

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Tempat dan waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Fitopatologi Balai Penelitian Tanaman Industri dan Penyegar Kabupaten Sukabumi Jawa Barat yang dilakukan mulai bulan April hingga bulan Mei tahun 2021.

3.2. Alat dan bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya: tabung reaksi, gelas kimia, gelas ukur, *erlenmeyer*, cawan petri, korek api, bunsen, jarum ose, skalpel, *cutter*, silet, spatula, pipet volume, kaca objek, *deck glass*, *magnetic stirrer*, *hot plate*, *autoclave*, *oven*, *laminar air flow* (LAF), mikroskop binokuler beserta kamera mikroskop dan komputer, timbangan analitik, penggaris, spidol dan tusuk gigi steril.

Adapun bahan yang digunakan yaitu: entres batang tanaman kopi robusta sehat, jaringan tanaman bergejala, isolat *T. asperellum* dan *T. viride*, aquades, media PDA (sari pati kentang, glukosa, agar, streptomycin), media WA (*Water Agar*), *tissue* steril, kapas, aluminium foil, plastik tahan panas, plastik wrap, kertas saring, spiritus dan alkohol.

3.3. Metode penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif untuk mengidentifikasi patogen penyakit beserta gejala yang ditimbulkan pada tanaman dan kemudian melakukan pengujian antagonis. Data diperoleh dari hasil pengamatan luas pertumbuhan isolat tunggal dan pengujian antagonis *T. asperellum* dan *T. viride* terhadap patogen penyakit busuk batang setek kopi dengan menggunakan software *ImageJ*. Pengujian antagonis dilakukan secara *in vitro* dengan menggunakan 6 kali ulangan.

3.4. Prosedur penelitian

3.4.1. Sterilisasi alat

Sterilisasi menggunakan beberapa metode menurut Mayasari (2020). Terdapat beberapa teknik sterilisasi alat, yaitu: 1) Pemanasan atau pemijaran dengan api langsung yaitu membakar alat pada api secara langsung. 2) Sterilisasi dengan oven dengan suhu 60 hingga 180°C. 3) Sterilisasi dengan uap air panas bertekanan yaitu menggunakan autoklaf bertekanan 15 psi dan mempunyai suhu 121°C selama 15 menit. 4) Penyinaran Ultraviolet untuk membunuh mikroba yang menempel pada permukaan *interior safety cabinet*. 5) Sterilisasi secara kimiawi biasanya menggunakan senyawa desinfektan, bahan yang sering digunakan yaitu alkohol.

3.4.2. Pembuatan media kultur

Media untuk kultur jamur yang digunakan yaitu media PDA (*Potato Dextrose Agar*) dan WA (*water agar*). Media PDA digunakan untuk isolasi dan pemurnian jamur rizosfer serta untuk pengujian pengendalian menggunakan *T. asperellum* dan *T. viride*.

Cara membuat media PDA adalah sebagai berikut: kentang dikupas sebanyak 200 g kemudian dipotong kecil lalu direbus dengan air 1100 mL. Air rebusan kentang disaring dengan kertas saring lalu larutan kentang 1000 mL, 20 g agar, 20 g gula dan 0,05 g streptomycin dimasukkan ke dalam erlenmeyer. Media WA digunakan untuk mengidentifikasi cendawan dan pengamatan mikroskopis. Cara membuat media WA adalah sebagai berikut: Agar sebanyak 20 g dan air sebanyak 1000 mL dimasukkan ke dalam erlenmeyer kemudian diaduk menggunakan *magnetic stirrer* selama 30 menit dengan suhu 80-90°C. Erlenmeyer ditutup menggunakan aluminium foil kemudian diautoklaf selama 15 menit dengan suhu 121°C dengan tekanan 15 psi. Media yang belum padat sebanyak 10 mL dituangkan ke dalam cawan petri dengan keadaan aseptis. Selanjutnya diinkubasi selama 24 jam.

3.4.3. Isolasi mikroorganisme

Pengambilan sampel bergejala nekrosis dilakukan di kebun perbanyakan setek tanaman kopi robusta (*Coffea canephora*) Balai Tanaman Industri dan Penyegar Sukabumi. Jaringan tanaman yang dipilih adalah bahan khas yang mengandung penyakit yang akan diteliti. Jaringan nekrotik yang paling tua harus dihindari. Kemudian dimasukkan ke dalam kantong plastik agar terjaga kelembabannya.

Batang dibersihkan dari tanah yang menempel menggunakan air mengalir, kemudian dimasukkan ke dalam aquades selama 1 hingga 3 menit kemudian dibilas dengan aquades steril sebanyak 3 kali untuk mensterilkan permukaan. Isolasi dilakukan dengan menggunakan isolasi langsung ke medium yaitu bagian jaringan tanaman yang sakit dipotong sebesar ± 5 hingga 10 mm dengan menggunakan skalpel steril atau gunting atau *cutter*. Jaringan tanaman yang sakit diisolasi di atas cawan petri yang berisi media PDA dan dibiarkan tumbuh selama beberapa hari.

3.4.4. Pemurnian cendawan

Media akan ditumbuhi beberapa macam mikroorganisme. Isolat cendawan yang tumbuh pada media kemudian diinkubasi pada suhu 25 hingga 28°C. Pemurnian isolat dilakukan dengan membedakan bentuk warna hifa dan warna miselium. Apabila terdapat cendawan yang tidak sejenis, maka cendawan dimurnikan kembali.

3.4.5. Inokulasi

Batang kopi dibilas dengan aquades mengalir, kemudian diletakkan di dalam cawan petri yang dialasi dua potongan sedotan dan tisu steril yang telah dibasahi. Pengolesan dengan alkohol dilakukan di sekitar area yang akan diinokulasi, lalu permukaan batang dilukai dengan jarum atau tusuk gigi steril agar mempercepat patogen untuk menginfeksi jaringan tanaman. Potongan isolat cendawan pada media PDA sebesar ± 5 sampai 10 mm diinokulasi pada bagian yang terluka. Sampel dengan perlakuan kontrol hanya diberikan pelukaan pada jaringan tanaman. Banyaknya perlakuan sama dengan banyaknya jenis mikroorganisme yang didapat pada saat proses isolasi dengan pengulangan sebanyak 3 kali.

Sampel yang telah diinokulasi kemudian diinkubasi pada suhu ruangan. Setelah 24 jam inkubasi, dilakukan pengamatan terhadap gejala yang terjadi dan mensinkronkan dengan gejala yang timbul di lapangan yaitu nekrosis pada epidermis batang. Kemiripan gejala yang muncul hasil inokulasi dapat dijadikan sebagai kandidat patogen yang menyebabkan busuk batang pada setek tanaman kopi. Setelah didapat tanaman bergejala dilakukan pengamatan jaringan tanaman.

3.4.6. Reisolasi

Patogen yang telah diidentifikasi dan menunjukkan gejala nekrosis selanjutnya dilakukan isolasi kembali. Gejala yang ditimbulkan pada batang diseleksi berdasarkan kemiripan gejala awal di lapangan. Gejala biasanya disertai tanda khas patogen. Isolasi dilakukan pada jaringan tanaman yang bergejala dengan prosedur yang sama dengan tahap isolasi patogen pada jaringan tanaman. Potongan jaringan tanaman diletakkan pada media PDA kemudian diinkubasi dan dibiarkan tumbuh hingga memenuhi cawan petri. Isolat patogen diperbanyak untuk digunakan dalam pengujian antagonis.

3.4.7. Identifikasi mikroskopis patogen

Pembuatan preparat untuk pengamatan secara mikroskopis binokuler adalah dengan metode Yosmar, Suharti, dan Rasyid (2013) yang telah dimodifikasi sebagai berikut: 1) Medium WA dipotong 1 cm² dari cawan petri dengan silet steril secara aseptis. 2) Masing-masing potongan diletakkan di atas *object glass* steril. 3) Isolat yang telah dikulturkan tersebut ditanam di sisi tengah media. 4) Tutup *object glass* dengan *deck glass*. 5) *Object glass* diletakkan diatas *tissue* yang telah dibasahi dengan aquades steril dalam cawan petri steril. 6) Pengamatan dilakukan dengan cara mengamati ciri morfologi. 7) Ciri morfologi diamati dibawah mikroskop komputer dengan perbesaran 40x, 100x dan 400x. 8) Pengamatan terhadap jamur yaitu bentuk, ukuran, konidia, hifa, dan konidiofor 9) Hasil pengamatan dikomparasikan dengan buku identifikasi jamur *Illustrated Genera of Imperfect Fungi* cetakan keempat oleh Barnett dan Hunter (2006).

3.4.8. Peremajaan isolat patogen, *T. asperellum* dan *T. viride*

Isolat *Trichoderma* diperoleh dari koleksi cendawan laboratorium fitopatologi Balai Penelitian Tanaman Industri dan Penyegar. Peremajaan dan perbanyakannya dilakukan dalam *laminar air flow*. Isolat dipotong sebesar ± 5 sampai 10 mm dan diambil menggunakan jarum ose yang sudah dipanaskan terlebih dahulu atau tusuk gigi steril, kemudian dikulturkan ke dalam media PDA. Isolat diinkubasi dengan inkubator pada suhu ruang sekitar $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm$ selama 7 hari hingga jamur tumbuh memenuhi cawan petri.

3.4.9. Uji patogenisitas *T. asperellum* dan *T. viride*

Cendawan antagonis diuji sifat patogenitasnya untuk mengetahui cendawan berbahaya atau tidak untuk diaplikasikan. Inokulasi dilakukan ke batang kopi yang sehat. Batang diletakkan di atas tissue yang telah dibasahi, kemudian batang kopi dilukai agar mempercepat proses infeksi dengan jarum atau tusuk gigi steril. Langkah uji patogenisitas dilakukan dalam kondisi *aseptic*. Perlakuan dilakukan kepada 3 sampel batang. Cendawan antagonis diinokulasi ke bagian yang dilukai dengan memotong isolat sekitar ± 5 sampai 10 mm. Perlakuan kontrol hanya dilakukan pelukaan pada batang. Gejala yang terjadi diamati selama 5 hari. Cendawan patogen menimbulkan gejala pada bagian yang dilukai. Apabila terdapat gejala selain pada bagian inokulasi, diperkirakan sampel terkontaminasi.

3.4.10. Pertumbuhan isolat tunggal

Isolat *T. asperellum*, *T. viride* dan patogen yang sudah dimurnikan selanjutnya dilakukan pengukuran pertumbuhan miselium cendawan. Isolat yang berumur 7 hari dipotong sebesar 5 mm dikulturkan pada media PDA secara tunggal yang diulangi 6 kali. Pengamatan dilakukan hingga 7 hari atau sampai cendawan memenuhi cawan petri.

3.4.11. Uji antagonis *T. asperellum* dan *T. viride*

Pengujian antagonis *T. asperellum* dan *T. viride* menggunakan metode dua kultur (*dual culture method*) yaitu dengan cara menumbuhkan isolat jamur patogen dengan isolat *T. asperellum* secara berhadapan dengan jarak 3 cm pada cawan petri berdiameter 9 cm yang berisi media PDA secara bersamaan dengan masing-masing

cendawan uji sebesar 5 mm. Pengujian diulangi sebanyak 6 kali. Isolat diinkubasi pada suhu kamar 28 sampai 30°C. Kemudian dilakukan pengamatan selama 7 hari setelah inokulasi dengan mengukur pertumbuhan dan perkembangan isolat patogen. Interaksi dari kedua jamur tersebut dengan mengambil sampel yang berada di tengah perpotongan antara dua jamur yang diamati secara mikroskopis.

3.5. Variabel pengamatan

a. Uji Postulat Koch

Hasil dari isolasi cendawan menghasilkan beberapa isolat cendawan. Keragaman didapatkan dengan mengamati jenis cendawan yang tumbuh pada media PDA saat tahap isolasi dari jaringan tanaman. Keragaman dibedakan dengan mengamati bentuk secara makroskopis yaitu pertumbuhan dasar cendawan, warna hifa dan warna miselium cendawan. Selanjutnya pengamatan terhadap batang kopi sehat yang telah diinokulasi masing-masing cendawan. Selanjutnya dilakukan pengamatan terhadap gejala yang timbul.

Pengamatan gejala dilakukan secara morfologi. Patogen dapat diketahui dengan mengamati gejala dan tanda penyakit yang dapat dilihat secara makroskopis. Beberapa jenis gejala yang ditimbulkan yaitu: hiperplasia, hipoplasia, perubahan warna, kekeringan atau layu, nekrosis dan terdapat tanda di permukaan tanaman.

Gejala penyakit dihubungkan dengan patogen serta karakteristiknya. Pengamatan makroskopis dapat dilihat berdasarkan ciri tampak luar dan dapat dilihat secara langsung seperti warna permukaan, serta bentuk permukaan. Pengamatan ciri patogen dengan menggunakan alat bantu mikroskop diantaranya yaitu bentuk konidia, hifa dan konidiofor cendawan patogen, lalu pengukuran dan pengamatan bentuk ukuran makro dan mikrokonidia. Menurut Achmad dan Maisaroh (2004) pengamatan dilakukan juga terhadap pertumbuhan jamur hingga ke tingkat genus berdasarkan karakter: warna, diameter dan tebal dinding hifa, tipe percabangan hifa, ada tidaknya septa dan sambungan apit (*clamp connection*) serta bentuk, warna dan alat reproduksi jamur.

Hasil pengamatan dikomparasikan dengan buku identifikasi jamur *Illustrated Genera of Imperfect Fungi* cetakan keempat oleh Barnett dan Hunter

(2006) untuk menentukan jamur tersebut termasuk dalam genus tertentu. Hasil gejala dijelaskan dengan metode deskriptif yaitu menguraikan gejala yang timbul dan patogen penyebab busuk batang pada setek tanaman kopi.

b. Gejala awal dan tanda penyakit

Pengamatan dilakukan dengan mencari setek yang bergejala busuk batang pada berbagai tingkat kerusakan. Gejala dapat mudah diketahui dengan mengurutkan tanaman bergejala dari tingkat kerusakan rendah hingga tingkat kerusakan berat. Pengambilan data ditampilkan dalam bentuk gambar (foto) serta diberi penjelasan secara kualitatif.

c. Karakteristik dan uji patogenisitas *T. asperellum* dan *T. viride*

Pengamatan karakteristik dan pengujian patogenisitas bertujuan untuk mengetahui ciri morfologi serta potensi cendawan menimbulkan gejala pada batang dan mengetahui apakah cendawan aman atau tidak apabila dilakukan pengaplikasian di lapangan.

d. Pertumbuhan isolat tunggal

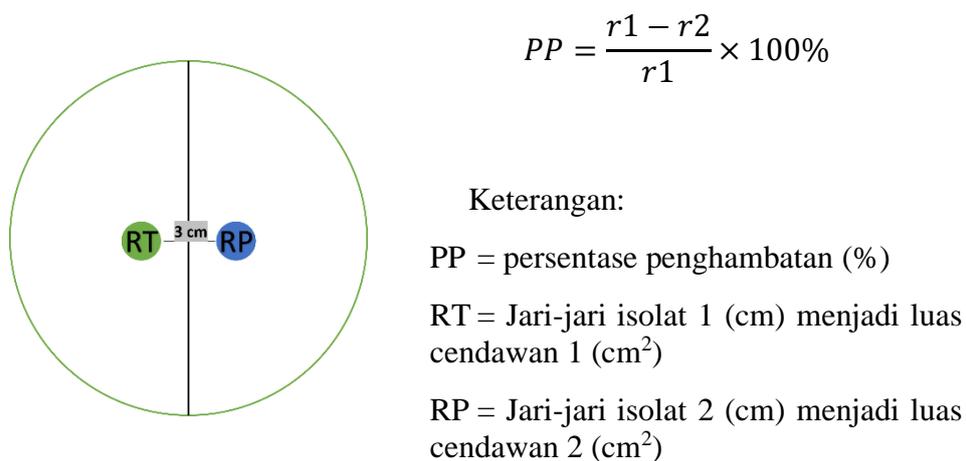
Penghitungan luas pertumbuhan isolat tunggal patogen, *T. asperellum* dan *T. viride* dilakukan untuk mengetahui laju pertumbuhan masing-masing isolat apabila dikulturkan pada media PDA dengan kondisi normal dan tidak ada hambatan dari cendawan yang lain sehingga didapatkan cendawan prioritas dengan pertumbuhan cepat dan mampu menekan cendawan patogen.

e. Persentase hambatan antagonis *dual culture method*

Penghitungan luas dilakukan menggunakan *software ImageJ*. Pengujian antagonis dilakukan untuk mengetahui interaksi antara kedua jenis cendawan. Pengamatan interaksi dilakukan dengan dua cara yaitu makroskopis dan mikroskopis. Pengamatan secara makroskopis yaitu dengan melihat luas *T. asperellum* dan *T. viride* terhadap luas miselium patogen. Pengamatan mikroskopis dilakukan dengan mengamati ujung miselium patogen pada zona hambat. Abnormalitas pertumbuhan miselium cendawan patogen akan berupa pembengkokan ujung miselium dan miselium pecah, miselium berbelah, miselium bercabang, miselium lisis dan miselium tumbuh kerdil (Lorito, *et.al.* 1993).

Selain mengamati interaksi pada zona hambat, hasil penghitungan hambatan kemudian dibandingkan dengan luas pertumbuhan masing-masing isolat yang ditumbuhkan pada media PDA tunggal. Hal ini dapat menjadi indikator keberhasilan cendawan mampu menghambat patogen.

Pengamatan dilakukan dengan menghitung selisih antara luas isolat cendawan antagonis dan luas cendawan patogen. Persentase daya hambat cendawan dapat dihitung menggunakan rumus yang digunakan menurut Rohana (1998) yang dimodifikasi dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Skema *dual culture method*