

III. BAHAN DAN METODE

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan dari Desember 2012 sampai Maret 2013 di Laboratorium Penyakit Tumbuhan Jurusan Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung.

3.2 Bahan dan Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah cawan petri, pinset, pipet tetes, nampan, jarum, cutter, jarum *ose*, jarum *ant*, *Laminar Air flow*, *Autoclave*, erlenmeyer, gelas ukur, mikroskop stereo, oven, plastik tahan panas, dan bunsen. Bahan-bahan yang digunakan ialah beberapa jenis buah cabai besar dan kecil, larutan klorok 1%, aquades, kertas tissue, kertas label, alkohol 70%, isolat *Colletotrichum gloeosporioides* yang diperoleh melalui hasil isolasi dari buah cabai yang terserang antraknosa yang didapat dari beberapa daerah, media PDA, *aluminium foil* dan plastik *wrap*.

3.3 Metode Penelitian

Penelitian dilaksanakan dalam percobaan faktorial menggunakan rancangan acak lengkap dengan tiga ulangan. Sebagai faktor pertama adalah isolat *Colletotrichum*, dan faktor kedua adalah jenis cabai. Isolat *C. gloeosporioides*

terdiri atas empat isolat hasil isolasi dari buah cabai yang terserang antraknosa yang didapat dari beberapa daerah. Faktor kedua terdiri atas empat jenis cabai yaitu cabai rawit (*C. frutescens*), cabai merah keriting (*C. annuum* var TM 99), cabai caplak (*C. frutescens* (kul. caplak)) dan cabai hijau besar (*C. annuum* (kul. brebes)). Data pengamatan dianalisis dengan sidik ragam dan pemisahan nilai tengah antar perlakuan diuji dengan uji beda nyata terkecil (BNT) dengan $\alpha_{0.05}$.

3.4 Pelaksanaan Penelitian

3.4.1 Penyiapan jenis cabai uji

Empat jenis buah cabai segar besar dan kecil (*C. frutescens*, *C. annuum* var TM 99, *C. frutescens* (kul. caplak) dan *C. annuum* (kul. brebes)) diperoleh dari pasar. Cabai-cabai tersebut didesinfektan menggunakan larutan klorok 1% selama satu menit, kemudian dibilas menggunakan aquades dan dikeringanginkan di atas kertas tisu. Setelah kering angin, buah cabai uji diletakkan dalam nampan plastik yang dilapisi dengan tisu empat lapis dan dibasahi dengan aquades 130 ml/nampan.

3.4.2 Penyiapan jamur *Colletotrichum*

Jamur *Colletotrichum* diisolasi dari buah cabai yang bergejala antraknosa yang diambil dari beberapa daerah yaitu Bandar Lampung, Lampung Barat, Pringsewu, dan Gisting. Buah cabai yang terinfeksi *Colletotrichum* dipotong kecil-kecil di bagian antara yang sehat dengan yang sakit. Kemudian potongan-potongan tersebut didesinfeksi dengan larutan klorok 1% ± selama satu menit, kemudian dibilas menggunakan aquades dan dikeringanginkan di atas kertas tisu. Setelah

keringangin potongan tersebut ditumbuhkan pada media PDA dan diinkubasi, jamur yang tumbuh kemudian dimurnikan dan diidentifikasi berdasarkan karakter morfologinya. Biakan *Colletotrichum* yang digunakan untuk pengujian merupakan biakan murni berumur tujuh hari setelah inkubasi pada media PDA.

3.4.3 Inokulasi jamur *Colletotrichum*

Metode pengujian patotipe *Colletotrichum* dilaksanakan berdasar Montri *et al.* (2009). Setelah semua buah cabai sudah didesinfektan dan disusun dalam nampan, masing-masing buah cabai dilukai menggunakan jarum steril sebanyak satu luka per buah tepat di tengah buah. Inokulasi dilakukan dengan meletakkan secara terbalik cuplikan miselium *C. gloeosporioides* dari media PDA dengan diameter 2 mm di titik pelukaan. Setelah semua buah diinokulasi dengan patogen, nampan ditutup dengan palstik penutup (*plastic wrap*) dan diinkubasi pada suhu ruang selama sembilan hari atau infeksi antraknosa maksimum pada salah satu tubuh buah cabai.

3.5 Pengamatan

Pengamatan dilakukan setiap hari selama sembilan hari. Peubah yang diamati adalah keparahan penyakit antraknosa yang diukur berdasarkan luas nekrotik yang terdapat pada setiap buah cabai dibandingkan dengan luas total permukaan buah cabai. Pengukuran luas nekrotik dilakukan pada saat gejala antraknosa mencapai maksimum pada buah cabai rawit.

Luas nekrotik yang didapat pada masing-masing cabai kemudian digunakan untuk menentukan keparahan penyakit antraknosa. Skor keparahan penyakit yang digunakan adalah 0-9 (Pakdeevaporn *et al.*, 2005) (Tabel 1).

Tabel 1. Skor keparahan penyakit antraknosa buah cabai, tingkat resistensi cabai, dan deskripsi gejala

Skor	Tingkat resistensi	Deskripsi gejala
0	HR (<i>highly resistant</i>), sangat resisten	Tidak ada infeksi
1	R (<i>resistant</i>), tahan	1-2% area buah menunjukkan nekrotik atau sebagian membusuk / basah seperti terendam air yang melingkupi situs infeksi
3	MR (<i>moderately resistant</i>), agak tahan	> 2-5% area buah menunjukkan nekrotik, mungkin ada <i>acervuli</i> (tubuh buah), atau membusuk / basah seperti terendam air hingga 5% dari permukaan buah
5	MS (<i>moderately susceptible</i>), agak peka	> 5-15% area buah menunjukkan nekrotik, mungkin ada <i>acervuli</i> (tubuh buah), atau membusuk / basah seperti terendam air hingga 25% dari permukaan buah
7	S (<i>susceptible</i>), peka	> 15-25% area buah menunjukkan nekrotik dengan <i>acervuli</i> (tubuh buah)
9	HS (<i>highly susceptible</i>) sangat peka	> 25% area buah menunjukkan nekrotik, seringkali melingkupi buah, banyak sekali <i>acervuli</i> .

Penentuan patotipe didasarkan pada perbedaan-perbedaan kualitatif infeksi isolat-isolat patogen (skor 0 versus 1-9), yang terjadi pada suatu jenis cabai tertentu.

Adanya nekrotik merupakan indikasi terjadi infeksi (patogen bersifat patogenik) sedangkan perbedaan ukuran lesio merupakan indikasi tingkat virulensi atau keagresifan dari setiap isolat (Montri *et al.*, 2009; Mongkolporn *et al.*, 2010).

Ada atau tidaknya patotipe pada jamur *C.gloeosporioides* yang diuji dapat diketahui dari patogenesisitas masing-masing isolat *C.gloeosporioides* pada buah cabai uji. Menurut Montri *et al.* (2009) apabila semua isolat *C. gloeosporioides* yang diuji mampu menginfeksi semua jenis cabai yang digunakan (patogenik, skor 1-9) dan tidak ada yang tidak bisa menginfeksi buah cabai (nonpatogenik, skor 0) maka tidak ada patotipe.