

III. BAHAN DAN METODE

3.1. Tempat dan Waktu

Penelitian telah dilaksanakan di Laboratorium Penyakit Tumbuhan dan Kebun Percobaan Fakultas Pertanian Universitas Riau kampus Bina Widya jalan H.R Subrantas km 12,5 Simpang Baru Panam Pekanbaru dimulai dari Januari 2009 sampai dengan Juli 2009.

3.2. Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman Anggrek *Dendrobium* yang berumur \pm 3 bulan, media tanam *cocopeat* dan cacahan arang, pot tanah liat ukuran diameter 15 cm, isolat *Trichoderma* sp (*Trichoderma harzianum* dari rhizosfer tanaman sawi, *Trichoderma koningii* dari rhizosfer tanaman karet, *Trichoderma viride* dari rhizosfer tanaman bayam dan *Trichoderma* sp dari rhizosfer tanaman anggrek) (Lampiran 4)}, medium PDA (*Potato Dextrose Agar*), medium PDB (*Potato Dextrose Broth*), bagian tanaman anggrek yang bergejala busuk hitam oleh *Phytophthora* sp, aquades steril, alkohol 70%, spiritus, *aluminium foil*, tissue gulung, kertas label, plastik, kertas saring *whatman*, jagung pipilan, kantong plastik tahan panas, *polynet*, kertas millimeter, dan pupuk Decastar Plus (18:9:10).

Alat-alat yang digunakan adalah cawan petri berdiameter 9 cm, tabung reaksi, rak tabung reaksi, gelas piala 2000 ml, erlenmeyer 250 ml, gelas ukur, batang pengaduk, pipet tetes, jarum oose, *cork borer*, *autoclave*, *incubator*, *hand sprayer*, *laminar airflow cabinet*, *automatic mixer*, *orbital shaker*, sentrifius, kompor gas, timbangan analitik,



lampu spritus, *object glass*, *cover glass*, kuas steril, mikroskop, termometer, haemasytometer dan buku identifikasi “*A Revision of the Genus Trichoderma*” (Rifai,1969) dan “Kumpulan Jurnal Phytophthora” terbitan The American Phytopathological Society (1983).

3.3. Metode Penelitian

Penelitian dilakukan secara eksperimen dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri dari 5 perlakuan dan 4 ulangan. Satu unit percobaan terdiri dari 2 sampel sehingga pada penelitian ini secara keseluruhan terdapat 40 unit percobaan. Perlakuannya adalah penggunaan beberapa isolat *Trichoderma* sp sebagai berikut:

T0= tanpa pemberian isolat *Trichoderma* sp

T1= isolat *Trichoderma* sp (T-ag) dari rhizosfer anggrek

T2= isolat *Trichoderma harzianum* (T-sa) dari rhizosfer tanaman sawi

T3= isolat *Trichoderma koningii* (T-k) dari rhizosfer tanaman karet

T4= isolat *Trichoderma viride* (T-b) dari rhizosfer tanaman bayam

Data yang diperoleh dianalisis secara statistik dengan menggunakan sidik ragam dan dilakukan uji lanjut dengan menggunakan Metode Ortogonal Kontras (MOK) dengan 4 pembandingan yaitu:

1. Perlakuan T0 vs T1, T2, T3, T4
2. Perlakuan T1 vs perlakuan T2, T3, T4
3. Perlakuan T3 vs perlakuan isolat T-sayuran (T2 dan T4)
4. Perlakuan T2 vs perlakuan T4

Model linear rancangan yang digunakan adalah:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \epsilon_{ij}$$

Dimana:

Y_{ij} = hasil pengamatan pada suatu unit percobaan dalam perlakuan ke i yang mendapat ulangan ke j

μ = nilai tengah umum

τ_i = pengaruh isolat *Trichoderma sp*

ϵ_{ij} = pengaruh galat percobaan pada perlakuan ke i dan ulangan ke j

3.4. Pelaksanaan

3.4.1. Di Laboratorium

3.4.1.1. Persiapan Isolat Jamur Antagonis *Trichoderma sp*

Tiga isolat yang digunakan dalam penelitian yaitu isolat *T. Harzianum* (T-sa), *T.koningii* (T-k), dan *T. viride* (T-b) berasal dari koleksi Laboratorium Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Riau yang telah disimpan \pm 3 tahun dalam PDA miring. Isolat T-ag diisolasi dari media pertanaman anggrek yang diambil di salah satu *nursery* tanaman hias di jalan Arifin Ahmad Pekanbaru. Sampel diisolasi dengan metode pengenceran. Sampel media anggrek dihaluskan dan dimasukkan 10 g ke dalam erlenmeyer 250 ml yang berisi aquades steril sebanyak 90 ml dan dicampur rata kemudian dikocok sampai homogen dengan *automatic mixer* dengan kecepatan 180 rpm selama 15 menit. Selanjutnya 1 ml dari suspensi dipindahkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 ml aquades steril sehingga didapatkan pengenceran 10^{-1} , kemudian dilakukan seterusnya hingga pengenceran 10^{-6} dan kemudian diaduk dengan *automatic*

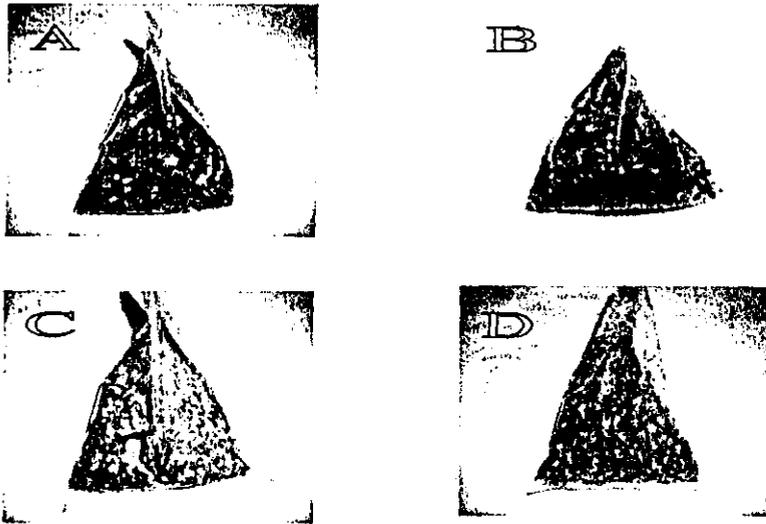


mixer selama 1 menit. Kemudian hasil pengenceran dimasukkan ke dalam cawan petri ditambahkan 15 ml medium PDA cair, lalu digoyang sampai homogen dan diinkubasi pada temperatur kamar untuk mendapatkan isolat murninya. Tiga hari kemudian diamati koloni yang muncul, apabila belum didapat isolat murninya dilakukan isolasi kembali sampai didapatkan isolat murninya. Isolat kemudian diidentifikasi sesuai dengan ciri-ciri jamur *Trichoderma* sp yaitu warna koloni kekuningan, kuning atau hijau, dan bentuk koloni yang kompak (Rifai, 1969). Kemudian isolat murni *Trichoderma* sp tersebut dipindahkan ke medium PDA miring untuk penyimpanan dan sebagai stok untuk perbanyak.

3.4.1.2. Perbanyak dan Pembuatan Starter *Trichoderma* sp

Isolat *Trichoderma* sp diisolasi kembali dengan memindahkan hifa yang tumbuh pada medium PDA dalam cawan petri dengan menggunakan jarum ose yang telah disterilkan dengan cara pemijaran dan didinginkan yang dilakukan dalam ruangan isolasi.

Biakan murni tersebut diperbanyak lagi ke dalam erlenmeyer 250 ml yang berisi PDA sebanyak 50 ml dan diinkubasi selama 7 hari. Untuk mendapatkan suspensi konidia dilakukan dengan menambahkan 15 ml aquades steril ke dalam biakan *Trichoderma* sp yang berada di dalam erlenmeyer, kemudian dilepaskan dengan menggunakan kuas steril. Perbanyak *Trichoderma* sp dilakukan dengan mengambil 1 cc suspensi konidia dan diinokulasikan ke dalam medium jagung (25 g) kemudian diinkubasi selama 14 hari (komposisi dan cara kerja terlampir pada Lampiran 3).



Gambar 2. Starter *Trichoderma* sp
 Keterangan: A: Starter T-ag
 B: Starter T-sa
 C: Starter T-k
 D: Starter T-b

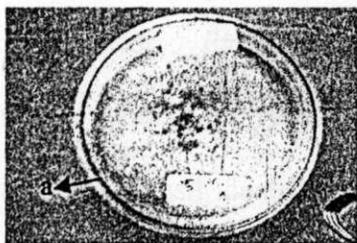
3.4.1.3. Persiapan Isolat Jamur Patogen *Phytophthora* sp

Isolat *Phytophthora* sp diperoleh dengan cara mengisolasi dari daun tanaman anggrek yang terserang. Tahap awal proses isolasi adalah membuat *moist chamber* yang bertujuan untuk menumbuhkan miselium pada bagian yang terserang. Daun anggrek yang bergejala dicuci dengan air mengalir kemudian diiris dengan mengambil setengah bagian yang sakit dan setengah bagian yang sehat dengan ukuran 1x1 cm. Daun yang telah diiris disterilisasi permukaan dengan direndam dalam aquades steril lalu merendamnya di dalam alkohol 70%, kemudian dibilas lagi dengan aquades steril sebanyak 2 kali, setelah itu daun diletakkan pada cawan petri yang telah dilapisi 3 helai kertas saring lembab. Tiap cawan petri diletakkan 4 irisan daun anggrek yang disusun terpisah. Inkubasi dilakukan di dalam inkubator pada suhu kamar selama 1 minggu.

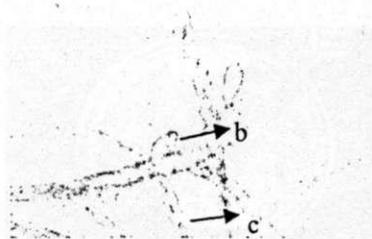
Jamur yang tumbuh diisolasi pada media PDA dan diinkubasi selama 1 minggu. Jika hasil isolasi pertama belum murni lakukan isolasi kembali pada PDA hingga didapat isolat murni.

Hasil dari isolasi ini kemudian diidentifikasi secara makroskopis dan mikroskopis untuk memastikan isolat yang didapat benar merupakan jamur *Phytophthora* sp. Ciri-ciri jamur *Phytophthora* sp dapat dilihat pada Gambar 3 dan Tabel 1.

- A. Identifikasi *Phytophthora* sp secara makroskopis



- B. Identifikasi *Phytophthora* sp secara mikroskopis



Gambar 3. Identifikasi jamur *Phytophthora* sp

A: Identifikasi *Phytophthora* sp secara makroskopis

B: Identifikasi *Phytophthora* sp secara mikroskopis

Keterangan a: biakan murni *Phytophthora* sp di dalam petridis
b: sporangium
c: hifa

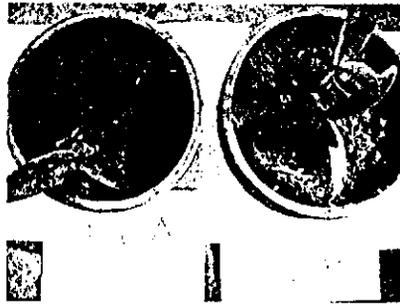
Tabel 1. Hasil pengamatan makroskopis dan mikroskopis jamur *Phytophthora* sp

Pengamatan	Hasil pengamatan
Makroskopis 1. warna koloni 2. arah pertumbuhan koloni	Putih Kesamping dengan penebalan pada bagian tengah
Mikroskopis 1. hifa 2. miselium 3. sporangium	Berwarna hialin, tidak bersekat tidak beraturan Berbentuk seperti buah pear

Identifikasi *Phytophthora* sp dilakukan dengan mengacu pada literatur dari “Kumpulan Jurnal Phytophthora” terbitan The American Phytopathological Society (1983). Hasil identifikasi menunjukkan 2 variasi makroskopis (Gambar 4) dan selanjutnya digunakan untuk uji patogenesis untuk mendapatkan isolat yang lebih virulen.

Gambar 4. Variasi jamur *Phytophthora* sp, A: A5 (P A) dan B: A3 (P B) (9 hsi)

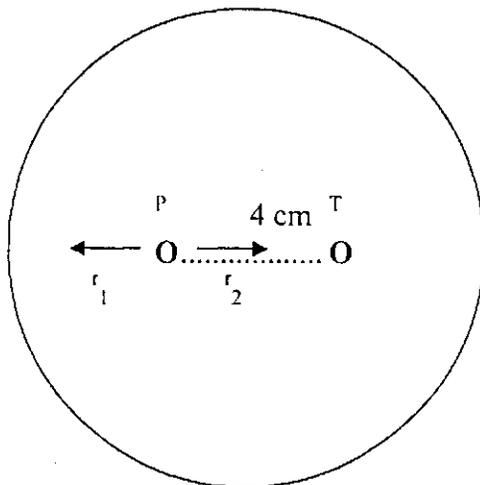
Kedua isolat tersebut diinokulasikan masing-masing pada 5 sampel tanaman angrek. Setelah 12 hari variasi jamur *Phytophthora* sp (P A) memberikan hasil bahwa isolat jamur *Phytophthora* sp (P A) dapat menyebabkan intensitas serangan hingga 100% (Gambar 5). Isolat ini kemudian digunakan sebagai sumber inokulum dalam penelitian.



Gambar 5. Hasil uji patogenesis variasi *Phytophthora* sp (13 hsi)

3.4.1.4. Uji Antagonis

Pengujian antagonis *Trichoderma* sp terhadap *Phytophthora* sp yaitu dengan menggunakan biakan ganda (Sinaga, 1995 dalam Siregar, 2008). Potongan biakan jamur patogen dan jamur antagonis yang berumur 7 hari yang berdiameter 0,5 cm dibiakkan secara bersama-sama dalam satu cawan petri yang berisi PDA dengan jarak 4 cm (Gambar 6). Biakan tersebut diinkubasi selama 7 hari pada suhu kamar (28-30°C).



Gambar 6: Pengujian antagonis dengan metode biakan ganda

P = potongan biakan koloni jamur patogen *Phytophthora* sp

T = potongan biakan koloni jamur antagonis *Trichoderma* sp

r_1 = jari-jari koloni patogen yang menjauhi jamur antagonis *Trichoderma* sp

r_2 = jari-jari koloni patogen yang mendekati jamur antagonis *Trichoderma* sp

3.4.1.5. Pelaksanaan Pengujian Zona Bening Pada Media PDA

Biakan murni *Trichoderma* sp dan *Phytophthora* sp yang berumur 7 hari diambil dari medium tumbuhnya (PDA) dengan cara menambahkan 10 ml aquades steril pada biakan, kemudian hifanya dipisahkan dari medium PDA secara perlahan dengan menggunakan kuas steril kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi steril, lalu dikocok sampai homogen dengan menggunakan *automatic mixer* dengan kecepatan 180 rpm selama 10 menit. Setelah itu masing-masing suspensi dimasukkan kedalam 5 erlenmeyer 250 ml yang telah berisi medium PDB sebanyak 50 ml dan diinkubasi selama 7 hari pada *orbital shaker* dengan kecepatan 150 rpm pada suhu kamar (28-30⁰C). Setelah diinkubasi, suspensi disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Supernatan dari *Phytophthora* sp sebanyak 1 ml dimasukkan ke dalam cawan petri yang telah berisi 15 ml PDA cair dengan suhu 45-50⁰C, kemudian diratakan dengan cara digoyang hingga homogen dan dibiarkan hingga padat. Kertas *whattman* steril ukuran 5 mm dicelupkan pada supernatan isolat *Trichoderma* sp dan diletakkan di atas medium PDA yang telah padat tersebut, kemudian diinkubasi sampai adanya zona bening disekitar kertas *whattman* dan diukur diameternya dengan kertas millimeter.

3.4.1.6. Persiapan Pot dan Medium Tanam

Pot tanah liat dan media (cocopeat dan cecahan arang) disterilkan dengan cara mengukusnya di dalam dandang yang telah berisi air dan dipanaskan pada nyala api kompor hingga mendidih. Sterilisasi ini dilakukan selama 1 jam setelah air mendidih kemudian didinginkan. Medium anggrek yang telah steril dimasukkan ke dalam pot dengan perbandingan 2:1.

3.4.2. Di Lapangan

3.4.2.1. Pembuatan Rak dan Naungan

Lahan yang akan digunakan untuk penelitian dibersihkan dari gulma, kotoran dan sampah-sampah. Kemudian untuk tempat peletakannya dibuatkan rak kayu berbentuk persegi panjang dan diberi naungan pada ketinggian 170 cm dengan menggunakan paranet yang memiliki daya naung sebesar 50 % pada bagian atas dan sekeliling rak.

3.4.2.2. Infestasi Jamur *Trichoderma* sp

Starter inokulum *Trichoderma* sp sebanyak 25 g (Brilliani, 2007) dicampur dengan medium tumbuh (cocopeat) dan diinkubasi selama 4 minggu (Gambar 7). Pengadukan dan penyiraman dilakukan selama masa inkubasi dan pada akhir masa inkubasi dilakukan penanaman.



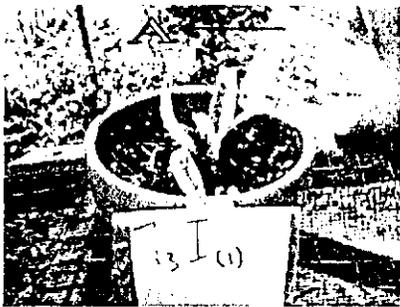
Gambar 7. Infestasi jamur *Trichoderma* sp
Keterangan: A: Infestasi jamur *Trichoderma* sp
B: Proses pengadukan jamur *Trichoderma* sp

3.4.2.3. Penanaman Bibit Anggrek

Penanaman bibit anggrek dilakukan pada minggu ke 3 setelah infestasi jamur *Trichoderma* sp pada medium. 1/3 bagian pot diisi dengan media cocopeat yang telah diinfestasikan jamur *Trichoderma* sp dan 1/3 lagi dengan cacahan arang. Kemudian diletakkan bibit anggrek dan ditutup dengan cocopeat hingga memenuhi pot (Agromedia, 2006).

3.4.2.4. Inokulasi Jamur *Phytophthora* sp Pada Medium Tanaman Anggrek

Inokulasi dilakukan pada saat penanaman dengan cara menginokulasikan suspensi jamur *Phytophthora* sp sebanyak 20 ml suspensi dengan kerapatan 1×10^7 zoospora pada medium tanam (Weste, 1983) yang dihitung dengan menggunakan *haemasytometer*.



Gambar 8. Inokulasi Jamur *Phytophthora* sp pada medium tanaman anggrek
Keterangan: a: gelas piala yang berisi suspensi jamur *Phytophthora* sp sebanyak 20 ml

3.4.2.5. Pemeliharaan

Pemeliharaan yang dilakukan adalah penyiraman dan pemupukan pada tanaman anggrek. Frekuensi penyiraman bergantung pada kondisi cuaca. Penyiraman dilakukan dengan cara penyemprotan dengan menggunakan *hand sprayer* pada sore hari setelah pukul 18.00-19.00 WIB. Penyiraman tidak dilakukan apabila hari hujan.

Pemeliharaan lain yang dilakukan adalah pemupukan dengan menggunakan pupuk anorganik Decastar Plus (18:9:10). Pemberian pupuk Decastar Plus hanya dilakukan 1 kali yaitu pada saat penanaman saja karena merupakan pupuk majemuk yang penyediaan haranya terkendali dalam waktu yang cukup lama.

3.5. Pengamatan

3.5.1. Di Laboratorium

3.5.1.1. Persentase Penghambatan Jamur *Trichoderma* sp terhadap *Phytophthora* sp (%)

Persentase penghambatan dihitung menurut rumus:

$$P = \frac{r_1 - r_2}{r_1} \times 100\%$$

Keterangan:

P = persentase penghambatan

r_1 = jari-jari koloni jamur patogen *Phytophthora* sp yang menjauhi jamur uji *Trichoderma* sp (mm)

r_2 = jari-jari koloni jamur patogen *Phytophthora* sp yang mendekati jamur uji *Trichoderma* sp (mm)

3.5.1.2. Uji Zona Bening (mm²)

Pengamatan dilakukan setelah adanya zona bening (7 hari setelah isolasi) di sekitar kertas *whatman* dan diukur luasnya dengan menggunakan rumus lingkaran yaitu:

$$L = \pi r^2$$

Keterangan:

L = luas lingkaran yang membentuk zona bening

π = 3,14 (konstanta)

r = jari-jari lingkaran yang terbentuk oleh zona bening

3.5.2.1. Munculnya Gejala Awal (Masa Inkubasi)

Pengamatan dilakukan mulai dari inokulasi jamur *Phytophthora* sp hingga munculnya gejala awal pada daun yaitu dengan adanya noda-noda hitam (Gambar 9).

Pengamatan dilakukan pada masing-masing perlakuan dan ulangan.



Gambar 9. Gejala serangan awal *Phytophthora* sp pada tanaman anggrek
Keterangan: A: bagian yang menunjukkan gejala awal oleh *Phytophthora* sp

3.5.2.2. Intensitas Serangan Jamur *Phytophthora* sp (%)

Pengamatan intensitas serangan patogen dilakukan pada akhir penelitian. Rumus intensitas serangan adalah:

$$I = \frac{\sum (v_i \times n_i)}{Z \times N} \times 100\%$$

Keterangan :

I = intensitas serangan

n_i = banyak daun yang diamati tiap kategori serangan.

v_i = nilai skala kerusakan dari tiap kategori serangan

Z = nilai skala kerusakan tertinggi dari tiap kategori serangan

N = banyak daun yang diamati

Nilai kategori serangan ditentukan berdasarkan nilai skala 0-4 (Jhon,1999 dalam Abbas dkk, 1989)

Nilai kategori serangan ditentukan berdasarkan nilai skala 0-4 (Jhon, 1999 dalam Abbas dkk, 1989)

- 0 = daun tanaman bebas dari serangan (tidak ada bercak)
- 1 = terdapat bercak 0-25% pada daun
- 2 = terdapat bercak >25-50% pada daun
- 3 = terdapat bercak >50-75% pada daun
- 4 = terdapat bercak >75% pada daun

3.5.2.3. Populasi *Trichoderma* sp Pada Medium Tumbuh (Propagul/g medium)

Pengamatan populasi *Trichoderma* sp dilakukan 3 kali yaitu pada saat penanaman, umur 2 dan 4 minggu setelah inokulasi jamur patogen dari medium tumbuh tanaman. Medium yang diambil dari masing-masing perlakuan dicampur menjadi satu dan diaduk rata agar homogen. Populasi propagul dihitung dengan menggunakan metode pengenceran seri yaitu dengan memasukkan 10 g sampel ke dalam erlenmeyer 250 ml yang berisi 90 ml aquades steril. Kemudian dikocok dengan *automatic mixer* dengan kecepatan 180 rpm selama 15 menit. Kemudian 1 ml suspensi tersebut dipindahkan kedalam tabung reaksi yang berisi 9 ml aquades steril kemudian dikocok dengan *automatic mixer* selama 1 menit, 1 ml dari pengenceran 10^{-7} dimasukkan ke dalam cawan petri yang telah berisi medium PDA cair sebanyak 15 ml dengan suhu $45-50^{\circ}\text{C}$ dan diinkubasi selama 2-3 hari. Jumlah populasi jamur *Trichoderma* sp setiap gram medium dihitung dengan menggunakan rumus (Heer, 1959 dalam Sitepu, 1997):

$$A = \frac{k(100 + KA) \times P}{100}$$

Keterangan:

- A = jumlah propagul jamur/g medium
 k = jumlah koloni/petri
 KA = kadar air bahan
 P = pengenceran

Data populasi *Trichoderma* sp pada medium tidak dianalisis secara statistik dengan menggunakan sidik ragam dan tidak dilakukan uji lanjut.

3.5.3. Pengamatan Tambahan

3.5.3.1. Pengukuran Suhu dan Dalam Naungan ($^{\circ}\text{C}$)

Pengamatan tambahan yang dilakukan adalah pengamatan terhadap suhu harian di lokasi penelitian dengan menggantungkan termometer di bagian tengah dalam naungan. Pengukuran suhu dilakukan setiap hari yaitu pada pukul 07.00 WIB, 12.00 WIB, dan 17.00 WIB, dan dihitung suhu rata hariannya (T_r) dengan rumus:

$$T_r = \frac{(2 \times t \text{ pagi}) + t \text{ siang} + t \text{ sore}}{4}$$

3.5.3.2. Pengukuran Kelembaban Dalam Naungan (%)

Pengukuran kelembaban dilakukan di dalam naungan dengan menggunakan alat hygrometer yang digantung pada bagian tengah di dalam naungan. Pengukuran dilakukan setiap hari bersamaan dengan pengukuran suhu harian dan pengukuran rata hariannya menggunakan rumus yang sama dengan perhitungan suhu rata harian.