

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

#### **3.1 Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan di Kebun Percobaan Tanaman Industri dan Penyegar Cahaya Negeri, Abung Barat, Lampung Utara dan Laboratorium Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universit Lampung pada bulan Juli 2014 hingga Februari 2015.

#### **3.2 Bahan dan Alat**

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tujuh isolat *Trichoderma* spp., bahan organik jerami padi, kulit kopi, media PDA, media PDA- L, media PDA-RSC, media menir, alkohol 70%, air, antibiotik *streptomycin*, *chlorophenicol*, *rose bengal* dan aquades.

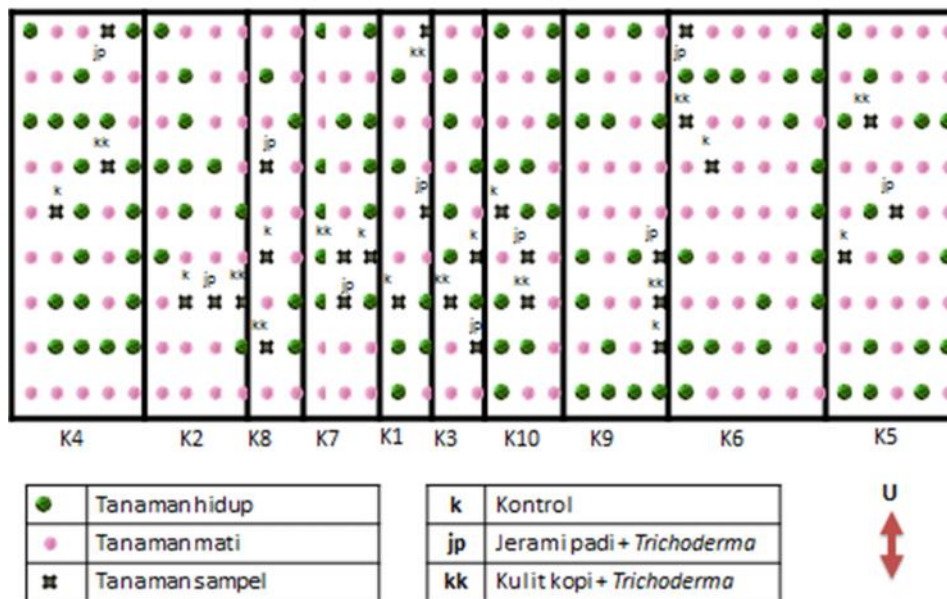
Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah cawan petri, tabung erlenmeyer, tabung reaksi, bor gabus, lampu bunsen, *laminar air flow*, gelas ukur 100 ml, penggaris, jarum ose, jarum, pipet tetes, *aluminium foil*, plastik *wrap*, kertas label, nampan, alat kukus, plastik tahan panas, *autoklaf*, cangkul, koret, alat pemotong, terpal, ember plastik, timbangan dan alat tulis.

Tabel 1. Nama dan asal isolat *Trichoderma* spp.

	<b>Nama Isolat</b>	<b>Asal Isolat</b>
1	T1	Lahan Pertanaman lada Lampung Utara
2	T3	Lahan Pertanaman lada Lampung Utara
3	TI M	Koleksi Lab. Proteksi Tanaman FP UNILA
4	T2 M	Koleksi Lab. Proteksi Tanaman FP UNILA
5	T3 M	Koleksi Lab. Proteksi Tanaman FP UNILA
6	Tk ( <i>Trichoderma koningii</i> )	Koleksi Lab. Proteksi Tanaman FP UNILA
7	Tv ( <i>Trichoderma viride</i> )	Koleksi Lab. Proteksi Tanaman FP UNILA

### 3.3 Metode Penelitian

Penelitian ini disusun dalam rancangan acak kelompok. Pengelompokan didasarkan pada kemiringan lahan dengan tiga perlakuan yaitu kontrol (tanpa aplikasi *Trichoderma* sp. dan tanpa bahan organik), aplikasi jerami padi dan *Trichoderma* sp. serta aplikasi kulit kopi dan *Trichoderma* sp. Masing-masing perlakuan diulang sebanyak 10 kali. Data yang diperoleh akan diolah secara statistik dengan uji ragam dan dilanjutkan dengan uji BNT pada taraf 5%.



Gambar 1. Denah lokasi penelitian di Kebun Percobaan Cahaya Negeri.

### 3.4 Pelaksanaan Penelitian

#### 3.4.1 Pembuatan Media

##### a. *Potato Dextrose Agar - Asam Laktat (PDA-L)*

Media PDA-L dibuat dengan komposisi 1 liter aquades, 200 gram kentang, 20 gram agar batang dan 20 gram gula. Kentang yang telah ditimbang sebanyak 200 gram dikupas kemudian dicuci dengan air bersih, selanjutnya dipotong dengan ukuran 1x1x1 cm dan direbus dalam 1 liter air aquades. Sari rebusan kentang selanjutnya dimasukkan ke dalam tabung erlenmeyer dan ditambahkan potongan agar batang dan gula, lalu ditambah dengan aquades hingga volume mencapai 1 liter kemudian

diautoklaf selama 15 menit. Sebelum media dituang ke dalam cawan petri, ditambahkan asam laktat sebanyak 1,4 ml (Ginting & Maryono, 2011).

**b. *Potato Dextrose Agar- Rose Bengal streptomycin chlorophenicol (PDA-RSC)***

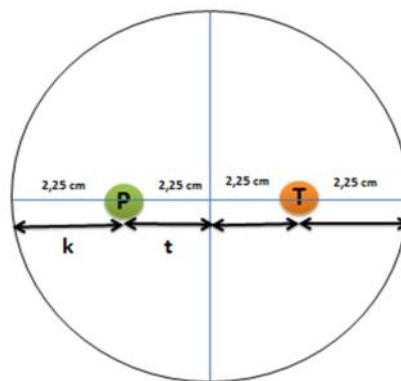
Media PDA-RSC dibuat dengan komposisi 1 liter aquades, 200 gram kentang, 20 gram agar batang, 20 gram gula, dan 40 gram *rose bengal*. Kentang yang telah ditimbang sebanyak 200 gram dikupas kemudian dicuci dengan air bersih, selanjutnya dipotong dengan ukuran 1x1x1 cm dan direbus dalam 1 liter air aquades. Sari rebusan kentang selanjutnya dimasukkan ke dalam tabung erlenmeyer dan ditambahkan potongan agar batang, gula dan *rose bengal* sebanyak 40 ppm untuk menghambat pertumbuhan bakteri dan membatasi pertumbuhan koloni jamur, selanjutnya ditambah dengan aquades hingga volume mencapai 1 liter kemudian campuran tersebut diautoklaf selama 15 menit. Sebelum media dituang ke dalam cawan petri, ditambahkan antibiotik *streptomycin* dan *chlorophenicol* masing-masing sebanyak 60 ppm (Ginting & Maryono, 2011). Media PDA-RSC digunakan sebagai media pertumbuhan jamur untuk menghitung populasi jamur di sekitar pangkal tanaman.

**3.4.2 Seleksi Jamur *Trichoderma* spp.**

Seleksi dilakukan untuk mendapatkan satu isolat *Trichoderma* yang terbaik dalam menekan pertumbuhan *Phytophthora capsici* secara *in vitro* untuk selanjutnya diuji di lahan petani. Seleksi dilakukan dengan menggunakan uji antagonisme yang mengacu pada metode dua biakan (*dual culture method*) (Gambar. 2). Cawan petri dibalik dan

pada bagian belakangnya dibuat garis diameter yang saling berpotongan pada tengah cawan petri dengan menggunakan spidol permanen. Selanjutnya pada garis tersebut ditentukan dua titik yang berjarak 2,25 cm dari tepi cawan secara berlawanan. Kedua cuplikan miselium *Trichoderma* dan *P. capsici* berdiameter 0,8 cm diambil dari biakan berumur 3-5 hari diinfestasikan di atas media PDA masing-masing di atas kedua titik tersebut. Selanjutnya diinkubasi pada suhu ruang.

Pengamatan dilakukan setiap hari dengan mengukur jari-jari koloni *P. capsici*. Jari-jari kearah miselium *Trichoderma* menunjukkan pengaruh perlakuan, sedangkan jari-jari ke arah sebaliknya merupakan kontrol. Penghambatan dihitung dengan menggunakan rumus  $P = [(K - T)/K] \times 100\%$  dengan P = penghambatan pertumbuhan *P. capsici* oleh *Trichoderma* (%), K = jari-jari koloni *P. capsici* kontrol (arah berlawanan dengan koloni *Trichoderma*), dan T = jari-jari koloni *P. capsici* hasil perlakuan (kearah koloni *Trichoderma*) (Ginting & Maryono, 2011).



Gambar 2. Tata letak jamur *P. capsici* dan *Trichoderma* sp. pada uji antagonis dalam cawan petri (Putri, 2010). P = jamur *Phytophthora capsici*, T = jamur *Trichoderma* sp., k = jari-jari kontrol (arah berlawanan dengan *Trichoderma* sp.), t = jari-jari koloni *P. capsici* hasil perlakuan (kearah koloni *Trichoderma* sp.).

### **3.4.3 Pembuatan *Starter Jamur Trichoderma* Terpilih**

Untuk membuat *starter*, *Trichoderma* sp. yang terpilih dari seleksi melalui uji antagonis dikembangkan pada media menir. Sebanyak 120 gram menir dicuci bersih kemudian dikukus di atas air yang mendidih selama 15 menit. Selanjutnya menir kukus dimasukkan ke dalam plastik tahan panas. Kemudian disterilkan dalam autoklaf pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  dengan tekanan 1 atm selama 15 menit. Lima bor gabus *Trichoderma* sp. terpilih yang berumur 4 hari dimasukkan dalam masing-masing media. Kemudian seluruh media diinkubasikan selama 10 hari disertai dengan penghomogenan setelah tampak pertumbuhan jamur. Selanjutnya media dikering-anginkan selama 3 hari. Setelah itu, masing-masing media dimasukkan kembali ke dalam plastik steril dan disimpan selama 1 bulan hingga tampak hijau secara keseluruhan pada media.

### **3.4.4 Penyiapan Lahan Percobaan dan *Infestasi Jamur Trichoderma* sp.**

Di lapangan, disiapkan jerami padi dan kulit kopi masing-masing 25 liter. Jerami yang disiapkan dipotong-potong dan dikeringkan. Sekitar pangkal batang lada dibersihkan hingga radius 50 cm dan dilakukan olah tanah minimum. Selanjutnya 2,5 liter bahan organik dimasukkan ke dalam plastik. Semenrata itu, dibuat suspensi dengan mencampurkan 10 gram starter *Trichoderma* sp. dan 100 ml aquades steril. Selanjutnya suspensi disiramkan secara merata pada bahan organik dan diinkubasi selama 2 minggu. Hasil inkubasi diinfestasikan di sekeliling pangkal batang lada dengan radius 30 cm.

### 3.4.5 Pengamatan dan Pengumpulan Data

Pengamatan dilakukan satu minggu sekali sekaligus dilakukan pemeliharaan tanaman. Variabel yang diamati adalah keterjadian penyakit serta populasi jamur di sekitar pangkal batang lada. Persentase keterjadian penyakit dihitung dengan menggunakan rumus

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

Keterangan:

KtP : Keterjadian penyakit

n : Jumlah tanaman yang terserang

N : Jumlah tanaman yang diamati.

Populasi jamur dihitung dengan cara sebagai berikut. Sebanyak kira-kira 200 gram sampel tanah diambil dari empat arah di sekeliling tanaman. Di laboratorium, *Trichoderma* spp. diisolasi dengan teknik pengenceran (*dilution plate technique*) menurut Johnson & Curl (1972 dalam Putri, 2010). Sebanyak 10 gram setara berat kering tanah dimasukkan dalam labu erlenmeyer berisi 90 ml aquades steril, diaduk hingga merata selama 30 menit. Sebanyak 1 ml campuran menggunakan mikropipet dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer berisi 99 ml aquades steril untuk mendapatkan pengenceran  $10^3$ . Dengan cara yang sama, dibuat suspensi dengan pengenceran  $10^5$ . Sebanyak 0,25 ml suspensi dari pengenceran  $10^3$  dan  $10^5$  disebarkan pada permukaan media dalam cawan petri. Media yang digunakan adalah PDA yang

ditambah dengan *rose bengal* (40 ppm), *streptomycin* (60 ppm), dan *chlorophenicol* (60 ppm) (media PDA-RSC). Pengamatan terhadap kultur jamur yang tumbuh dilakukan 3-5 hari, selanjutnya koloni jamur *Trichoderma* dan jamur lain yang tumbuh pada media dihitung (Ginting & Maryono, 2011).