

III. BAHAN DAN METODE

3.1 Tempat dan waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian, Jurusan Agroteknologi, Universitas Lampung. Penelitian ini dilaksanakan mulai bulan Mei sampai dengan Juni 2014.

3.2 Bahan dan alat

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah, buah pisang *cavendish* 240 buah, isolat *T. viride*, *T. harzianum*, *T. koningii* dan isolat *C. musae*, media *potato dextrose agar* (PDA), asam laktat, alkohol 70%, spritus, dan aquades.

Alat-alat yang diperlukan untuk penelitian ini adalah mikroskop stereo, mikroskop majemuk, kaca preparat dan kaca penutup, tabung *erlenmayer*, tabung reaksi, cawan petri, *autoclave*, timbangan listrik, mikropipet, lampu bunsen, kertas alumunium foil, plastic *cling wrap*, nampan plastik, bor gabus, spatula dan jarum ose.

3.3 Metode penelitian

Percobaan ini disusun dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 4 perlakuan dan 6 ulangan. Perlakuan terdiri dari kontrol (P0), aplikasi *T. viride* (P1), *T. harzianum* (P2), dan *T. koningii* (P3). Percobaan dilaksanakan *secara In vitro* dan *secara In vivo*. Percobaan *In vitro* adalah untuk mengetahui pengaruh *Trichoderma* spp. dalam menghambat pertumbuhan koloni jamur *C. musae*. Sedangkan percobaan *In vivo* adalah untuk mengetahui pengaruh *Trichoderma* spp. terhadap intensitas penyakit antraknosa yang disebabkan oleh *C. musae* pada buah pisang *cavendish*.

Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan sidik ragam (Anova) yang dilanjutkan dengan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) pada taraf nyata 1%.

3.4 Pelaksanaan percobaan *in vitro*

3.4.1 Penyiapan isolat *C. musae*

Penyiapan biakan murni *C. musae* dilakukan di Laboratorium Penyakit Tumbuhan. Biakan jamur *C. musae* di isolasi dari buah pisang *cavendish* sebelumnya yang telah terserang penyakit antraknosa. Untuk mendapatkan biakan murni, dilakukan proses penumbuhan ulang ke media PDA dalam cawan petri. Buah pisang yang terserang antraknosa kemudian dikupas dan dipotong berbentuk dadu ($\pm 0,5 \times 0,5$ cm). potongan dadu tubuh buah tersebut selanjutnya direndam dalam larutan klorok 0,5% selama lima 1 menit, lalu ditiriskan (kering angin). Setelah kering, tiga buah potongan dadu diletakkan dalam cawan yang berisi media PDA. Selanjutnya isolat *C. musae* yang tumbuh dimurnikan kembali dalam media PDA yang lain.

3.4.2 Penyiapan isolat *Trichoderma* spp.

Isolat *Trichoderma* spp. yang terdapat pada Laboratorium Penyakit Tumbuhan, Fakultas Universitas Lampung, *Trichoderma* spp. diperbanyak dan dibiakkan pada media, kemudian biakan yang tumbuh dimurnikan dan identifikasi berdasarkan ciri-ciri morfologi jamur baik secara makroskopis maupun mikroskopis, sehingga diketahui biakan murni *T. viride*, *T. harzianum*, dan *T. koningii*.

3.4.3 Pengujian kemampuan *Trichoderma* spp sebagai agen antagonis secara *in vitro*

Pengujian dilakukan pada media PDA dalam cawan petri. Pada bagian bawah cawan dibuat garis tengah yang saling tegak lurus. Kemudian pada garis horizontal ditandai 2 titik yang masing-masing berjarak 3 cm dari tepi cawan untuk meletakkan biakan murni *C. musae* dan biakan murni jamur *Trichoderma* spp. (*dual culture method*). Setelah itu, cawan petri berisikan biakan murni *C. musae* dan *Trichoderma* spp. di inkubasi pada suhu ruang selama 6 hari.

3.5 Pelaksanaan percobaan *in vivo*

3.5.1 Penyiapan buah pisang

Pada penelitian ini setiap perlakuan menggunakan 10 buah pisang yang belum matang, sehingga jumlah keseluruhan sebanyak 240 buah, buah pisang yang telah dicuci bersih kemudian didisinfeksi dengan menyemprotkan alkohol 70% kebagian permukaan buah. Kemudian buah

pisang dimasukkan kedalam masing-masing nampan plastik berukuran 3x30 cm.

3.5.2 Penyiapan suspensi *Trichoderma* spp.

Pembuatan suspensi *Trichoderma* spp. dilakukan dengan cara biakan *Trichoderma* spp. diberi 10 (sepuluh) ml aquades steril ke dalam *beaker glass*, sehingga didapat kerapatan spora 37×10^6 spora/ml

3.5.3 Penyiapan suspensi *C. musae*

Pembuatan suspensi *C. musae* dilakukan dengan cara 1 (satu) petri biakan *C. musae* yang telah berumur 7 (tujuh) hari diberi 10 ml (sepuluh mili liter) aquades kedalam tabung reaksi sehingga didapat kerapatan spora $1,37 \times 10^6$ spora per ml.

3.5.4 Aplikasi *C. musae* dan *Trichoderma* spp . secara *in vivo*

Aplikasi *Trichoderma* spp. dan *C. musae* pada buah pisang dilakukan dengan menggunakan *hand sprayer* dengan cara menyemprotkan suspensi inokulum *Trichoderma* dan *C. musae* secara langsung keseluruh pada permukaan buah pisang, *Trichoderma* spp. disemprotkan terlebih dahulu dan di keringkan ± 1 menit, kemudian berikutnya di inokulasi dengan suspensi *C. musae*. Buah pisang diletakkan di atas nampan yang ditutup plastik *wrap* dan kemudian di inkubasi pada ruang dengan suhu kamar.

3.6 Pengamatan

3.6.1 Pengamatan percobaan *in vitro*

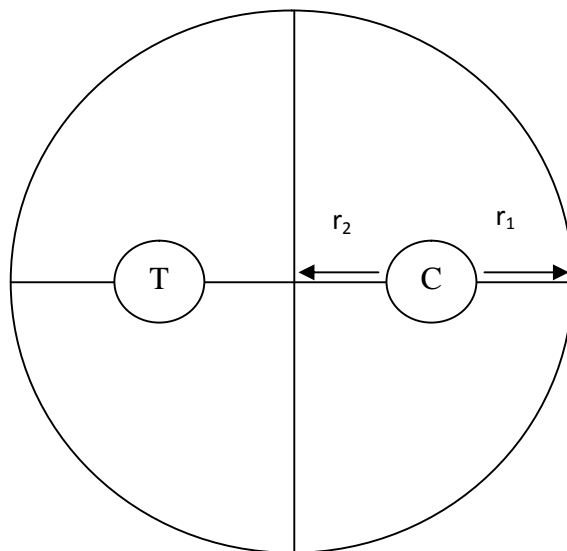
Dalam pengamatan percobaan secara *in vitro* dilakukan terhadap perkembangan koloni *C. musae* yang tumbuh pada media. Pengamatan dilakukan setiap hari dan dihentikan apabila perkembangan salah satu koloni jamur telah maksimal (mencapai pinggir petridish).

Variabel yang diamati adalah persentase penghambatan pertumbuhan koloni *C. musae* pada media PDA.

Persentase penghambatan ditentukan dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{persentas daerah penghambatan} = \frac{r_1 - r_2}{r_1} \times 100\%$$

Keterangan : r_1 : Jari-jari koloni *C. musae* yang kearah menjauhi Jamur *Trichoderma* spp.
 r_2 : Jari-jari koloni *C. musae* yang menuju/mendekati jamur *Trichoderma* spp.



3.6.2 Pengamatan percobaan *in vivo*

Pengamatan percobaan secara *in vivo* dilakukan 6 hari setelah aplikasi (HSA) dengan melihat gejala antraknosa pada buah pisang dan selanjutnya dilakukan pengamatan setiap hari. Buah pisang yang akan diamati dibungkus dengan menggunakan plastik *wrapping* secara keseluruhan, kemudian gejala yang muncul digambar diatas plastik *wrapping* tersebut. Plastik *wrapping* yang akan dihitung luas gejala dan luas keseluruhan buah tersebut diletakkan diatas kertas millimeter block.

Variable yang diamati adalah keparahan penyakit (%) dihitung dengan rumus :

$$\text{Keparahan Penyakit : } \frac{A}{B} \times 100\%$$

Keterangan : A : Luas gejala yang telah digambar diatas plastik *wrapping* pada permukaan buah pisang.

B : Luas plastik *wrapping* yang membungkus permukaan buah pisang.

Pengamatan dihentikan apabila salah satu data yang diperoleh sudah mencapai titik konstan.