebelum digunakan, terlebih dahulu dicuci, dikukus hingga setengah matang. Media menir beras yang setengah matang kemudian dimasukkan ke dalam kantong-kantong plastik kecil dan diautoklaf selanjutnya disimpan semalam. Hari berikutnya dilakukan inokulasi cuplikan miselium *T. harzianum* pada masing-masing kantong tersebut sebanyak tiga cuplikan perkantong. Selanjutnya plastik diikat dan diinkubasi. Setiap dua hari dilakukan perataan pertumbuhan *T. harzianum* pada media menir tersebut dengan cara memecah gumpalan koloni *T. harzianum* pada media menir dengan menggunakan tangan. Inkubasi dilakukan selama 11 hari.

3.4.4 Aplikasi *T. harzianum*

Aplikasi *T. harzianum* dilakukan dengan cara meletakkan *T. harzianum* hasil perbanyak pada media menir pada lubang-lubang disekitar bibit lada. Umur

biakan *T. harzianum* yang digunakan adalah 11 hari setelah inkubasi. Setiap pot terdiri atas empat lubang dengan kedalaman 3 – 4 cm. Setiap pot diaplikasikan 5 gram biakan *T. harzianum* pada menir.

3.4.5 Inokulasi *P. capsici*

Lima belas hari setelah aplikasi *Trichoderma* dilakukan inokulasi *P. capsici* pada daun. Inokulasi dilakukan dengan menempelkan cuplikan misellium *P. capsici* diameter 5 mm dari biakan yang berumur 7 hari setelah inkubasi pada permukaan bawah daun. Untuk membantu proses infeksi pada cuplikan miselium tersebut diberi kapas yang telah dibasahi, dan kemudian disolatif sampai tepi daun agar cuplikan tidak jatuh. Inokulasi pada batang dilakukan 1 minggu setelah inokulasi pada daun. Pada prinsipnya inokulasi pada batang ini sama dengan inokulasi pada daun, bedanya adalah titik inokulasi dilukai sebelum ditempel dengan cuplikan miselium *P. capsici*. Pelukaan dilakukan dengan menggores batang lada dua luka perbatang dengan panjang $\pm 0,5$ cm, kedalamannya $\pm 0,1$ cm. Titik inokulasi pada batang berjarak ± 5 cm dari permukaan media tanam.

3.4.6 Pengamatan dan pengumpulan data

Pengamatan hasil inokulasi pada daun dan batang dilakukan setiap hari selama 6 hari. Pada inokulasi daun peubah yang diamati adalah diameter bercak yang terbentuk. Pengukuran diameter bercak dilakukan secara vertical dan horizontal. Inokulasi pada batang peubah yang diamati adalah keparahan penyakit. Keparahan penyakit dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut (Sudarsono dan Ginting, 2003):

$$Kpa = \frac{\sum(n \times v)}{N \times V} \times 100\%$$

Keterangan :

- Kpa : Keparahan penyakit
n : Jumlah lingkaran pangkal batang yang mengalami gejala untuk tiap skor
v : Skor gejala serangan
N : Jumlah sampel yang diamati
V : Skor tertinggi

Skor penyakit yang digunakan untuk menghitung keparahan penyakit adalah sebagai berikut (Sudarsono dan Ginting, 2003):

Tabel 2. Skor penyakit yang digunakan untuk mengukur keparahan penyakit.

No	Skor Penyakit (x)	Keterangan
1	0	Tidak ada gejala
2	1	Timbul nekrosis sepanjang 0,5 cm atau kurang
3	2	$0,5 < x \leq 1$ cm, nekrosis tidak melingkari batang
4	3	$x > 1$ cm, nekrosis tidak melingkari batang
5	4	Nekrosis melingkari batang
6	5	Tanaman layu atau mati