

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

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

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Penyakit Tumbuhan dan di halaman Jurusan Proteksi Tanaman Fakultas Pertanian Universitas Lampung dari bulan Juli 2011 sampai Januari 2012.

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

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah cawan petri, jarum ose, beaker *glass*, otoklaf, plastik tahan panas, aluminium *foil*, kertas saring, Bunsen, bor gabus, korek api, spidol, erlenmeyer, kaca preparat cekung, *cover glass*, mikroskop, spatula, gelas ukur, tissue, *laminar air flow*, oven, timbangan, karet, nampan, panci, dan kertas label. Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman tembakau, isolat *T. harzianum*, *T. viride* kentang, gula, agar batang, kunyit, kencur, sirih, tanah, pupuk kandang, aquades, dan alkohol 70 %.

#### **3.3 Metode Penelitian**

Perlakuan dalam penelitian ini disusun dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri dari 7 perlakuan dengan masing-masing tiga ulangan sehingga didapat 21 satuan percobaan. Perlakuan terdiri atas :

1. Kontrol berupa tanaman tembakau yang disiram dengan air steril;
2. Aplikasi *T. viride* dikombinasikan dengan fungisida kencur;
3. Aplikasi *T. viride* dikombinasikan dengan fungisida kunyit;
4. Aplikasi *T. viride* dikombinasikan dengan fungisida sirih;
5. Aplikasi *T. harzianum* dikombinasikan dengan fungisida kencur;
6. Aplikasi *T. harzianum* dikombinasikan dengan fungisida kunyit;
7. Aplikasi *T. harzianum* dikombinasikan dengan fungisida sirih.

### **3.4 Pelaksanaan Penelitian**

#### **3.4.1 Penyiapan tanaman tembakau**

Bibit tanaman tembakau yang berumur 38-45 hari sebanyak 21 tanaman dipindah tanam dalam 21 polibag berukuran 5 kg dengan media tanama berupa tanah dan pupuk kandang dengan perbandingan 3:1 sehingga siap untuk diaplikasikan *Trichoderma* dan fungisida nabati. Penyakit patik pada tanaman tembakau sangat berkembang pada kondisi yang lembab. Oleh karena itu, tanaman tembakau harus dijaga kelembabannya dengan cara meletakkan tanaman tembakau tidak berada di bawah sinar matahari secara langsung.

#### **3.4.2 Pembuatan fungisida nabati kunyit, kencur, dan sirih**

Menurut Oktasari (2009), pembuatan tepung kunyit, kencur, dan sirih dilakukan dengan mencuci rimpang kunyit, dipotong tipis, dan dikeringanginkan, kemudian dibungkus dengan plastik tahan panas dan dioven selama 3-4 hari dengan suhu 50°C. Setelah dioven, bahan kunyit tersebut diblender sampai halus lalu disaring sehingga diperoleh tepung yang halus.

### 3.4.3 Perbanyak jamur *Trichoderma* spp.

Isolat *Trichoderma* spp. yang digunakan adalah koleksi Klinik Tanaman yaitu *T.harzianum* dan *T.viride* yang tahan terhadap fungisida nabati kunyit, kencur, dan sirih. *Trichoderma* diperbanyak menggunakan media PDA (*Potato Dextrose Agar*). Biakan *Trichoderma* diambil dengan menggunakan jarum ose, lalu diletakkan ditengah-tengah cawan petri yang telah berisi media PDA, dan diinkubasi selama 7 hari.

### 3.4.4 Penyiapan suspensi dan menghitung kerapatan jamur *Trichoderma* spp.

Penghitungan kerapatan spora jamur *Trichoderma* spp. dilakukan pada biakan berumur 7 hari, dibuat menjadi suspensi menggunakan air aquades steril 10 ml. setelah itu dilakukan pengenceran menjadi  $10^{-6}$ . Hasil pengenceran jamur *Trichoderma* spp. (0,1 ml) dihitung kerapatan sporanya menggunakan Haemocytometer. Kemudian seluruh suspensi masing-masing spesies *Trichoderma* ini digunakan untuk disemprotkan pada daun tanaman tembakau dengan menambahkan 0,5 kg gula tiap 1000ml suspensi sebagai makanan tambahan bagi *Trichoderma*.

### 3.4.5 Penyiapan inokulum *C. nicotianae*

Penyiapan inokulum *C. nicotianae* dilakukan dengan dua metode, pertama secara alami yaitu menyiapkan tanaman yang terserang patik dan yang kedua dengan memblender daun tembakau yang terdapat bercak patik (*C. nicotianae*). Daun terserang patik dimasukkan ke dalam blender lalu dicampur dengan 1000 ml air,

kemudian diblender hingga seluruhnya tercampur rata. Kemudian dilakukan penyaringan untuk memisahkan larutan dengan ampasnya.

#### **3.4.6 Aplikasi suspensi *Trichoderma* spp.pada daun tembakau**

Suspensi dua spesies *Trichoderma* yang telah disiapkan kemudian diaplikasikan dengan menyemprotkan menggunakan handsprayer dibagian permukaan dan bawah daun-daun tanaman tembakau secara merata sebanyak 50-60 ml per tanaman pada pukul 17.00 WIB saat matahari mulai tenggelam dengan tujuan untuk menjaga kelembaban. Aplikasi *Trichoderma* dilakukan 7 hari sebelum aplikasi fungisida nabati dan dilakukan sebanyak dua kali, yaitu sebelum dan setelah inokulasi *C. nicotianae*.

#### **3.4.7 Aplikasi fungisida nabati kencur, kunyit, dan sirih**

Fungisida nabati berupa larutan dari tepung kencur, kunyit, dan daun sirih tersebut disemprotkan sebanyak 50-60 ml per tanaman ke bagian permukaan dan bawah daun tanaman tembakau secara merata 7 hari setelah aplikasi *Trichoderma* dan dilakukan sebanyak dua kali, yaitu sebelum dan setelah inokulasi *C. nicotianae*. Konsentrasi yang dipakai adalah 50gr fungisida nabati per liter air untuk masing-masing jenis fungisida nabati.

#### **3.4.8 Inokulasi *C. nicotianae* pada daun tembakau**

Inokulasi *C. nicotianae* dilakukan dengan dua metode. Pertama secara alami dengan meletakkan tanaman tembakau yang terserang patik diantara tanaman tembakau sehat yang akan diinokulasikan dengan jarak peletakan dua tanaman per

tanaman inokulum. Kedua, inokulum *C. nicotianae* yang telah berupa larutan disemprotkan ke bagian permukaan dan bagian bawah daun-daun tembakau secara merata. Penyemprotan dilakukan pada sore hari pukul 18.00-19.00 dengan tujuan untuk menjaga kelembaban. Interval waktu penyemprotan pertama dari inokulasi alami yaitu dua minggu, dan dengan penyemprotan kedua satu minggu.

### 3.4.9 Pengamatan dan pengumpulan data

Pengamatan dilakukan terhadap gejala penyakit pada daun tembakau yang muncul yaitu timbulnya bercak di daun (Komisi Pestisida, 1989), dengan interval pengamatan tujuh hari. Pengamatan dilakukan sebanyak 5 kali pengamatan selama lima minggu.

Tabel 2. Skor gejala penyakit patik pada tembakau

Skor	Gejala Penyakit
0	tidak ada daun terserang
1	luas daun terserang 1% – 25%
2	luas daun terserang 26% – 50%
3	luas daun terserang 51% – 75%
4	luas daun terserang 76% – 100%

Data yang dikumpulkan berupa tingkat keparahan penyakit yang dihitung menurut rumus :

$$\text{Keparahan Penyakit} = \frac{\sum n \times v}{N \times V} \times 100 \%$$

Keterangan :

n : jumlah daun yang bergejala dengan skor tertentu

v : nilai skor tiap kategori serangan

N : jumlah tanaman yang diamati

V : skor tertinggi

Seluruh data keparahan penyakit patik digunakan untuk dibuat grafik perkembangan penyakit. Menurut Louws *et al.* (1996), total luas area yang ada di bawah kurva perkembangan penyakit (*Area Under Diseases Progress Curve/AUDPC*) dihitung dengan menggunakan rumus :

$$AUDPC = \sum_i^{n-1} \left[ \frac{Y_i + Y_{i+1}}{2} \right] (t_{i+1} - t_i)$$

Keterangan :

$Y_{i+1}$  : data pengamatan ke-i+1

$t_{i+1}$  : waktu pengamatan ke-i+1

$Y_i$  : data pengamatan ke-1

$t_i$  : waktu pengamatan ke-1

Persentase penghambatan serangan *C. nicotianae* akibat pengaplikasian

*Trichoderma* dan fungisida nabati dihitung berdasarkan rumus :

$$\text{Persentase Penghambatan} = \left( 1 - \frac{AUDPC_{perlakuan}}{AUDPC_{kontrol}} \right) \times 100 \%$$

### 3.4.10 nalisis Data

Data keparahan penyakit patik yang diperoleh kemudian dianalisis dengan menggunakan sidik ragam (ANOVA) dan dilanjutkan dengan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) pada taraf 5 %.