

## IV. METODE PENELITIAN

### A. Lokasi dan Waktu Penelitian

#### 1. Lokasi

Penelitian dilaksanakan di Balai Penelitian Getas, Salatiga.

#### 2. Waktu

Penelitian dilaksanakan pada bulan November 1994 sampai dengan Juni 1995.

### B. Bahan dan Alat

#### 1. Bahan

Bahan penelitian terdiri dari tanaman karet klon resisten (PR 261), moderat (PR 300), rentan (PR 303) yang berumur lima tahun dalam kebun entres, daun karet yang terserang jamur *C. cassiicola* yang berasal dari Jawa Tengah (Getas) dan Jawa Barat (Bogor), medium agar kentang dekstrosa, label, aquades, alkohol 70%, kertas saring, kantong plastik, kapas, cotton swab.

#### 2. Alat

Alat yang dipergunakan dalam penelitian ini adalah gunting pangkas, inkubator, oven, pemanas, gelas piala, neraca berlengan tiga, pipet, tabung reaksi, cawan petri, autoklaf, pinset, silet, mikrometer okuler dan mikrometer pentas,

mikroskop, jarum ose, penangas air, shaker serta lemari pendingin.

### C. METODE PENELITIAN

#### 1. Penelitian Pendahuluan

##### a. Pembuatan Medium Agar Kentang Dekstrosa

- Semua peralatan yang digunakan dalam isolasi disterilkan dengan menggunakan oven bersuhu  $160^{\circ}\text{C}$  selama 2 jam.
- Kentang yang sudah dikupas dan diiris tipis-tipis sebanyak 200 gr dididihkan dalam 1l aquades sampai kentang menjadi lunak.
- Kemudian disaring dengan penyaring dan ditambah aquades hingga volumenya mencapai 1l lagi.
- Ditambahkan 20 gr dekstrosa dan 17 gr agar.
- Dididihkan di atas pemanas selama 20 - 30 menit sambil diaduk hingga semua agar mencair dan larut.
- Aquades yang hilang selama pemanasan diganti aquades baru sampai volume kembali seperti semula.
- Kemudian dalam keadaan panas medium disaring dengan kapas yang bersih.

- Dengan menggunakan pipet medium dibagi dan dimasukkan ke dalam tabung-tabung reaksi steril. Masing-masing tabung reaksi berisi 12 ml.
- Tabung-tabung reaksi berisi medium tersebut kemudian disumbat dengan kapas.
- Selanjutnya disterilkan dalam autoklaf pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  selama 20 menit.
- Setelah dikeluarkan dari autoklaf, keenam tabung tersebut diletakkan dalam penangas air bersuhu  $50^{\circ}\text{C}$  dan dibiarkan selama 5 menit.
- Kemudian satu persatu tabung berisi medium dituangkan ke dalam cawan petri steril secara aseptik.
- Medium dibiarkan menjadi dingin dan padat.
- Pada permukaan luar dasar cawan diberi label.
- Cawan berisi medium kemudian disimpan dalam lemari pendingin sampai diperlukan.

b. Pembuatan biakan murni jamur *C. cassiicola*

Biakan murni jamur *C. cassiicola* didapat dengan cara mengisolasi jamur dari daun tanaman karet yang menunjukkan gejala serangan.

Caranya sebagai berikut :

- Daun yang akan diisolasi , dimasukkan dalam kantong plastik kemudian dibawa ke laboratorium.
- Di laboratorium daun dicuci secara hati-hati dengan air yang mengalir (dari kran) untuk menghilangkan debu yang menempel pada permukaan daun.
- Daun yang masih basah tersebut dikeringkan dengan kertas saring dengan cara menempelkan daun pada kertas saring.
- Kemudian daun dicelupkan sesaat ke dalam alkohol 70% dan dikeringkan kembali dengan kertas saring.
- Bercak daun kemudian dipotong seluas 1 cm<sup>2</sup> dan diletakkan pada media Agar Kentang Dekstrosa yang telah disiapkan dengan menggunakan pinset dan dilakukan secara aseptik.
- Biakan selanjutnya diinkubasi dalam suhu kamar selama 3 x 24 jam. Selanjutnya diobservasi di bawah mikroskop. Kalau sudah terbentuk miselia, biakan dipindahkan ke medium lain sampai didapatkan biakan murni. Koloni yang terbentuk diambil dan dimasukkan ke dalam aquades, kemudian dikocok dengan alat pengocok sehingga terbentuk suspensi ( Sinulingga dan Alwi, 1990).

### c. Percobaan Postulat Koch

Suspensi konidium kemudian diinokulasikan pada daun beberapa tunas tanaman karet dengan menggunakan cotton swab. Sebelumnya daun-daun tersebut dibersihkan dari kotoran dengan menggunakan kuas halus. Inokulasi dilakukan pada sore hari dengan menyemprotkan suspensi konidium secara merata pada permukaan sebelah atas daun. Daun tanaman karet selanjutnya disungkup dengan plastik. Ditunggu antara 2 - 15 hari kemudian diamati. Bila pada daun terlihat gejala penyakit yang sama yang disebabkan oleh jamur *C. cassiicola* maka dilakukan isolasi patogen. Isolat II dibiakkan lagi dalam medium dan diamati apakah sama dengan isolat I. Bila sama kemudian diinokulasikan lagi ke tanaman karet untuk melihat kesamaan gejalanya .

## 2. Penelitian Inti

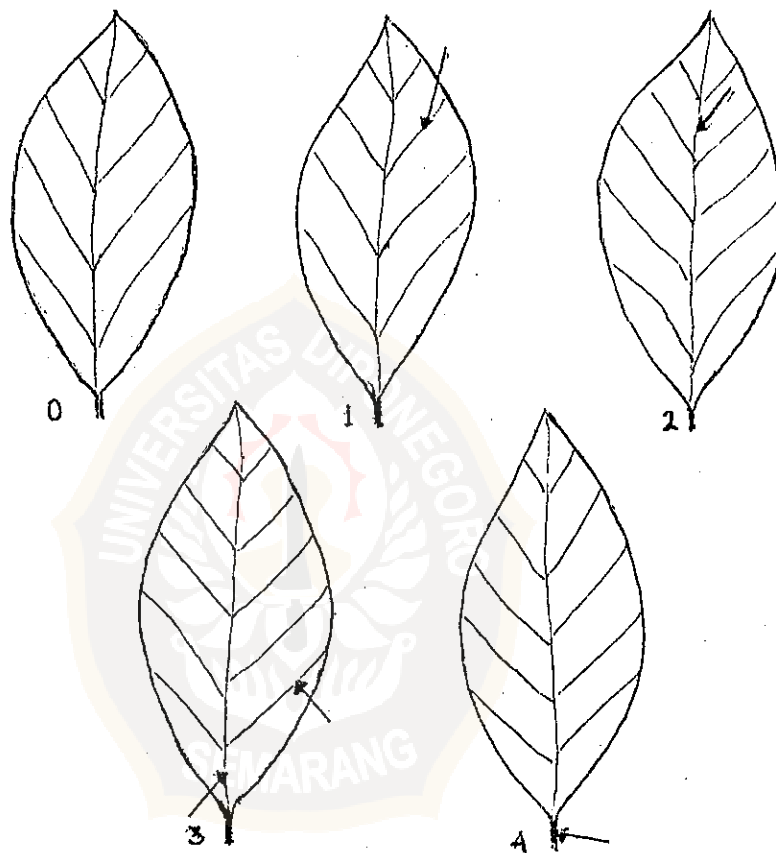
Sebelum perlakuan tanaman karet dipangkas secara serentak untuk merangsang pembentukan daun baru yang seragam. Sambil menunggu pertumbuhan daunnya hingga berumur dua minggu, dibuat biakan murni jamur *C. cassiicola* dengan cara seperti yang dilakukan pada penelitian pendahuluan. Setelah didapatkan biakan murni kemudian

koloni konidium disuspensikan dalam aquades. Setelah daun berumur 2 minggu biakan murni jamur *C. cassiicola* yang telah disuspensikan dalam aquades diinokulasikan pada sore hari dengan menggunakan cotton swab. Sebelum perlakuan, daun-daun tersebut dibersihkan dari kotoran dengan menggunakan kuas halus. Setelah perlakuan daun disungkup dengan kantong plastik. Pengamatan dilakukan 3 hari setelah perlakuan.

### 3. Pengamatan

- Pengamatan dilakukan terhadap bentuk koloni, ukuran konidium dan patogenisitas. Sebagai data penunjang, adalah data mengenai kondisi lingkungan kebun percobaan serta kondisi lingkungan asal inokulum.
- Pengamatan terhadap bentuk koloni dilakukan secara visual dengan melihat tepi dan warnanya. Selanjutnya diamati ciri-ciri konidium dari jamur *C. cassiicola* dengan menggunakan mikroskop yang meliputi ukuran panjang, diameter dan jumlah septa dengan 100 kali ulangan menggunakan perbesaran 400 kali untuk setiap isolat.
- Pengamatan terhadap patogenisitas jamur *C. cassiicola* dari masing-masing isolat dilakukan dengan cara melihat intensitas serangan setiap 4 hari sekali selama 9 kali. Pengama-

tan pertama dilakukan 3 hari setelah dilakukan inokulasi. Sebagai contoh digunakan lima anak daun tengah dari lima tangkai daun. Pengambilan data dilakukan dengan membagi serangan *C. cassiicola* pada daun dalam lima kategori. Jenis-jenis kategori penyerangan dapat dilihat pada gambar 2.



Gambar 2 : Kategori serangan pada daun

Keterangan :

- : letak serangan  
 0 : tidak ada serangan  
 1 : serangan pada lamina  
 2 : serangan pada tulang daun  
 3 : serangan pada lamina dan tulang daun  
 4 : serangan pada tangkai daun atau daun gugur

Rumus yang digunakan untuk menghitung intensitas serangan ( Sinulingga dan Alwi, 1990) adalah :

$$I = \frac{\sum nV}{Z N} \times 100\%$$

Keterangan :

1. I = Intensitas serangan (%)
2. n = Jumlah daun yang terserang untuk setiap kategori
3. V = Nilai serangan untuk setiap kategori
4. Z = Nilai tertinggi dari keseluruhan kategori
5. N = Jumlah daun yang diamati

#### 4. Analisis Data

Percobaan disusun dalam Rancangan Acak Kelompok Faktorial yang terdiri dari 3 faktor klon, 3 faktor isolat, 9 faktor periode pengamatan dengan setiap perlakuan dilakukan 3 kali ulangan. Bentuk-bentuk perlakuannya adalah sebagai berikut :

- I0 : Perlakuan tanpa isolat
- I1 : Isolat Jawa Tengah
- I2 : Isolat Jawa Barat
- K1 : Klon PR 261
- K2 : Klon PR 300
- K3 : Klon PR 302
- H1 : 3 hari setelah inokulasi
- H2 : 7 hari setelah inokulasi
- H3 : 11 hari setelah inokulasi
- H4 : 15 hari setelah inokulasi
- H5 : 19 hari setelah inokulasi
- H6 : 23 hari setelah inokulasi
- H7 : 27 hari setelah inokulasi
- H8 : 31 hari setelah inokulasi
- H9 : 35 hari setelah inokulasi