

3. METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Penyakit Pusat Penelitian Perkebunan Gula Indonesia Pasuruan yang dimulai pada bulan April sampai dengan Juli 2013.

3.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Laminar Air Flow* (LAF), autoklaf, oven, mikroskop, *bunsen burner*, timbangan, cawan petri berdiameter 9cm, jarum ose, botol media, gelas ukur, gelas objek, tutup gelas obyek, *hand sprayer*, *beaker glass* 500 ml, pinset, mikropipet, tip mikropipet, *haemocytometer* dan tabung erlenmeyer.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel bagian tanaman yang terserang penyakit pokahbung, sampel tanah dari perkaran tanaman tebu, aquades, spiritus, media PDA, alkohol 70%, air steril, aquades steril, tisu steril, parafilm, aluminium foil dan kertas label.

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Persiapan Penelitian

a. Pembuatan media

Media yang digunakan untuk perlakuan uji antagonis adalah media Potato Dextrose Agar (PDA). PDA adalah media yang paling umum digunakan dalam menumbuhkan jamur. Proses pembuatan dilakukan di dalam laboratorium dengan komposisi bahan yaitu kentang 200 gram, *agar powder* 15 gram dan dextrose 20 gram (Waller et al, 2001). Menurut Safitri (2010) langkah pertama dalam pembuatan media PDA adalah mengupas kentang dan mencucinya hingga bersih dengan air yang mengalir. Selanjutnya kentang dipotong dadu dan direbus dalam aquadest selama 1 jam. Langkah berikutnya kentang disaring dengan menggunakan kain saring bersih.

Filtrat kentang ditambahkan agar dan glukosa, kemudian dipanaskan dan diaduk hingga larut. Aquades ditambahkan untuk menggantikan cairan yang hilang selama pemanasan. Setelah itu larutan dimasukkan ke dalam tabung erlenmeyer dan dibungkus dengan aluminum foil. Langkah terakhir adalah larutan disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1-2 atm, kemudian didinginkan pada suhu kamar. Medium dapat disimpan pada lemari pendingin (suhu 4°C) untuk menghindari kontaminasi dan meminimalis dehidrasi medium.

b. Isolasi patogen

Isolat *F. moniliformae* diperoleh dengan cara mengambil sampel dari tanaman yang terserang pokahbung dari kebun milik Pusat Penelitian Perkebunan Gula Indonesia Pasuruan. Jamur patogen *F. moniliformae* diisolasi dari bagian daun tebu yang mempunyai gejala penyakit pokahbung. Gejala penyakit pokahbung yang dipilih adalah gejala klorosis pada helaian daun yang baru saja membuka pangkalnya dengan titik-titik atau garis-garis merah (Semangun, 1988) (Gambar 3).



Gambar 1. Tanaman Tebu dengan Gejala Pokahbung

Isolasi dilakukan dengan cara memisahkan daun yang terinfeksi dari tanaman yang selanjutnya dibawa ke laboratorium. Selanjutnya daun yang terinfeksi diisolasi dengan cara memotong bagian daun setengah sehat-setengah sakit dengan ukuran sekitar 5-10 mm². Potongan daun tersebut kemudian disterilisasi permukaan dengan cara merendamnya dalam alkohol 70% selama

kurang lebih 15-30 detik. Setelah itu, potongan daun dikering anginkan di atas kertas tisu steril hingga benar-benar kering. Berikutnya potongan daun tersebut di atas media PDA dalam cawan petri. Semua tahapan tersebut dilakukan di dalam LAF untuk menjaga kondisi aseptik sehingga dapat mengurangi terjadinya kontaminasi.

c. Isolasi Jamur antagonis

Isolat *Trichoderma* diperoleh dengan cara mengambil sampel tanah ± 100 gram dari lima titik pengambilan sampel yang ditentukan secara acak di sekitar perakaran tanaman tebu yang sehat pada kedalaman 0-20cm. Selanjutnya tanah ditimbang seberat 1 gram lalu dimasukkan ke dalam testube yang telah berisi air steril sebanyak 9 ml. Campuran tanah dan air steril tersebut dikocok hingga merata. Setelah homogeny, hasil pengenceran ditumbuhkan pada media PDA dan diinkubasi selama 3 hari untuk melihat cendawan yang tumbuh.

Isolat murni *Trichoderma* diperoleh dengan mengisolasi potongan agar berukuran 5x5 mm dari miselium jamur *Trichoderma* yang kemudian diinkubasi pada suhu ruang. Peremajaan isolat dilakukan ketika isolat telah memenuhi cawan petri ± 7 hari (Mukarlina, 2010).

d. Identifikasi Jamur Patogen

Identifikasi jamur patogen dilakukan dengan menggunakan mikroskop untuk melihat kenampakan mikroskopis dari jamur *F. moniliformae*. Morfologi makrokonidia dari jamur ini dinilai memiliki kesamaan karakteristik dasar pada kebanyakan spesies *Fusarium* lainnya. Makrokonidia dari *Fusarium moniliformae* berbentuk seperti sabit hingga lurus dengan permukaan dorsal dan ventral yang hampir paralel (Nelson, 1991).

Untuk mendapatkan identifikasi yang lebih akurat dilakukan dengan cara melakukan Uji Postulat Koch. Diharapkan gejala yang ditunjukkan oleh isolat yang ditemukan sesuai atau sama dengan gejala pokahbung yang muncul pada saat uji Postulat Koch.

e. Identifikasi Jamur Antagonis

Jamur *Trichoderma* spp. yang tumbuh pada media PDA memiliki warna isolat dari putih menjadi hijau bersamaan dengan pertambahan umur isolat. Koloni *Trichoderma* spp. pada awalnya akan terlihat berwarna putih yang selanjutnya berubah menjadi kehijau-hijauan dengan sebagian besar koloni berwarna hijau di bagian tengah isolat dikelilingi miselium yang masih berwarna putih. Pada akhirnya seluruh isolat jamur akan berwarna hijau (Umrah, 1995 dalam Nurhayati, 2001).

Ciri mikroskopik jamur *Trichoderma* spp. sangat spesifik, jamur ini memiliki percabangan konidiofor yang cukup banyak. Hifa dan konidiofornya hialin. Pada ujung konidiofor tumbuh sel-sel yang menyerupai botol (fialid). Fialidnya tunggal atau membentuk kumpulan. Pada ujung konidiofor terdapat konidia yang bersel tunggal dan hialin (Anonymous, 2012). Konidifor dapat bercabang menyerupai piramida, yaitu pada bagian bawah cabang lateral yang berulang-ulang, sedangkan kearah ujung percabangan menjadi bertambah pendek. Klamidospora umumnya ditemukan dalam miselia dari koloni yang sudah tua, terletak interkalar kadang terminal, umumnya bulat, berwarna hialin, dan berdinding halus (Gandjar,dkk., 1999 dalam Tindaon, 2008).

3.3.2 Pelaksanaan Penelitian

A. Uji In Vitro

Uji antagonis secara in vitro dilakukan dengan dua metode yang berbeda dengan tujuan untuk membandingkan keberhasilan kedua metode yang digunakan. Metode tersebut adalah:

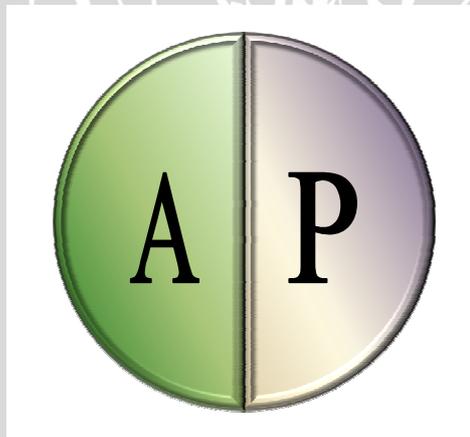
1. Uji Penghambatan Pertumbuhan Koloni Dengan Metode Goresan

Uji penghambatan diawali dengan pembuatan suspensi jamur. Suspensi jamur patogen dan jamur antagonis dibuat dengan cara melarutkan koloni jamur patogen maupun antagonis yang terdapat dalam cawan petri dengan aquades steril sebanyak 10 ml, kemudian isolat dikikis sehingga bagian yang terdapat pada bagian atas terlepas. Selanjutnya suspensi

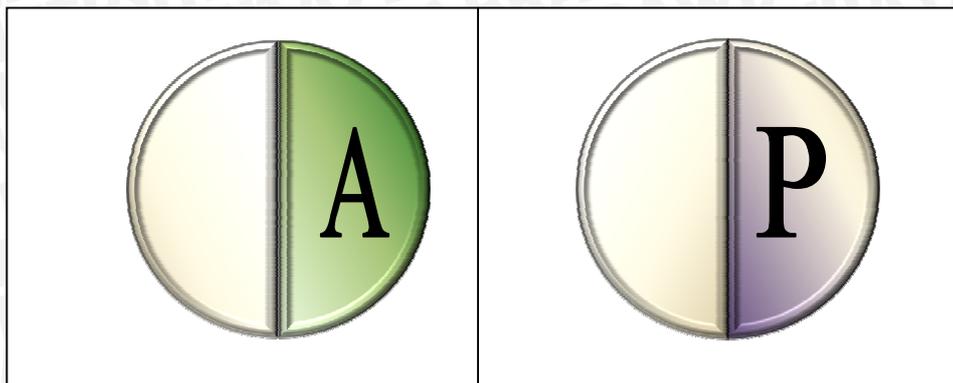
dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditambahkan dengan aquades steril sehingga volumenya menjadi 100 ml (Sumaraw, 1999).

Untuk mengetahui konsentrasi suspensi terbaik dalam uji penghambatan, suspensi masing-masing jamur baik jamur patogen maupun jamur antagonis diencerkan sampai didapatkan konsentrasi suspensi yang diinginkan. Dalam percobaan ini konsentrasi kerapatan spora jamur antagonis dan jamur patogen yang digunakan sebagai perlakuan adalah 10^3 , 10^4 , 10^5 sel spora/ml untuk masing-masing jamur. Perhitungan konsentrasi kerapatan spora dilakukan menggunakan alat yang disebut *haemocytometer*.

Setelah suspensi jamur siap, selanjutnya suspensi dari tiap jamur dituangkan sebanyak 30 μ l pada permukaan media PDA secara bersebelahan dan digoreskan dengan menggunakan alat perata. Penggoresan tidak melewati garis batas pembagi kedua permukaan media tersebut sehingga permukaan media luasnya sama untuk pertumbuhan masing-masing koloni jamur (Gambar 4).



Gambar 2. Metode Uji Penghambatan Pertumbuhan Koloni dengan Goresan

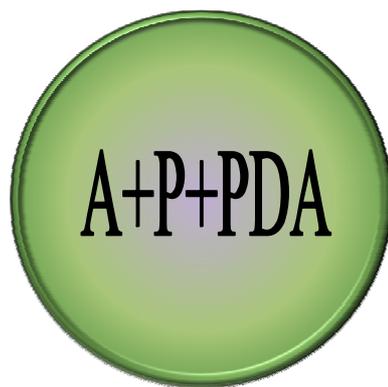


Gambar 3. Kontrol Perlakuan Uji Penghambatan dengan Metode Goresan

Perlakuan dalam percobaan ini diulang sebanyak 3 kali ulangan, dimana kontrol (Gambar 5) dilakukan dengan cara menggoreskan jamur antagonis atau jamur patogen di permukaan media PDA pada satu sisi dan sisi lainnya tanpa perlakuan. Biakan diinkubasi pada suhu kamar dan pemeriksaan terhadap pertumbuhan koloni jamur dilakukan setiap hari hingga hari ke 10.

2. Uji Penghambatan Pertumbuhan Koloni dengan Metode Penuangan

Uji penghambatan pertumbuhan koloni dengan metode ini meliputi beberapa tahap kegiatan. Kegiatan awal adalah pembuatan suspensi jamur antagonis dan jamur patogen dengan konsentrasi kerapatan 10^3 , 10^4 , 10^5 sel spora/ml. Suspensi dari jamur *Trichoderma sp.* dengan tiga kerapatan spora yang berbeda tersebut masing-masing dituang pada cawan petri bersamaan dengan suspensi *F. moniliformae* yang menggunakan kerapatan spora 10^5 (Gambar 5). Selanjutnya 10-15 ml media PDA dengan suhu berkisar antara 40-50°C dituangkan pada cawan tersebut. Setelah itu PDA dan suspensi jamur diaduk sampai merata dengan cara digoyangkan. Untuk kontrol, masing-masing 1 ml suspensi kedua kapang dibiakkan secara terpisah pada media PDA dalam cawan petri. Selanjutnya isolat diinkubasikan pada suhu kamar sekitar 27°C dan pertumbuhan jamur diamati setiap hari sampai dengan 10 hari.



Gambar 4. Metode Uji Penghambatan Pertumbuhan Koloni dengan Penuangan

B. Uji In Vivo

Sebelum melakukan uji agensia antagonis secara in-vivo, maka terlebih dahulu dilakukan perbanyakan isolat sebagai bahan pembuatan suspensi jamur antagonis dan patogen. Suspensi jamur patogen dan antagonis didapatkan dengan cara melarutkan masing-masing jamur *F. moniliformae* maupun *Trichoderma sp.* yang ditumbuhkan pada media media PDA yang telah berumur 10 hari dengan cara memberikan 1 ml larutan aquades steril. Selanjutnya hifa dari jamur yang telah ditetesi aquades steril tersebut dikikis dengan menggunakan *cotton bud* sampai seluruh hifa terangkat dan tercampur dengan aquades. Larutan hifa kemudian dipindah ke dalam sebuah erlenmeyer yang selanjutnya ditambahi aquades steril sebanyak 9 ml. Untuk mendapatkan kerapatan spora setingkat di bawahnya dapat dilakukan dengan cara mengambil sebanyak 1 ml dari larutan ini untuk dipindahkan ke dalam erlenmeyer baru lalu ditambahkan 9 ml aquades steril.

Jauh sebelum infeksi buatan dilakukan, persiapan tanaman tebu di rumah kaca meliputi persiapan media dan bibit tanaman tebu sehat. Media tumbuh tanaman tebu berupa tanah dimasukkan ke dalam polybag dengan berat 2 kg tanah per *polybag*. Sebagai bibit digunakan bibit bagal mata dua. Bibit ini ditanam dalam *polybag* dan ditumbuhkan hingga berumur 2 bulan. Infeksi buatan dilakukan pada tanaman yang berumur 2 bulan dikarenakan pada umur ini tanaman sedang mengalami masa pertumbuhan, sehingga akan cepat memberikan

respon terhadap kondisi lingkungan yang dianggap kurang stabil atau kondisi lingkungan yang ekstrim (Tanimoto dan Nickell, 1965).

Infeksi buatan untuk penyakit pokahbung dilakukan dengan metode yang sederhana. Sebanyak 0,3ml suspensi jamur antagonis dan jamur patogen disuntikkan pada tanaman tebu umur 2 bulan kira-kira 7 cm di bagian bawah ketiak daun plus satu. Penyuntikkan dilakukan pada bagian ini agar tidak mengenai titik tumbuh sehingga kematian tanaman tebu dapat dihindari.

Terdapat dua kontrol dalam perlakuan ini yaitu kontrol positif dan kontrol negatif. Untuk kontrol positif tanaman tebu hanya disuntikkan jamur patogen. Sedangkan untuk kontrol negatif, tanaman tebu tidak disuntikkan jamur patogen maupun jamur antagonis. Pengamatan dilakukan setiap 2 hari sekali selama 4 minggu setelah perlakuan.

3.4 Pengamatan Penelitian

Pada uji antagonis secara *in vitro* dengan metode goresan, parameter yang diamati adalah pertumbuhan jarak penyebaran dari masing-masing jamur. Pertumbuhan luas koloni dapat dilihat dengan mengukur jarak penyebaran koloni jamur yang tumbuh pada permukaan media PDA.

Berbeda dengan metode goresan, metode penuangan memiliki parameter pengamatan yang sedikit berbeda. Pengamatan jamur untuk uji penghambatan dengan metode ini dilakukan dengan memberikan skala tingkat pertumbuhan dari jamur antagonis dalam menghambat pertumbuhan jamur patogen. Skala yang dipakai berdasarkan Skala Bell yang telah dimodifikasi (Bell *et al.*, 1982) dengan 5 tingkatan sebagai berikut:

- C1: Jamur antagonis 100 % menghambat pertumbuhan jamur patogen
- C2: Jamur antagonis 75% menghambat pertumbuhan jamur patogen
- C3: Jamur antagonis 50% menghambat jamur patogen
- C4: Jamur antagonis 25% menghambat pertumbuhan jamur patogen
- C5: Jamur patogen tidak mengalami hambatan pertumbuhan.

Sedangkan parameter pengamatan untuk uji in vivo adalah presentase serangan penyakit pokahbung pada tanaman tebu yang telah diaplikasikan suspensi *Trichoderma sp.* dengan menghitung jumlah daun yang terserang gejala pokahbung pada tanaman tebu pada minggu kedua setelah aplikasi. Selain itu pada minggu ke empat setelah aplikasi hal yang diamati adalah terserang atau tidaknya daun baru yang muncul. Nilai persentase serangan dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut (Epp, 1987):

$$I = \frac{a}{a + b} \times 100\%$$

Keterangan:

I = Intensitas serangan (%)

a = Jumlah daun terserang

b = Jumlah daun sehat

3.5 Analisa Data

Penelitian disusun berdasarkan pola rancangan acak lengkap (RAL) yang terdiri dari empat perlakuan dan setiap perlakuan diulang sebanyak tiga kali sehingga total unit perlakuan adalah 12, yang kemudian data hasil dari pengamatan ini dilanjutkan dengan uji taraf kepercayaan 5%. Apabila terdapat perbedaan nyata antara data hasil pengamatan maka akan dilanjutkan dengan Uji Duncan.