

III. METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Mikologi, Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian, Universitas Brawijaya, Malang. Waktu pelaksanaan pada bulan Maret – Juli 2014.

3.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu cawan petri, gelas ukur 1000 ml, *laminar air flow cabinet* (LAFC), *autoclave*, *centrifuge*, bunsen, *object glass*, *cover glass*, botol media 250 ml, *cork borer*, jarum ose, pisau, timbangan, *pipet*, plastik, *hand sprayer*, kamera dan mikroskop.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu media *Potato Dextrose Agar* (1 liter sari kentang, 20 gr agar, 20 gr dextrose), Media V8 (300 ml konsentrat *V8 juice*, CaCO₃ 4,5 gr, 15 gr agar, 850 ml aquades), NaOCl 2%, aquades steril, alkohol 70%, alkohol 96%, bagian daun, batang, buah, dan akar tanaman kakao yang sehat, buah bergejala *P. palmivora* pada tanaman kakao, spirtus, alumunium foil, plastik *wrapping*, *clorampenicol*, kapas, dan kertas label.

3.3 Metode Penelitian

Penelitian dilakukan dengan metode eksplorasi dan eksperimen, dengan tahapan sebagai berikut:

1. Isolasi *P. palmivora* dari buah tanaman kakao yang bergejala sesuai dengan gejala busuk buah.
2. Eksplorasi jamur endofit pada daun, batang, buah dan akar tanaman kakao yang di ambil dari Desa Babadan, Kab Kediri. Metode pengambilan sampel yang akan digunakan yaitu metode diagonal.
3. Uji daya antagonis isolat jamur endofit yang diperoleh terhadap jamur *P. palmivora* secara *In-vitro* pada media PDA.

3.4 Pelaksanaan Penelitian

3.4.1 Isolasi Patogen *P. palmivora*

P. palmivora diisolasi dari buah kakao yang terserang penyakit dan mempunyai gejala yang sama dengan gejala penyakit busuk buah. Menurut Cook (1978) infeksi *P. Palmivora* dicirikan dengan adanya bercak berwarna coklat yang mulai dari bagian mana saja. Jaringan yang tidak terinfeksi tampak jelas dan dibatasi oleh permukaan kasar, tetapi bercak dapat berkembang dengan cepat dan seringkali menampakkan pembusukan yang menyeluruh dan berwarna hitam.

Isolasi *P. palmivora* dengan cara memotong bagian buah setengah sakit dan setengah sehat. Kemudian direndam pada NaOCl 2%, dicuci dengan alkohol 70% selama 1 menit dan dibilas menggunakan aquades steril 2 kali masing-masing 1 menit. Lalu dikeringkan atau ditiriskan pada tissue steril. Potongan buah yang sudah kering, masing-masing di tanam pada media V8 yang merupakan media selektif untuk *P. palmivora*. Kemudian diinkubasikan selama 4-7 hari sampai patogen tumbuh pada media biakan. Koloni yang diduga *P. palmivora* berdasarkan ciri morfologi dimurnikan pada media yang baru. Jamur yang telah dimurnikan kemudian diidentifikasi berdasarkan bentuk makroskopis dan mikroskopis merujuk pada pustaka yang menunjukkan ciri *P. palmivora* yaitu berdasarkan buku panduan identifikasi *Practical guide to detection and identification of Phytophthora* (Drenth and Sendall, 2001). Biakan murni *P. palmivora* digunakan sebagai sumber inokulum uji antagonis.

3.4.2 Eksplorasi Jamur Endofit Tanaman Kakao

Pengambilan Sampel Daun, Batang, Akar, dan Buah

Pengambilan sampel jamur endofit pada daun, batang, akar, dan buah tanaman kakao menggunakan metode diagonal. Pengambilan sampel tanaman yang teletak pada posisi garis diagonal, sehingga didapatkan 5 tanaman dalam satu lahan pertanaman. Sampel yang diambil yaitu tanaman yang sehat, yaitu tidak menunjukkan gejala serangan hama dan penyakit tanaman.

Pada sampel daun diambil 2 srata yaitu daun muda dan daun tua secara acak. Untuk bagian batang, diambil batang bagian atas dan batang bagian bawah.

Pada buah, diambil sampel buah yang berukuran antara 17-21 cm. Dan pada akar diambil pada kedalaman 30 cm dibawah permukaan tanah.

Isolasi Jamur Endofit

Isolasi jamur endofit dilakukan dengan mencuci bagian permukaan daun, batang, buah dan akar dengan alkohol dan aquades agar steril dari jamur luar sehingga jamur yang tumbuh diharapkan dari dalam jaringan daun, batang, buah dan akar tanaman kakao. Kemudian berasal sampel daun, batang, buah dan akar dipotong sepanjang \pm 4-5 cm. Potongan daun, batang, buah dan akar di sterilkan dengan cara dicuci ke dalam larutan NaOcl 2% selama 1 menit dan selanjutnya direndam alkohol 96% selama 1 menit diulang 1 kali. Setelah itu dibilas dengan aquades 1 menit dan diulang 2 kali, kemudian daun, batang, buah dan akar dikeringkan diatas *tissue* steril.

Setelah kering, pada daun, batang, buah dan akar dipotong kembali dengan menggunakan gunting steril untuk menghilangkan bagian tepi dari akar, daun, batang dan buah agar jaringan pada akar, batang, daun, dan buah kakao terbuka. Selanjutnya ditanam ke media PDA didalam cawan petri. Pada aquades bilasan terakhir diambil \pm 2 ml dan dituang ke dalam media PDA yang baru untuk digunakan sebagai kontrol dan berfungsi menentukan apakah sampel yang diisolasi merupakan jamur endofit atau bukan. Jika pada media kontrol tumbuh jamur, maka sampel isolasi daun, batang, buah dan akar di media bukan merupakan jamur endofit. Untuk pengamatan dilakukan 2 hari sekali selama jamur endofit tampak tumbuh.

Pemurnian

Pemurnian dilakukan pada semua koloni jamur yang tumbuh dan dianggap berbeda berdasarkan warna dan bentuk koloni jamur endofit tersebut. Masing-masing jamur yang berbeda dipisah dan dipindah ke dalam media PDA yang baru dengan menggunakan *cork borer* dan jarum ose. Hal ini dilakukan secara terus menerus hingga mendapatkan isolat jamur endofit yang murni.

Pembuatan Preparat Jamur

Pembuatan preparat dilakukan untuk mengidentifikasi jamur endofit yang ditemukan. Hal pertama yang dilakukan adalah menyiapkan kaca preparat yang telah dibersihkan dan mengambil sedikit media PDA yang baru dengan menggunakan jarum ose dan diletakkan di permukaan preparat. Selanjutnya mengambil jamur dengan menggunakan jarum ose dan diletakkan pada preparat yang terdapat media PDA dan ditutup dengan menggunakan *cover glass*. Kemudian preparat diletakkan di dalam wadah yang berisi tissue steril yang basah dan diinkubasi selama $\pm 2-3$ hari.

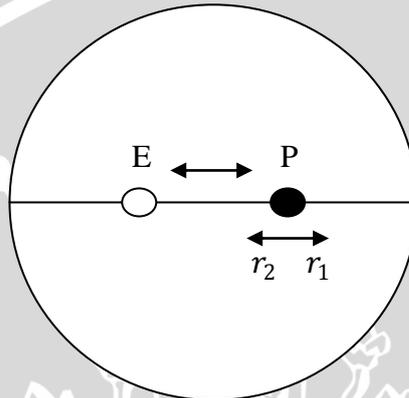
Pengamatan dan Identifikasi

Isolat jamur endofit yang dimurnikan, diamati secara makroskopis dan mikroskopis. Hasil pengamatan digunakan untuk identifikasi berdasarkan panduan buku identifikasi *Illustrated Genere of Imperfect Fungi fourth ed* (Barnet and Hunter, 1960). Gandjar *et al.* (1999) menyatakan pengamatan makroskopis meliputi warna dan tekstur koloni (granular, seperti tepung, menggunung, licin, ada tidaknya tetesan eksudat), ada atau tidak garis-garis radial dari pusat koloni ke arah tepi koloni, ada atau tidak lingkaran-lingkaran konsentris dan *Reverse side* (warna sebalik koloni). Pada pengamatan mikroskopis meliputi hifa bersekat atau tidak, pertumbuhan hifa (bercabang atau tidak bercabang), warna hifa dan konidia (gelap atau hialin transparan), konidiofor (bentuk, bersekat atau tidak, bercabang atau tidak, warna), ada tidaknya konidia dan bentuk konidia (bulat, lonjong, berantai atau tidak beraturan).

3.4.3 Uji Antagonis Isolat Jamur Endofit dengan Jamur *P. palmivora*

Pengujian isolat jamur endofit dilakukan dengan menggunakan metode oposisi langsung, yaitu dengan menumbuhkan isolat jamur *P. palmivora* dengan isolat jamur endofit secara berhadapan dengan jarak 3 cm dalam cawan petri yang berisi media PDA yang berdiameter 9 cm. Selanjutnya di inkubasi selama 7 hari dengan suhu 28-30⁰C. Metode ini berfungsi untuk mengetahui ada atau tidaknya daya hambat serta besarnya hambatan isolat jamur endofit terhadap pertumbuhan *P. palmivora* di dalam media PDA.

Perlakuan uji antagonis ini dilakukan sebanyak jamur endofit yang ditemukan dan dilakukan ulangan sebanyak tiga kali ulangan. Ulangan tersebut bertujuan untuk memastikan bahwa jamur endofit memiliki potensi untuk mencegah pertumbuhan patogen *P. palmivora*. Hal ini dibandingkan dengan kontrol yaitu meletakkan isolat jamur *P. palmivora* di dalam media PDA.



Gambar 3. Uji Antagonis Dengan Metode Oposisi Langsung

Perhitungan uji antagonis dengan menggunakan metode oposisi langsung

menggunakan rumus berikut ini :
$$I = \frac{R1 - R2}{R1} \times 100$$

Keterangan:

- I = Presentase penghambatan.
- R1 = Jari-jari koloni pathogen yang arah pertumbuhannya berlawanan dengan jamur endofit.
- R2 = Jari-jari koloni pathogen yang arah pertumbuhannya mendekati koloni jamur antagonis.

3.5 Analisis Data

Data yang diperoleh dari uji antagonis jamur endofit dengan *P. palmivora* di analisis dengan Uji Duncan pada taraf 5%, bertujuan untuk membandingkan daya tumbuh *P. palmivora* yang di uji antagonis dengan *P. palmivora* kontrol sehingga dapat mengetahui potensi antagonis jamur endofit.