

### **III. BAHAN DAN METODE**

#### **3.1 Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan dari bulan Juli 2011 hingga Januari 2012 bertempat di laboratorium Penyakit Tumbuhan Jurusan Proteksi Tanaman Fakultas Pertanian Universitas Lampung.

#### **3.2 Alat dan Bahan**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah timbangan digital, cawan Petri, tabung reaksi, gelas Erlenmeyer, gelas ukur, mikroskop stereo, *magnetic stirrer*, *laminar air flow*, autoklaf, oven, timbangan, panci, pisau, pipet tetes, rak tabung, panci, bunsen, korek api, pinset, jarum ose, pisau, nampan plastik, *aluminium foil*, plastik *warp*, kaca preparat cekung, *cover glass*, plastik tahan panas, kertas label, tisu, dan alat tulis.

Bahan-bahan yang digunakan antara lain, biji tembakau Virginia, aquades, apel, alkohol 70%, gula, khlorok, asam laktat, agar batang, kentang, tanah, dan jerami padi.

### 3.3 Metode Penelitian

Perlakuan dalam penelitian ini disusun dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL) terdiri atas enam perlakuan termasuk kontrol dengan empat ulangan sehingga terdapat 24 satuan percobaan. Perlakuan terdiri atas:

Ko = Kontrol berupa tanaman tembakau yang disiram menggunakan air steril

J = Aplikasi jerami padi tanpa *Trichoderma*

Tv.J = Aplikasi *T. viride* dikombinasikan dengan jerami padi

Tv = Aplikasi *T. viride* tanpa jerami padi

Th.J = Aplikasi *T. harzianum* dikombinasikan dengan jerami padi

Th = Aplikasi *T. harzianum* tanpa jerami padi

### 3.4 Pelaksanaan Penelitian

#### 3.4.1 Penyiapan Media Tanam

Media tanam yang digunakan adalah 600 gr tanah dan 6 gr jerami padi. Tanah dan jerami padi disterilisasi terlebih dahulu menggunakan autoklaf sampai suhu 100°C dan dilakukan sebanyak dua kali. Kemudian media tanam dimasukkan ke dalam nampan plastik ukuran 40 x 30 x 5 cm.

#### 3.4.2 Isolasi dan Aplikasi Jamur *Trichoderma* spp.

##### 3.4.2.1 Perbanyak Biakan *Trichoderma* spp.

Biakan *Trichoderma* spp. yang digunakan berasal dari hasil uji pendahuluan sebelumnya yang diperbanyak menggunakan media PDA (*Potato Dextrose Agar*).

Biakan *Trichoderma* kemudian diambil dengan menggunakan bor gabus, lalu diletakkan di tengah - tengah cawan Petri yang telah berisi media PDA, dan diinkubasi selama 7 hari.

#### **3.4.2.2 Penyiapan Suspensi *Trichoderma* spp.**

Pembuatan suspensi *Trichoderma* dilakukan dengan cara satu Petri biakan *Trichoderma* diberi 10 ml aquades steril lalu dikeruk. Kemudian suspensi diencerkan secara bertingkat dengan aquades sampai  $10^{-6}$ , dengan kerapatan *T. viride*  $5 \times 10^5$  spora/ml dan kerapatan spora *T. harzianum*  $12,5 \times 10^5$  spora/ml.

#### **3.4.2.3 Aplikasi *Trichoderma* spp.**

Aplikasi *Trichoderma* dilakukan dengan cara menyiramkan suspensi di atas media tanam sebanyak 30 ml. Nampan ditutup dengan plastik *warp* lalu diinkubasi selama tujuh hari (Murdan dan Thoyibah, 1997).

### **3.4.3 Isolasi dan Inokulasi Jamur *Pythium* sp.**

#### **3.4.3.1 Isolasi Jamur *Pythium* sp.**

Isolasi jamur *Pythium* sp. digunakan media apel. Apel di lubangi sebanyak empat lubang, kemudian setiap lubang diberi tanah lembab yang berasal dari pertanaman tembakau lalu ditutup dengan menggunakan selotip. Diinkubasi di laboratorium selama 3 – 5 hari, kemudian setelah bergejala diperbanyak pada media PDA.

#### **3.4.3.2 Penyiapan Suspensi *Pythium* sp.**

Pembuatan suspensi *Pythium* sp. dilakukan dengan cara satu Petri biakan *Pythium* sp. yang telah berumur tujuh hari diberi 10 ml aquades lalu dikeruk. Kemudian suspensi diencerkan secara bertingkat dengan aquades sampai  $10^{-6}$ . Kerapatan spora yang digunakan  $10^6$  spora/ml.

#### **3.4.3.3 Inokulasi Jamur *Pythium* sp.**

Inokulasi *Pythium* sp. pada tanah dilakukan satu minggu setelah aplikasi *Trichoderma* dengan cara menyiramkan 30 ml suspensi di atas media tanam (Rachmawaty, *et al.*, 1995). Setelah itu, tanah dan inokulum jamur diaduk sampai merata. Nampan ditutup dengan plastik *warp* untuk menjaga kelembaban dan mengurangi kontaminan kemudian diinkubasi selama tujuh hari (Santoso, *et al.*, 1999).

#### **3.4.4 Penanaman Biji Tembakau**

Penanaman biji tembakau dilakukan satu minggu setelah inokulasi *Pythium* sp. Setiap nampan ditanam dengan 50 biji tembakau. Letak nampan kemudian diatur sesuai dengan rancangan acak lengkap dengan empat ulangan, lalu diberi label pada tiap nampan untuk memudahkan pada saat pengamatan.

#### **3.4.5 Pengamatan dan Pengumpulan Data**

Pengamatan mulai dilakukan 10 hari setelah sebar (hss). Peubah yang diamati meliputi persentase kemunculan dan keterjadian penyakit.

##### **3.4.5.1 Persentase Kemunculan**

Persentase kemunculan benih tembakau diamati setiap tiga hari sekali selama tiga minggu. Kemudian data yang didapat dihitung menggunakan rumus :

$$P = \frac{A}{B} \times 100\%$$

Keterangan:

P = Persentase kemunculan

A = Jumlah benih yang muncul

B = Jumlah semua benih

#### **3.4.5.2 Keterjadian Penyakit Rebah Kecambah**

Pengamatan keterjadian penyakit akibat serangan *Pythium* dilakukan bersamaan dengan pengamatan persentase kemunculan, yaitu setiap tiga hari sekali selama tiga minggu. Keterjadian penyakit yang dihitung adalah *post-emergence damping-off*. Data yang didapat dihitung menggunakan rumus :

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

Keterangan:

KP = Keterjadian Penyakit

n = Jumlah tanaman yang mati

N = Jumlah benih yang muncul

Data yang diperoleh diolah dengan menggunakan sidik ragam. Apabila terdapat beda nyata, maka dilanjutkan dengan Uji Beda Nilai Tengah (BNT) pada taraf nyata 5%.