

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* 5×10^5 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%.