

### **III. BAHAN DAN METODE**

#### **A. Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan di kebun PT NTF (Nusantara Tropical Farm) Way Jepara, Lampung Timur dan Laboratorium Penyakit Tumbuhan, Bidang Proteksi Tanaman UNILA dari November 2012 sampai Juni 2013.

#### **B. Alat dan Bahan**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain cawan petri, tabung reaksi, labu erlenmeyer, mikroskop, gelas ukur, bor gabus, jarum ose, nampan plastik, *aluminium foil*, plastik penutup, plastik tahan panas, *cutter*, gelas preparat, gelas penutup, dan spidol permanen. Bahan yang digunakan antara lain ialah bahan tanaman (tanaman pisang Cavendish klon CJ30, umur 2 minggu dan dua bulan yang diproduksi oleh PT NTF), biakan *Fusarium oxysporum* f.sp. ras 4 (TR4), sampel tanah, bahan organik (kulit singkong, jerami padi, kompos), alkohol 70% dan 90%, media kultur jamur (PDA-L dan PDA-RSC).

#### **C. Metode Penelitian**

Penelitian ini dilakukan dalam dua tahap, yaitu tahap pertama skrining *Trichoderma* spp. dan tahap kedua uji efikasi *Trichoderma* spp. terhadap penekanan perkembangan penyakit layu fusarium. Skrining *Trichoderma* spp.

dilakukan terhadap tanah di sekitar rizosfer tanaman pisang sehat yaitu sebanyak lima tanaman. Uji efikasi *Trichoderma* spp. terhadap penekanan perkembangan penyakit layu fusarium disusun dalam rancangan acak kelompok lengkap dengan 12 perlakuan dan empat ulangan, setiap ulangan terdiri atas 10 tanaman.

Perlakuan:

- (1)  $F_0T_0O_0$  = bibit pisang tanpa inokulasi Foc dan *Trichoderma*
- (2)  $FT_0O_0$  = bibit pisang diinokulasi Foc, tanpa *Trichoderma*, tanpa bahan organik
- (3)  $FT_1O_0$  = bibit pisang diinokulasi Foc + *Trichoderma* di pembibitan
- (4)  $FT_0O_1$  = bibit pisang diinokulasi Foc + jerami padi
- (5)  $FT_0O_2$  = bibit pisang diinokulasi Foc + kulit singkong
- (6)  $FT_0O_3$  = bibit pisang diinokulasi Foc + kompos
- (7)  $FT_1O_1$  = bibit pisang diinokulasi *Trichoderma* di pembibitan + jerami padi + Foc
- (8)  $FT_1O_2$  = bibit pisang diinokulasi *Trichoderma* di pembibitan + kulit singkong + Foc
- (9)  $FT_1O_3$  = bibit pisang diinokulasi *Trichoderma* di pembibitan + kompos + Foc
- (10)  $FT_2O_1$  = bibit pisang diinokulasi *Trichoderma* di media tanah + jerami padi + Foc
- (11)  $FT_2O_2$  = bibit pisang diinokulasi *Trichoderma* di media tanah + kulit singkong + Foc
- (12)  $FT_2O_3$  = bibit pisang diinokulasi *Trichoderma* di media tanah + kompos + Foc

## D. Pelaksanaan Penelitian

### 1. Skrining *Trichoderma* spp.

#### a. Isolasi *Trichoderma* spp. dari Tanah Kebun Pisang

Tanah diambil dari rizosfer tanaman pisang yang tidak bergejala layu fusarium di sekeliling tanaman pisang yang bergejala layu fusarium di kebun pisang PT NTF Way Jepara, Lampung Timur. Pengambilan sampel tanah dilakukan pada tiga tanaman pisang, masing-masing diambil 1 kg tanah yaitu pada empat titik yang berjarak 20 cm dari bonggol tanaman pisang sebanyak 250 g tanah, lalu dimasukkan ke dalam plastik dan diaduk. Di laboratorium, *Trichoderma* spp. diisolasi dengan teknik pengenceran (*dilution plate technique*) menurut Johnson & Curl (1972).

Masing-masing sampel tanah diambil sebanyak 10 g tanah dan dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer, diaduk dengan 90 ml akuades steril selama 30 menit. Dengan menggunakan mikropipet, sebanyak 1 ml suspensi tanah tersebut dimasukkan ke dalam labu lain yang berisi 99 ml akuades steril untuk mendapatkan pengenceran  $10^{-3}$ . Dengan cara serupa dibuat suspensi sampai pengenceran  $10^{-5}$ . Dari kedua suspensi tersebut akan diambil 0,25 ml dengan mikropipet untuk dituang dan disebaratakan pada permukaan media PDA-R yang diberi rosebengal 40 ppm dalam cawan petri. Pengamatan dilakukan 3-5 hari setelah infestasi ke media. Isolat *Trichoderma* spp. yang ditemukan kemudian ditransfer ke media PDA-L dan dimurnikan dengan teknik ujung hifa (*hyphal tips*) (Agrios, 2005).

**b. Identifikasi *Trichoderma* spp.**

Hasil isolasi jamur yang berupa biakan murni diidentifikasi berdasarkan morfologi mikroskopisnya. Identifikasi sampai ke tingkat spesies dilakukan menurut Rifai (1969) dalam Domsch *et al.* (1993). Identifikasi dilakukan dengan memperhatikan bentuk miselium, konidiospor, filiad dan konidia dari *Trichoderma* spp. di bawah mikroskop.

**c. Penyiapan Biakan *F. oxysporum* f.sp. *cubense* (Foc)**

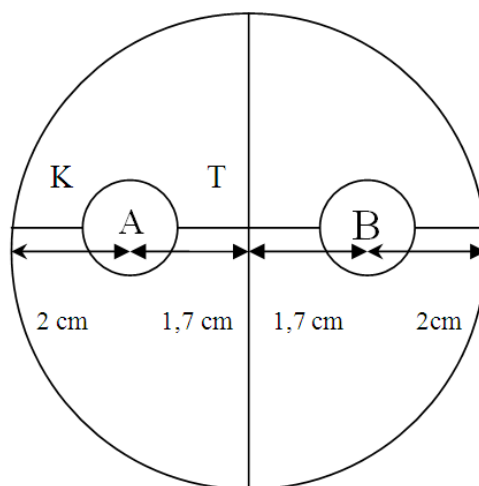
*F. oxysporum* diisolasi dari potongan bonggol dan batang tanaman pisang yang menunjukkan gejala layu fusarium di perkebunan PT NTF Way Jepara, Lampung Timur. Isolasi dilakukan dengan cara memotong jaringan tanaman di antara yang sakit dan sehat dengan ukuran kira-kira 0,5 x 0,5 cm atau lebih kecil, lalu potongan tersebut dicelupkan dalam larutan NaOCl 0,525 % selama 1-2 menit dan dibilas dengan aquades steril. Dengan menggunakan pinset yang sudah disterilkan, potongan-potongan tersebut ditiriskan dengan cara meletakkannya di atas kertas tisu steril. Potongan-potongan jaringan tanaman diletakkan ke dalam satu cawan petri yang telah berisi media PDA-L. Pengamatan dilakukan 3-5 hari setelah infestasi. Isolat Foc yang ditemukan kemudian ditransfer ke media PDA-L dan dimurnikan dengan teknik ujung hifa (*hyphal tips*) (Agrios, 2005).

Hasil isolasi Foc di media PDA-L kemudian dilakukan pengujian terhadap sifat patogeniknyanya, yaitu dengan melakukan langkah-langkah postulat Koch. Isolat Foc diisolasi lalu kemudian direinokulasikan pada tanaman pisang ambon kuning.

Setelah muncul gejala layu fusarium, patogen direisolasi dari jaringan tanaman sakit (Agrios, 2005).

#### d. Seleksi *Trichoderma* spp. melalui Uji Antagonisme

Biakan *Trichoderma* spp. yang diperoleh kemudian diseleksi berdasarkan uji daya antagonismenya terhadap Foc. Uji antagonisme dilakukan dengan metode kultur ganda yaitu pada satu cawan petri ditumbuhkan dua jamur secara berlawanan. Cawan petri dibalik dan pada bagian belakangnya dibuat garis yang saling berpotongan pada tengah cawan petri dengan menggunakan spidol permanen. Kemudian pada garis tersebut ditentukan dua titik yang berjarak 2 cm dari tepi cawan secara berlawanan. Titik-titik tersebut digunakan sebagai tempat infestasi cuplikan jamur yang berdiameter 0,8 cm (Gambar 1). *Trichoderma* spp. dan Foc yang masing-masing berumur 3 hari diinfestasikan pada titik-titik tersebut kemudian diletakkan pada nampan dan diinkubasi dalam suhu ruang.



Gambar 1. Tata letak jamur *Trichoderma* spp. dan Foc pada uji antagonisme dalam cawan petri

Keterangan : A = biakan Foc, B = biakan *Trichoderma* spp.

### e. Pengamatan

Pengamatan dilakukan setiap hari sampai koloni jamur memenuhi cawan petri. Peubah yang diamati dalam percobaan ini adalah persentase penghambatan pertumbuhan Foc oleh *Trichoderma* dengan cara mengukur jari-jari koloni Foc. Nilai penghambatan pertumbuhan dihitung dengan rumus :

$$P = \frac{K - T}{K} \times 100\%$$

Keterangan :

P = Persentase penghambatan Foc (%)

K = Jari-jari koloni Foc kontrol (arah berlawanan dengan koloni *Trichoderma* spp.)

T = Jari-jari koloni Foc hasil perlakuan (ke arah koloni *Trichoderma* spp.)

(Agrios, 2005).

## 2. Uji Efikasi *Trichoderma viride* terhadap Penekanan Perkembangan Penyakit Layu Fusarium

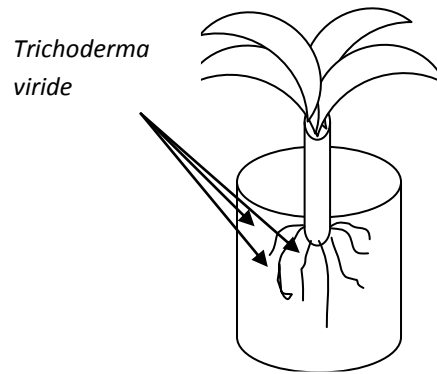
### a. Penyiapan Starter *Trichoderma viride*

Penyiapan biakan *T. viride* dilakukan di Laboratorium Penyakit Tumbuhan. Isolat *T. viride* yang digunakan adalah isolat yang paling efektif dalam menekan pertumbuhan Foc sesuai dengan hasil *screening* pada percobaan sebelumnya. Isolat berasal dari kultur murni pada media agar miring *potato dextrose agar* (PDA) dalam tabung reaksi, kemudian dilakukan peremajaan pada media PDA dalam cawan petri. Pembuatan starter *T. viride* dengan cara membiakkannya pada media menir beras. Menir beras dimasak setengah matang lalu dimasukkan ke

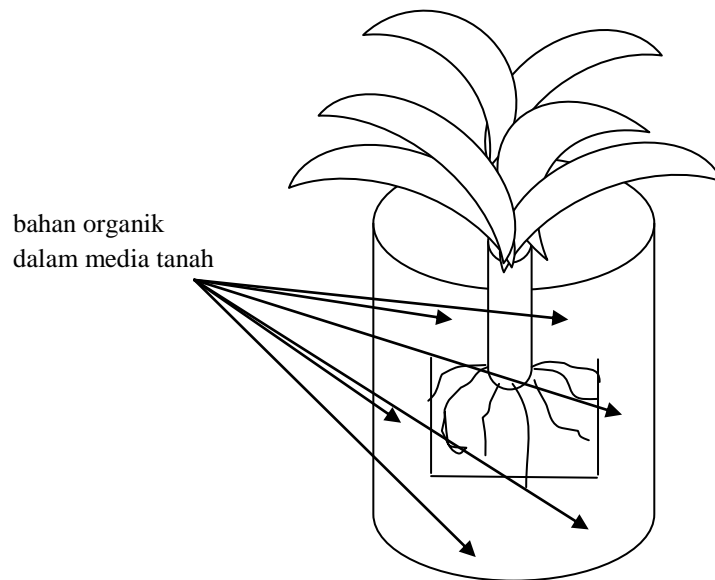
dalam plastik tahan panas lalu disterilkan dalam otoklaf selama 1 jam pada tekanan 1,5 atm dengan suhu 121 °C. Miselium *T. viride* yang berumur 4 hari dimasukkan ke dalam masing-masing media tersebut dengan menggunakan bor gabus dengan lima lubang, kemudian seluruh media diinkubasi selama 14 hari disertai dengan penghomogenan setelah tampak pertumbuhan jamur (Ivayani, 2010).

#### **b. Perbanyak dan Infestasi Campuran *Trichoderma viride* dengan Bahan Organik**

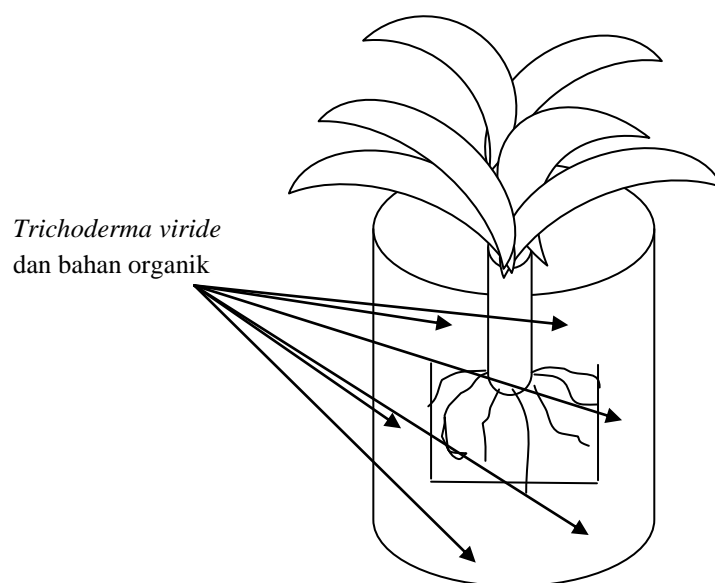
Bahan organik yang digunakan sebagai pencampuran *T. viride* adalah jerami padi, kulit singkong, dan kompos. Jerami padi dan kulit singkong dipotong-potong atau dicacah-cacah dan dilembabkan. Untuk inokulasi *Trichoderma* spp. di pembibitan (umur bibit dua minggu) sebanyak 10 g isolat *Trichoderma* spp. pada menir beras ( $1,73 \times 10^8$  spora/g) dicampurkan dengan media di pembibitan yaitu dengan cara diaduk rata di sekitar perakaran tanaman pisang (Gambar 2.). Setelah bibit pisang dipindahkan ke media tanah ditambahkan bahan organik sebanyak 100 g tanah (Gambar 3.). Media tanam di pembibitan berupa sekam, serbuk gergaji, pupuk kandang, dan *cocopeat* (sampah kelapa). Untuk perlakuan *Trichoderma* spp. di media tanah, dilakukan bersamaan dengan aplikasi bahan organik yaitu pada saat bibit berumur dua bulan dan dipindah ke media tanah, dicampurkan *Trichoderma* spp. sebanyak 10 g ( $1,69 \times 10^8$  spora/g) dan bahan organik sebanyak 100 g ke tanah (Gambar 4.)



Gambar 2. Aplikasi *Trichoderma viride* di pembibitan. Sebanyak 10 g preparasi *T. viride* diaplikasikan di rizosfer tanaman pisang yang berumur 2 minggu.



Gambar 3. Aplikasi bahan organik di media tanah. Sebanyak 100 g bahan organik diaplikasikan di rizosfer tanaman pisang yang berumur 2 bulan (bibit pisang berumur 2 bulan)



Gambar 4. Aplikasi *T. viride* dan bahan organik di media tanah. Sebanyak 10 g preparasi *T. viride* dan 100 g bahan organik diaplikasikan di rizosfer tanaman pisang yang berumur 2 bulan



**c. Perbanyak dan Infestasi *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (Foc)**

Isolat berasal dari kultur murni pada media agar miring *potato dextrose agar* (PDA) dalam tabung reaksi, kemudian dilakukan peremajaan pada media PDA dalam cawan petri. Foc diperbanyak dalam medium beras sebagai bahan inokulum untuk diinokulasikan pada bibit pisang. Inokulasi Foc dilakukan setelah tanaman yang berumur dua bulan dipindahkan ke media tanah yaitu dengan membuat empat lubang disekeliling tanaman sedalam 5 cm, dengan jarak 2 cm dari pangkal tanaman. Setelah itu, biakan Foc dalam media beras diinokulasikan ke dalam lubang tersebut sebanyak 10 g/tanaman, masing-masing 2,5 g/lubang dan ditimbun kembali dengan tanah (Nurbailis & Martinus, 2011).

**d. Persiapan Tanaman dan Media Tanam**

Percobaan kedua ini dikondisikan semilapang. Tanaman pisang ditanam di dalam polybag berukuran 10 kg dengan media tanam 10 kg tanah dan diberikan pupuk sesuai dengan teknik budidaya di PT NTF. Bibit pisang yang dipakai ialah bibit pisang Cavendish klon CJ30 yang berumur dua minggu dan dua bulan hasil kultur jaringan di PT NTF (NTF, 2012).

**e. Pengamatan**

Pengamatan dilakukan terhadap intensitas penyakit (keterjadian dan keparahan penyakit) layu fusarium, pertumbuhan bibit pisang (tinggi tanaman, jumlah daun, lingkaran batang), kepadatan propagul *Trichoderma* spp. dan *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* pada media tanam.

## **(1) Intensitas Penyakit**

### **(a) Keterjadian Penyakit Layu Fusarium Pada Tanaman Pisang**

Pengamatan keterjadian penyakit dilakukan berdasarkan masa inkubasinya yaitu munculnya gejala pertama setelah inokulasi Foc sampai tanaman berumur 16 minggu. Keterjadian penyakit (*Disease incidence*) pada daun dan bonggol dihitung menggunakan rumus:

$$\text{KtP} = \frac{n}{N} \times 100\%$$

Keterangan:

KtP = Keterjadian penyakit

n = Jumlah tanaman yang sakit/ bergejala sakit

N = Jumlah tanaman yang diamati

### **(b) Keparahan Penyakit Layu Fusarium Pada Tanaman Pisang**

Pengamatan dilakukan berdasarkan gejala pada daun dan bonggol pada akhir pengamatan yaitu dengan menggunakan skor penyakit. Kategori skor kerusakan pada daun dan bonggol berdasarkan skor kerusakan menurut Mak *et al.* (2008) dalam Soesanto (2009). Pengamatan dilakukan setiap satu minggu sekali selama 16 minggu setelah aplikasi untuk skoring kerusakan daun, sedangkan untuk bonggol dilakukan pada akhir pengamatan saja.

Tabel 1. Skor penyakit pada daun tanaman pisang

Skor	Keterangan (gejala)
1	Tidak ada infeksi (tanaman sehat)
2	Daun sedikit menguning (<50% jumlah daun)
3	Sebagian besar daun menguning (>50% jumlah daun)
4	Semua daun menguning
5	Tanaman mati

Tabel 2. Skor penyakit pada bonggol tanaman pisang

Skor	Keterangan (gejala)
1	Tidak ada bintik hitam pada jaringan bonggol
2	Ada beberapa bintik hitam pada bonggol
3	Ada bintik hitam menutupi <1/3 dari jaringan bonggol
4	Ada bintik hitam menutupi 1/3 – 2/3 dari jaringan bonggol
5	Ada bintik hitam menutupi >2/3 dari jaringan bonggol
6	Terdapat bintik hitam pada seluruh jaringan bonggol

Keparahan penyakit (*Disease severity*) pada daun dan bonggol dihitung menggunakan rumus:

$$KpP = \frac{\sum(\text{nilai kategori} \times \text{jumlah tanaman tiap kategori serangan})}{(\text{jumlah tanaman yang diamati} \times \text{skor tertinggi})} \times 100\%$$

## (2) Kepadatan Propagul *Trichoderma viride* dan Foc

Penghitungan kepadatan propagula dilakukan dengan metode pengenceran bertingkat. Media yang digunakan ialah media *potato dextrose agar rosebengal streptomycin* (PDA-RSC). Media PDA-RSC ini diperoleh dengan cara menambahkan 40 mg *rosebengal* pada 1 liter media PDA, kemudian media diotoklaf selama 1 jam pada tekanan 1,5 atm, kemudian media ditunggu sampai

suhu media turun menjadi  $\pm 48^{\circ}\text{C}$  lalu 60 mg *streptomycin* dan 60 mg *chloramfenicol* dimasukkan ke dalam media tersebut.

Pengamatan terhadap kepadatan propagul *Trichoderma viride*. dan Foc dilakukan pada 6 dan 12 minggu setelah inokulasi (msi). Pengamatan dilakukan pada seluruh 2 ulangan dan masing-masing ulangan terdiri dari dua unit percobaan. Tanah di sekitar rizosfer tanaman diambil sebanyak 100 g yaitu pada empat titik yang berjarak 10 cm dari bonggol tanaman pisang sebanyak 25 g tanah, lalu dimasukkan ke dalam plastik dan diaduk. Masing-masing sampel tanah diambil sebanyak 10 g tanah dan dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer, diaduk dengan 90 ml akuades steril selama 30 menit. Dengan menggunakan mikropipet, sebanyak 1 ml suspensi tanah tersebut dimasukkan ke dalam labu lain yang berisi 99 ml akuades steril untuk mendapatkan pengenceran  $10^{-3}$ . Dengan cara serupa dibuat suspensi sampai pengenceran  $10^{-5}$ . Sebanyak 0,5 ml suspensi hasil pengenceran disebar-ratakan pada cawan petri yang mengandung PDA-R kemudian diinkubasikan selama 3-5 hari. Penghitungan propagula dilakukan dengan menghitung koloni yang muncul dihitung dengan menggunakan *hand counter* (Agrios, 2005).

### **(3) Pertumbuhan dan Perkembangan Tanaman Pisang**

Aspek agronomi yang diamati pada penelitian ini ialah tinggi tanaman, lingkaran batang dan jumlah daun tanaman pisang. Pengamatan dimulai pada saat tanaman dipindahkan ke media tanah kemudian setiap bulannya diamati sampai dengan umur tanaman empat bulan.

## **E. Analisis Data**

Data yang diperoleh diolah secara statistika dengan uji ragam (ANOVA)

kemudian dilanjutkan dengan uji BNT dan analisis ortogonal kontras ( $P \leq 0,05$ ).