

III. METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat Pelaksanaan

Penelitian yang berjudul Eksplorasi dan Potensi *Trichoderma harzianum* terhadap Penyakit Hawar Bibit (*Phytophthora palmivora* Butl.) pada Tanaman Kakao (*Theobroma cacao* L.) dilaksanakan pada bulan Januari hingga Juli 2020 di Laboratorium Penyakit dan Rumah kaca/area pembibitan, Kebun Percobaan Kaliwining Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia, Jember.

3.2. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah cawan petri, tabung reaksi, jarum ose, gelas benda, gelas penutup, erlenmeyer, gelas beaker, gelas ukur, corong, mikropipet, pinset, scalpel, bunsen, magnetic stirrer, mikroskop, neraca analitik, hot plate, autoklaf, aluminium foil, penggaris, korek api, hemocytometer neubeur, laminar air flow, alat tulis.

Bahan yang digunakan yaitu benih kakao klon Sul 01 (Sulawesi 01), buah kakao sehat, isolat *T. harzianum*, isolat *P. palmivora*, alkohol 70%, alkohol 96%, aquades, dan media Potato Dextrose Agar (PDA).

3.3. Rancangan Penelitian

Penelitian disusun berdasarkan Rancangan Acak Kelompok faktorial dengan 2 faktor, faktor pertama yaitu kerapatan spora *T. harzianum* dan faktor kedua yaitu lama perendaman benih dengan suspensi *T. harzianum*. Kerapatan spora *T. harzianum* yang digunakan yaitu 10^4 spora/ml (T1), 10^6 spora/ml (T2), dan 10^8 spora/ml (T3) (Sriwati *et al.*, 2015). Sedangkan lama perendaman benih kakao pada suspensi *Trichoderma harzianum* yaitu 1 jam (P1), 2 jam (P2), dan 3 jam (P3).

Sehingga percobaan terdiri dari 9 perlakuan dengan 5 ulangan. Setiap ulangan terdiri dari 5 benih tanaman kakao klon Sul 01. Perlakuan terdiri dari :

T1P1 = Kerapatan spora 10^4 spora/ml dan lama perendaman 1 jam

T1P2 = Kerapatan spora 10^4 spora/ml dan lama perendaman 2 jam

T1P3 = Kerapatan spora 10^4 spora/ml dan lama perendaman 3 jam

T2P1 = Kerapatan spora 10^6 spora/ml dan lama perendaman 1 jam

T2P2 = Kerapatan spora 10^6 spora/ml dan lama perendaman 2 jam

T2P3 = Kerapatan spora 10^6 spora/ml dan lama perendaman 3 jam

T3P1 = Kerapatan spora 10^8 spora/ml dan lama perendaman 1 jam

T3P2 = Kerapatan spora 10^8 spora/ml dan lama perendaman 2 jam

T3P3 = Kerapatan spora 10^8 spora/ml dan lama perendaman 3 jam

Berikut merupakan denah petak perlakuan setelah pengacakan.

T3P1 (5)	T3P3 (4)	T3P2 (2)	T2P2 (3)	T2P1 (5)
T3P1 (4)	T2P3 (2)	T1P3 (3)	T2P3 (5)	T3P2 (1)
T2P3 (1)	T2P1 (4)	T2P2 (4)	T3P3 (2)	T1P3 (2)
T1P1 (5)	T2P2 (1)	T1P2 (2)	T1P1 (4)	T3P3 (5)
T1P3 (5)	T2P1 (3)	T3P1 (2)	T1P2 (4)	T3P1 (1)
T3P2 (4)	T1P2 (1)	T2P2 (2)	T1P3 (1)	T1P2 (5)
T3P3 (1)	T2P1 (1)	T1P1 (3)	T3P1 (3)	T2P3 (3)
T2P1 (2)	T3P2 (3)	T2P3 (4)	T1P3 (4)	T1P1 (1)
T2P2 (5)	T1P1 (2)	T1P2 (3)	T3P2 (5)	T3P3 (3)

Gambar 3. 1. Denah petak perlakuan

Keterangan :

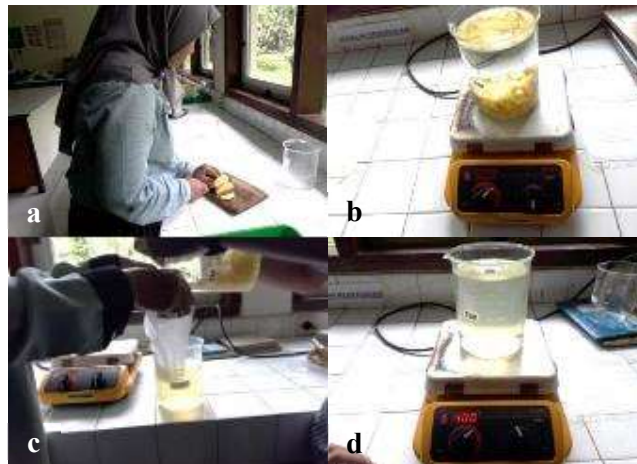
- (1) = ulangan 1
- (2) = ulangan 2
- (3) = ulangan 3
- (4) = ulangan 4
- (5) = ulangan 5

3.4. Pelaksanaan Penelitian

3.4.1. Sterilisasi Alat dan Pembuatan Media

Alat yang disterilisasi antara lain cawan petri, erlenmeyer, dan tabung reaksi, langkah pertama yang dilakukan adalah membungkus cawan petri menggunakan kertas serta menutup erlenmeyer dan tabung reaksi menggunakan kapas, kemudian memasukan air kedalam autoclave sampai batas yang ditentukan lalu memasukan alat yang sudah dibungkus ke dalam Autoclave dengan suhu 121°C serta tekanan 1,5 – 2 atm selama 1 jam.

Media PDA terbuat dari ekstrak kentang, dextrose, dan agar. Ekstrak kentang dibuat dengan memanaskan potongan kentang yang telah dikupas sebanyak 200 gram dengan 1000 ml aquades steril. Sari kentang disaring dan dipanaskan kembali untuk menambahkan agar sebanyak 19 gram dan dextrose sebanyak 19 gram yang selanjutnya diaduk hingga homogen dan jernih. Media yang telah homogen dipindahkan pada erlenmeyer dan disterilkan menggunakan autoclave dengan suhu 121°C dan tekanan 1,5 - 2 atm selama 1 jam.



Gambar 3. 2 Pembuatan media Potato Dextrose Agar

3.4.2. Penyediaan Isolat *Trichoderma harzianum*

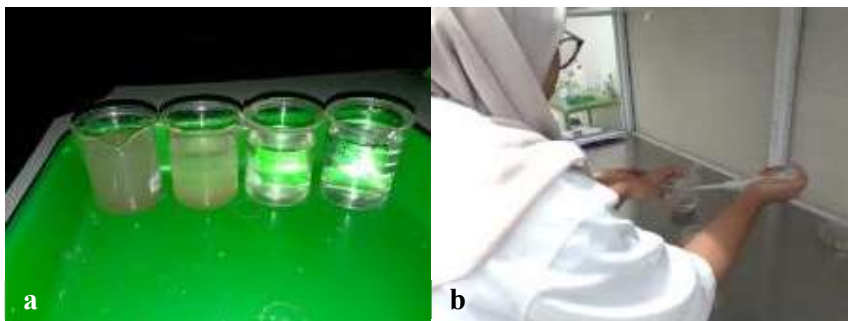
Isolat *T. harzianum* diperoleh dari isolasi tanah yang diambil dari lahan kakao Kebun Percobaan Kaliwining, Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia, Jember. Pengambilan sampel tanah dilakukan pada tanah di sekitar tanaman kakao sehat yang berada di antara tanaman kakao yang menunjukkan gejala serangan *P. palmivora*. Tanah diambil pada beberapa titik di area pertanaman dengan

kedalaman 10-20 cm dari permukaan tanah di sekitar tanaman kakao dan tidak terkena sinar matahari langsung. Sampel tanah yang diambil sebanyak 1 kilogram yang kemudian dihomogenkan.



Gambar 3. 3 Pengambilan sampel tanah untuk mendapatkan isolat *Trichoderma harzianum*

Sampel tanah yang telah dihomogenkan kemudian ditimbang sebanyak 10 gram dan disuspensikan menggunakan 100 ml aquades menggunakan *magnetic stirrer*. Hasil pengenceran yang digunakan merupakan pengenceran 10^{-4} yang kemudian diisolasi pada media PDA lalu diratakan dengan L glass dan diinkubasikan selama 4 hari. Isolat *T. harzianum* yang diperoleh diamati karakter morfologi makroskopis koloninya di media PDA dan mikroskopisnya melalui mikroskop untuk mengetahui bentuk konidianya.



Gambar 3. 4 Isolasi *Trichoderma harzianum* dari sampel tanah. a) pengenceran sampel tanah, b) isolasi pengenceran sampel tanah

Isolat murni *Trichoderma harzianum* selanjutnya diperbanyak pada media beras jagung. Pembuatan media beras jagung dilakukan dengan mengukus jagung giling menggunakan pengukus selama 30 menit. Selanjutnya media beras jagung dimasukkan ke dalam plastik dan disterilkan menggunakan autoclave bersamaan dengan ring besi dan kapas penutup dengan suhu 121°C dan tekanan 1,5 - 2 atm selama 1 jam. Media yang telah disterilkan kemudian didinginkan pada suhu ruang.

Isolat *Trichoderma harzianum* diinokulasikan pada media beras jagung dan diinkubasi selama 7 hari.



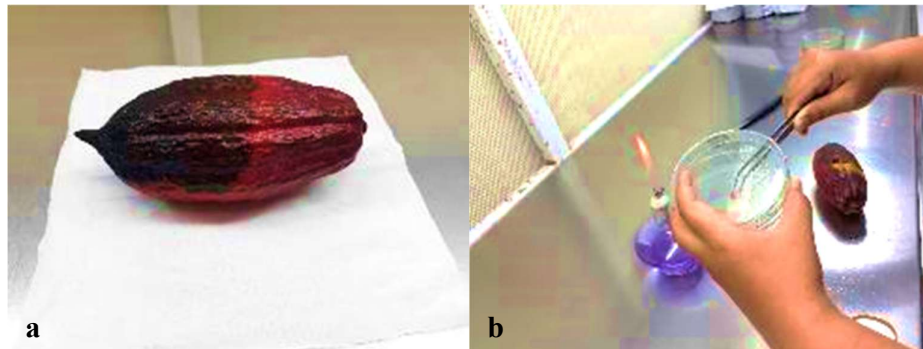
Gambar 3. 5 Perbanyakkan *Trichoderma harzianum* pada media beras jagung. a) sterilisasi alat dan bahan, b) inokulasi *T. harzianum* pada media beras jagung, dan c) hasil inkubasi selama 7 hari

3.4.3. Penyediaan Isolat *P. palmivora*

Isolat *P. palmivora* yang akan digunakan berasal dari buah kakao yang menunjukkan gejala infeksi atau serangan *P. palmivora*. Buah kakao yang terinfeksi kemudian diisolasi di Laboratorium Perlindungan Tanaman, Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia, dengan mengisolasi potongan buah kakao pada batas antara bagian yang sehat dan busuk (Aini, Santoso, dan Sudarsianto, 2016).

Kulit buah kakao disterilkan dengan menyemprotkan alkohol 96% pada kulit buah dan membakar buah selama beberapa detik. Buah yang sudah disterilkan kemudian dikupas untuk memastikan jamur saprofit yang berada pada permukaan kulit buah tidak menjadi kontaminan pada saat isolasi serta untuk melihat bagian buah kakao yang sudah terinfeksi dengan yang masih sehat. Kemudian buah kakao disayat untuk memperoleh potongan antara bagian yang terinfeksi (sakit) dengan yang tidak terinfeksi (sehat) untuk diinokulasikan pada media PDA. Sebelum

diinokulasikan, potongan buah kakao disterilkan menggunakan kloroks 10%, alkohol 10%, dan dibilas dengan aquadest steril untuk mengurangi kontaminan berupa jamur saprofit. Potongan buah yang telah steril kemudian dikeringanginkan di atas kertas tisu steril. Potongan buah kakao yang telah dikeringanginkan, diinokulasikan pada media PDA dan diinkubasi selama \pm 7 hari. Setelah 7 hari dilakukan pengamatan hasil isolasi *P. palmivora* secara makroskopis dan mikroskopis.



Gambar 3. 6 Isolasi *Phytophthora palmivora* dari buah kakao. a) kakao yang menunjukkan gejala busuk buah dan b) inokulasi potongan kulit buah pada media PDA

3.4.4. Pembuatan Media Tanam

Media tanam terdiri dari tanah, pasir dan pupuk kandang dengan perbandingan 1:1:1. Media tanam dicampurkan terlebih dahulu kemudian dimasukkan ke dalam karung dan disterilkan menggunakan autoclave selama 1 jam dengan suhu 121°C dan tekanan 1,5-2 atm untuk mengurangi mikroorganisme pada media tanam. Media dimasukkan ke dalam polybag berukuran 7×25 cm dan diletakkan pada rumah kaca.



Gambar 3. 7 Media tanam steril yang telah dimasukkan ke polybag di rumah kaca

3.4.5. Perlakuan Benih dengan *Trichoderma harzianum* dan Penginokulasian *Phytophthora palmivora* pada Media Tanam

Benih kakao yang digunakan adalah benih kakao klon Sul 01 yang diperoleh dari Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia. Benih kakao yang akan diuji, dikupas dari *pulp* menggunakan serbuk gergajian dicuci hingga bersih dengan air mengalir. Benih yang telah dibersihkan kemudian direndam terlebih dahulu pada aquadest steril selama 24 jam untuk merangsang pertumbuhan radikula pada benih kakao.



Gambar 3. 8 Penyediaan benih kakao. a) Benih yang telah dikupas dan b) benih yang direndam aquadest

Suspensi jamur *Trichoderma harzianum* diambil sebanyak 100 μ l menggunakan mikropipet kemudian diteteskan di atas haemocytometer dan ditutup dengan gelas penutup. Kerapatan konidia diamati di bawah mikroskop binokuler perbesaran 40x. Perhitungan kerapatan dihitung dengan menggunakan rumus

Gabriel dan Riyanto (1989) dalam Ardiyanti, Mudjiono, dan Himawan (2015) sebagai berikut:

$$C = \frac{t}{n \times 0,25} \times 10^6$$

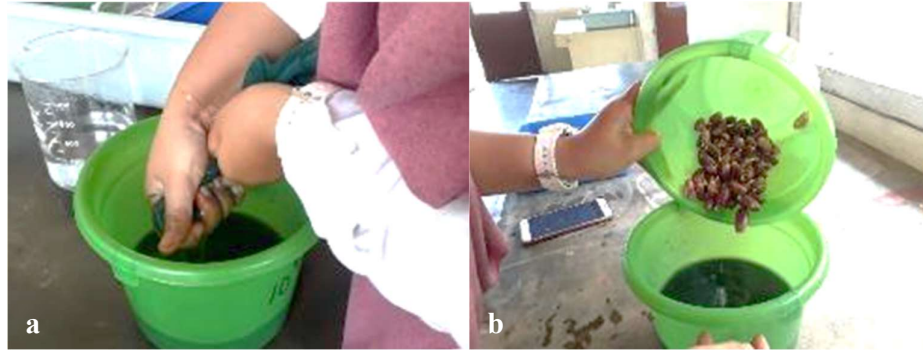
C adalah kerapatan spora per ml larutan, t adalah jumlah total spora dalam kotak sampel yang diamati, n adalah jumlah kotak sampel (5 kotak besar x 16 kotak kecil), dan 0,25 adalah faktor koreksi penggunaan kotak sampel skala kecil pada haemocytometer. Suspensi *Trichoderma harzianum* diperoleh dengan mengencerkan *T. harzianum* yang telah diperbanyak pada media beras jagung selama 7 hari dengan aquadest steril.

Jumlah kerapatan spora *Trichoderma harzianum* yang digunakan yaitu kerapatan 10^4 spora/ml, 10^6 spora/ml, dan 10^8 spora/ml. Hasil perbanyakan *T. harzianum* pada media beras jagung kemudian diencerkan pada 1 liter aquades steril. Standarisasi dan pengenceran dilakukan dengan menggunakan rumus (Ardiyanti, Mudjiono, dan Himawan, 2015) :

$$V1 \times M1 = V2 \times M2$$

V1 adalah volume larutan stok (ml), M1 adalah konsentrasi larutan stok (konidia/ml), V2 adalah volume larutan yang diharapkan (ml) dan M2 adalah konsentrasi larutan yang diharapkan (konidia/ml). Rumus V1 dan V2 diibaratkan sebagai massa *T. harzianum* pada media beras jagung yang akan dilarutkan. Pedoman dari Laboratorium Perlindungan Tanaman Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia menyatakan bahwa untuk mendapatkan 1 liter suspensi *T. harzianum* dengan kerapatan spora 10^8 spora/ml maka diperlukan 150 gram hasil perbanyakan *T. harzianum* media beras jagung

Benih kakao yang telah direndam selama 24 jam dengan aquadest kemudian direndam pada suspensi spora isolat *T. harzianum* dengan konsentrasi 10^4 spora/ml, 10^6 spora/ml dan 10^8 spora/ml dengan lama perendaman 1, 2, dan 3 jam.



Gambar 3. 9 Perlakuan benih kakao dengan suspensi *Trichoderma harzianum*. a) Pembuatan suspensi *T. harzianum* dan b) perendaman benih kakao pada suspensi *T. harzianum*

Isolat *P. palmivora* yang telah diinkubasikan selama 7 hari, miselium dan sporanya dipanen dan disuspensikan dalam aquades steril. Suspensi *P. palmivora* diinokulasikan melalui penuangan suspensi pada media tanam dengan konsentrasi 10^6 spora/ml dan dosis 10 ml suspensi *P. palmivora*/polybag.



Gambar 3. 10 Penuangan suspensi *Phytophthora palmivora* pada media tanam

3.4.6. Pembibitan dan Pemeliharaan Tanaman Kakao

Benih yang telah diberi perlakuan kemudian dikecambahkan pada media tanam di polybag dengan 2/3 bagian benih terbenam di dalam media tanam. Benih yang telah ditanam kemudian disungkup dengan plastik untuk menjaga suhu dan kelembaban udara.

Pemeliharaan dilakukan dengan melakukan penyiraman setiap hari atau sesuai kondisi cuaca (Firdausil, Nusrianti, dan Yani, 2008). Penyiraman dilakukan

pada pagi hari yaitu pukul 07.00 WIB. Untuk mencegah penyebaran *P. palmivora* pada bibit kakao yang lain maka bibit kakao yang diberi perlakuan ditutup menggunakan sungkup plastik transparan. Sungkup dibuka dari pagi hingga sore hari saat tidak hujan.

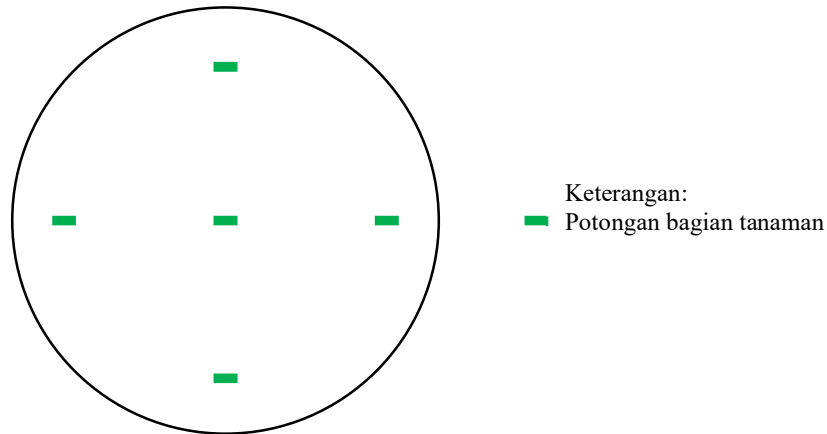


Gambar 3. 11 Penanaman benih kakao setelah perlakuan perendaman dan penyungkupan benih yang telah ditanam

3.4.7. Analisa Presentase Keberadaan *Trichoderma harzianum* pada Jaringan Bibit Kakao

Isolasi jaringan tanaman dilakukan saat bibit kakao berusia 4, 8, dan 12 mst (minggu setelah tanam) untuk mengetahui presentase keberadaan *Trichoderma harzianum* pada bagian tanaman. Tanaman diambil dari setiap perlakuan pada setiap ulangan secara acak.

Isolasi jaringan tanaman dilakukan pada beberapa bagian tanaman kakao, yaitu akar, batang, dan daun. Bagian daun yang digunakan yaitu tulang daun dan helai atau lamina di sekitar tulang daun. Sampel bagian tanaman disterilkan menggunakan kloroks 10%, alkohol 10%, dan aquadest steril dan kemudian dikeringanginkan di atas kertas tisu steril. Sampel bagian tanaman dipotong kurang lebih 1 cm yang kemudian diinokulasikan pada media PDA dan diinkubasikan selama 7 hari. Setiap bagian tanaman diisolasi pada petri yang berbeda.



Gambar 3. 12. Penempatan potongan bagian tanaman pada cawan petri.

3.5. Parameter Pengamatan

A. Persentase Daya Kecambah Benih Kakao (%)

Daya kecambah (%) yaitu banyaknya benih yang berkecambah dari seluruh benih yang dikecambahkan. Persentase daya kecambah dapat dihitung menggunakan rumus (Nengsih, Defitri, dan Levia, 2020):

$$\% \text{Perkecambahan} = \frac{\text{jumlah benih berkecambah normal}}{\text{jumlah benih yang dikecambahkan}} \times 100\%$$

B. Masa Inkubasi (hsi)

Pengamatan masa inkubasi *P. palmivora* pada bibit kakao dilakukan dengan mengamati munculnya nekrosis pada daun atau bercak kecoklatan pada daun dalam satuan hari setelah inokulasi (hsi).

C. Intensitas Penyakit (%)

Pengamatan intensitas penyakit hawar bibit kakao dilakukan pada 7 hari setelah inokulasi *P. palmivora* dengan interval 7 hari selama 12 minggu. Perhitungan intensitas penyakit hawar bibit kakao dihitung menggunakan rumus (Azis, Rosmana, dan Dewi, 2013),

$$IP = \frac{n}{N} \times 100\%$$

IP = Intensitas penyakit (%)

n = jumlah bibit dan gejala penyakit hawar bibit

N = jumlah total benih yang diuji.

D. Tinggi tanaman (cm)

Pengamatan dilakukan dengan mengukur panjang tanaman dari atas permukaan tanah sampai titik tumbuh. Pengukuran dilakukan dengan alat ukur penggaris dalam satuan sentimeter (cm). Pengamatan dilakukan 14 hari atau 2 minggu sekali dimulai sejak bibit berumur 2 mst sampai umur 12 mst.

E. Jumlah daun (helai)

Pengamatan jumlah daun dengan menghitung jumlah flush, daun muda, dan daun tua yang dilakukan dengan interval 14 hari atau 2 minggu sekali dimulai sejak bibit kakao berumur 2 mst sampai 12 mst atau akhir pengamatan intensitas penyakit.

F. Persentase Keberadaan *Trichoderma harzianum* pada Jaringan Bibit Kakao (%)

Persentase keberadaan *T. harzianum* dapat diketahui dengan menghitung jumlah koloni *T. harzianum* yang tumbuh dari masing-masing potongan tanaman yang diinokulasikan. Persentase keberadaan *T. harzianum* dihitung menggunakan rumus :

$$P = \frac{\sum \text{koloni } Trichoderma \text{ yang tumbuh pada bagian tanaman yang diisolasi}}{\sum \text{jumlah bagian tanaman yang diisolasi}} \times 100\%$$

G. Analisa Senyawa Kimia *Trichoderma harzianum*

Analisa senyawa kimia *T. harzianum* dilakukan untuk mengetahui jenis senyawa kimia yang dihasilkan oleh *T. harzianum* yang dapat digunakan untuk menghambat jamur patogen. Senyawa metabolit yang dianalisa antara lain alkaloid, flavonoid, saponin, triterpenoid/steroid, dan tannin (Putri, 2018). Analisa senyawa metabolit sekunder *T. harzianum* dilakukan di Badan Penelitian dan Konsultasi Industri.

3.6. Analisa Data

Data hasil pengamatan dianalisa secara statistik menggunakan percobaan RAK dua faktorial menggunakan SPSS. Untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap penyakit hawar dan pertumbuhan bibit kakao, data yang diperoleh diuji secara statistik dengan analisis ragam (Anova). Apabila uji F menunjukkan pengaruh yang nyata maka dilanjutkan dengan uji lanjutan yaitu Duncan's Multiple Range Test (DMRT) pada taraf nyata 5%.