

III. BAHAN DAN METODE

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Ilmu Penyakit Tumbuhan, Bidang Proteksi Tanaman, Jurusan Agroteknologi, Fakultas Pertanian Universitas Lampung dari April – Agustus 2014.

3.2 Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan antara lain; media PDA (*Potato dextrose agar*), media PDB (*Potato dextrose broth*), biakan patogen *S. rolfsii*, isolat *Trichoderma* sp., NaOCl, alkohol, asam laktat, dan lain-lain. Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain *shaker*, *rotamixer*, cawan petri dengan diameter 9 cm, *cork borer*, aluminium foil, plastik wrap, plastik tahan panas, tabung erlenmeyer, dan lain-lain.

3.3 Metode Penelitian

Rancangan percobaan yang digunakan dalam sub penelitian uji antagonisme metode kultur ganda dan uji filtrat adalah rancangan acak lengkap dan data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan sidik ragam dan perbedaan nilai tengah antar perlakuan akan diuji dengan uji BNT pada α 0,05.

3.4 Pelaksanaan Penelitian

3.4.1 Isolasi dan perbanyakan *S. rolfsii*

Jamur *S. rolfsii* diisolasi dari bagian tanaman kedelai yang terserang *S. rolfsii*. Bagian tanaman yang sakit dipotong dengan ukuran 0,5 cm. Potongan tersebut lalu direndam dalam akuades lalu direndam lagi dalam larutan NaOCl (klorok) selama 30 detik. Setelah direndam, potongan tersebut dibilas kembali dalam akuades dan ditiriskan diatas tisu. Setelah ditiriskan, potongan tersebut diletakkan di atas permukaan media PDA dalam cawan petri.

3.4.2 Peremajaan dan pembuatan filtrat *Trichoderma* sp.

Sebanyak 4 isolat *Trichoderma* sp. yaitu *T. koningii*, *T. koningii*, *T. harzianum*, dan *Trichoderma* sp. yang digunakan dalam percobaan ini didapatkan dari koleksi di Laboratorium Penyakit Tanaman Bidang Proteksi Tanaman Jurusan Agroteknologi Universitas Lampung yang diperoleh dari hasil isolasi tanah rizosfer tanaman cabai.

Keempat isolat *Trichoderma* sp. yang digunakan berasal dari pengelompokan 11 isolat yang dibedakan dari warna dan pola koloni jamur. Biakan *Trichoderma* sp. terlebih dahulu diremajakan pada media PDA sebelum digunakan dalam pengujian. Peremajaan dilakukan dengan cara meletakkan potongan berbentuk cakram *Trichoderma* berukuran 4 mm ke dalam media PDA baru dan kemudian diinkubasi selama 7 hari. Setelah tumbuh, *Trichoderma* sp. diperbanyak pada media PDA baru dan selanjutnya digunakan untuk pengujian.

Untuk mendapatkan filtrat *Trichoderma*, jamur ini terlebih dahulu dibiakkan pada media cair *potato dextrose broth* (PDB). Komposisi media cair yang digunakan sama dengan komposisi media PDA, tetapi tanpa menggunakan agar. Sebanyak 5 potongan cakram *Trichoderma* sp. dimasukkan dalam 500 ml media cair yang sudah disiapkan dalam tabung Erlenmeyer, kemudian diinkubasi selama 7 hari pada suhu ruang dengan pencahayaan matahari. Setelah 7 hari, media cair tersebut disaring untuk memisahkan struktur jamur dengan cairannya. Filtrat tersebut selanjutnya digunakan dalam pengujian.

3.4.3 Pengujian antagonisme dengan metode kultur ganda

Pengujian dengan metode kultur ganda dilakukan untuk mengetahui kemampuan *Trichoderma* sp. dalam kemampuan parasitisme, persaingan ruang dan nutrisi, serta antibiosis dan lisis. Biakan *Trichoderma* sp. yang telah diinkubasi selama 4 hari kemudian dipindahkan ke dalam media PDA yang baru dengan menggunakan *cork borer* berdiameter 4 mm. Isolat patogen yang telah diinkubasi selama 4 hari kemudian dipindahkan ke media PDA yang sama dengan *Trichoderma* sp. Potongan cakram *Trichoderma* sp. diletakkan 3 cm dari tepi cawan, sedangkan potongan cakram isolat patogen diletakkan 3 cm dari tepi cawan pada bagian sisi depan cuplikan *Trichoderma* sp, kemudian diinkubasi.

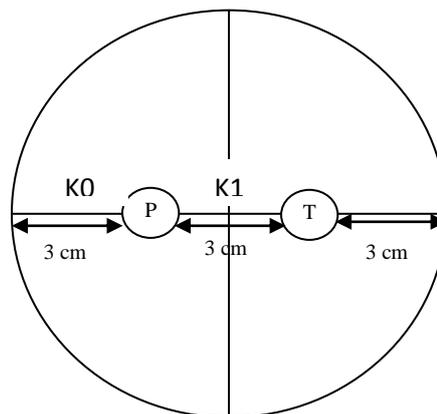
Peubah yang diamati adalah jari-jari pertumbuhan koloni patogen. Pengukuran jari-jari pertumbuhan koloni patogen dilakukan dengan cara mengukur jari-jari pertumbuhan koloni yang tumbuh ke arah biakan *Trichoderma* sp. sebagai data perlakuan dan ke arah tepi cawan sebagai data kontrol. Pengukuran jari-jari dilakukan setiap hari sampai pertumbuhan koloni pada kontrol mencapai tepi

cawan. Setelah data jari-jari didapatkan kemudian dihitung persentase penghambatan *Trichoderma* sp. terhadap pertumbuhan koloni patogen dengan rumus (Nduagu *et al.*, 2008) :

$$P = \frac{K_0 - K_1}{K_0} \times 100\%$$

P adalah persentase penghambatan, K_0 = jari-jari koloni patogen ke arah tepi cawan petri (kontrol), dan K_1 = jari-jari koloni patogen ke arah biakan *Trichoderma* sp.

Untuk mengetahui ada tidaknya lisis dan antibiosis dilakukan pengamatan pada titik pertemuan patogen dan *Trichoderma* sp. yang ditunjukkan adanya batas yang jelas antara koloni patogen dan *Trichoderma* sp. atau adanya warna kuning atau coklat yang dilihat dari bagian bawah cawan. Berikut ini merupakan tata letak uji antagonisme metode kultur ganda.



Gambar 1. Tata letak jamur *Trichoderma* sp. dan *S. rolfsii* pada uji antagonisme dalam cawan petri. (P = biakan *S. rolfsii*, T = biakan *Trichoderma* sp.).

3.4.4 Pengujian filtrat *Trichoderma* sp. terhadap pertumbuhan *S. rolfsii*.

Pada pengujian ini, media yang digunakan adalah campuran filtrat *Trichoderma* dan media PDA dengan perbandingan 1:1. Sebanyak 25 ml filtrat *Trichoderma* dicampur dengan 25 ml media PDA yang belum jadi, lalu diotoklaf pada suhu 121°C selama 10 menit. Untuk perlakuan kontrol, media yang digunakan hanya media PDA tanpa filtrat *Trichoderma*. Setelah selesai diotoklaf dan cukup dingin, media uji tersebut dituang dalam cawan petri dan dibiarkan membeku. Setelah beku, sebanyak 1 sklerotia *S. rolfsii* diletakkan tepat ditengah cawan lalu diinkubasi pada suhu ruang dengan pencahayaan matahari.

Perlakuan pada percobaan ini adalah filtrat dari 4 isolat *Trichoderma* sp. ditambah dengan 1 perlakuan kontrol. Masing-masing perlakuan diulang sebanyak 5 kali. Peubah yang diamati adalah pertumbuhan koloni jamur *S. rolfsii*. Pengamatan dilakukan setiap hari dengan mengukur pertumbuhan koloni *S.rolfsii*. Pengukuran dihentikan apabila pada perlakuan kontrol pertumbuhan koloni *S.rolfsii* telah mencapai tepi cawan petri.

3.4.5 Pengujian filtrat *Trichoderma* sp. terhadap perkecambahan sklerotia *S. rolfsii*.

Pada pengujian ini, sklerotia dari *S. rolfsii* terlebih dahulu direndam dalam filtrat *Trichoderma* terbaik. Perendaman dalam filtrat dilakukan selama 10 menit, selanjutnya ditiriskan pada kertas tisu lalu diinokulasikan pada media PDA dan inkubasi pada suhu ruang dengan pencahayaan matahari.. Media PDA yang

digunakan adalah media PDA tanpa dicampur filtrat *Trichoderma*. Untuk perlakuan kontrol, sklerotia dari *S. rolfsii* direndam dalam aquades steril. Setiap perlakuan terdiri atas 5 cawan Petri dan setiap cawan petri terdiri atas 10 sklerotia. Pengamatan dilakukan setiap hari dengan menghitung jumlah sklerotia yang berkecambah dan tidak berkecambah. Selain itu juga diamati perkembangan koloni *Sclerotium* yang terbentuk.