

III. BAHAN DAN METODE

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Penyakit Tumbuhan dan Kebun Percobaan di dalam kampus di Program Studi Agroteknologi Fakultas Pertanian, Universitas Lampung dari bulan Maret sampai Juni 2014.

3.2 Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu sampel tanah dan akar tanaman jagung dari kota Metro dan Kabupaten Lampung Timur, isolat *T. koningii* dan *T. viride* koleksi Klinik Tanaman, daun dan tanaman jagung yang terserang bulai dan hawar daun, tanah steril, kentang, agar-agar, gula, asam laktat, aquades, asam laktat, antibiotik tirmizin, rosebengal, alkohol 70%, dan benih jagung varietas Lokal IR.

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu cawan petri, tabung reaksi, rak tabung reaksi, tabung erlenmeyer, gelas ukur, *laminar air flow* (LAF), pipet tetes, mikropipet, jarum ose, jarum T, bor gabus, pinset, bunsen, mikroskop majemuk, kaca preparat, cover glass, hemocytometer, handcounter, autoklaf, oven, timbangan manual, timbangan elektrik, rotamixer, pot, kompor, nampan, tissu, plastik tahan panas, plastik wrap, *aluminium foil*, kertas label, dan spidol.

3.3 Metode Penelitian

Penelitian ini disusun dalam rancangan acak kelompok (RAK) dengan tujuh perlakuan yaitu perlakuan satu adalah tanpa aplikasi *Trichoderma* sp. sebagai kontrol (K), perlakuan dua adalah aplikasi *Trichoderma viride* (TV), perlakuan tiga adalah aplikasi *Trichoderma koningii* (TK), perlakuan empat adalah aplikasi *Trichoderma* sp. isolat M21 (M21), perlakuan lima adalah aplikasi *Trichoderma* sp. isolat M22 (M22), perlakuan enam adalah aplikasi *Trichoderma* sp. isolat M23 (M23), dan perlakuan tujuh adalah aplikasi *Trichoderma* sp. isolat M24 (M24).

Masing-masing perlakuan diulang sebanyak tiga kali, sehingga terdapat 21 satuan percobaan. Setiap satuan percobaan berisi sepuluh benih jagung. Setiap satuan percobaan disusun secara acak dengan menggunakan undian. Berikut ini merupakan gambar petak tata letak percobaan (Gambar 1).

M22 U1	K U1	TV U1	TK U1	M23 U1	M24 U1	M21 U1
TV U2	M23 U2	M22 U2	M24 U2	K U2	M21 U2	M24 U2
K U3	M22 U3	TK U3	TV U3	M24 U3	M21 U3	M23 U3

Gambar 1. Petak tata letak percobaan.

Data yang diperoleh dari penelitian ini dianalisis menggunakan sidik ragam dan dilanjutkan dengan uji jarak Duncan pada taraf nyata 5%.

3.4 Pelaksanaan Penelitian

3.4.1 Pengambilan sampel tanah

Isolat *Trichoderma* yang digunakan merupakan isolat koleksi Klinik Tanaman Jurusan Agroteknologi Fakultas Pertanian Universitas Lampung, yaitu *T. koningi*, dan *T. viride* dan *Trichodermaspp.* (isolat M21, M22, M23, dan M24) yang diambil dari wilayah kota Metro. Sampel tanah yang diambil merupakan tanah yang banyak mengandung bahan organik. Pengambilan sampel tanah dilakukan dengan cara mengambil tanah dan rizosfer di sekitar tanaman jagung sehat diantara tanaman jagung yang terserang penyakit.

3.4.2 Penyiapan media biakan Trichoderma spp.

Media biakan yang digunakan adalah media PDA-R (*Potato Dextrose Agar-Rosebengal*). Untuk kebutuhan 1 liter media, bahan-bahan yang diperlukan adalah 200 g kentang, 20 g agar batang, 20 g gula, dan 40 mg rosebengal. Cara pembuatannya yaitu kentang dikupas dan dicuci bersih lalu dipotong seperti dadu berukuran ± 1 cm dan direbus dalam 1 liter aquades. Sari dari rebusan kentang tersebut dimasukkan kedalam tabung erlenmeyer dan ditambahkan potongan agar, gula, dan rosebengal. Kemudian ditambahkan aquades hingga volume 1 L dan diautoklaf pada tekanan 121 atm dengan suhu 100⁰C selama 15 menit. Sebelum campuran dituangkan kedalam cawan petri, media ditambahkan antibiotik streptomycin sebanyak 50 g dan chlorophenicol sebanyak 50 mg.

3.4.3 Isolasi, pemurnian, dan identifikasi *Trichoderma* spp.

Tanah yang diisolasi diambil sebanyak 1 g dari masing-masing sampel tanah dengan dua ulangan. Kemudian dilakukan pengenceran hingga 10^{-5} . Suspensi yang digunakan berasal dari pengenceran 10^{-3} dan 10^{-5} . Dari hasil pengenceran diambil sebanyak 1 ml dan disebar kedalam media PDA-R yang telah memadat dan kemudian diinkubasi selama 7 hari.

Trichoderma spp. yang tumbuh dimurnikan dengan dipindahkan ke media PDA-L baru. Biakan murni *Trichoderma* spp. yang didapat selanjutnya diperbanyak pada media PDA dan diinkubasikan selama 7 hari.

Identifikasi isolat *Trichoderma* spp. dilakukan dengan cara mengamati morfologi jamur dibawah mikroskop. Kemudian gambar yang diperoleh, diidentifikasi dengan metode pendugaan berdasarkan buku identifikasi *Trichoderma and Gliocladium* Volume 1 (Harman *et al.*, 1998). Metode ini dilakukan dengan cara mengamati bentuk fialid dan spora.

3.4.4 Penyiapan media tanam

Media tanam yang digunakan adalah tanah yang diambil dari lahan percobaan lapangan terpadu Fakultas Pertanian, Universitas Lampung. Tanah yang digunakan sebagai media tanam disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 30 menit. Setelah didinginkan, tanah ditimbang sebanyak 3,5 kg untuk dimasukkan ke dalam masing-masing pot.

3.4.5 Perlakuan benih jagung

Perlakuan benih ini dilakukan dengan cara memasukkan benih ke dalam cawan petri yang berisi aquades selama beberapa saat, kemudian benih dimasukkan kedalam plastik. Setelah itu isolat *Trichoderma* spp. pada media PDA diserut menggunakan pisau scapel, setelah terkumpul dimasukkan kedalam plastik dan dicampur sampai rata dengan benih sesuai perlakuan. Sedangkan untuk perlakuan kontrol (K), benih hanya dimasukkan kedalam aquades tanpa diberi kultur *Trichoderma* spp. Pada masing-masing perlakuan yang telah ditambahkan kultur *Trichoderma* spp., diambil dua sampel benih jagung setiap perlakuan untuk dihitung jumlah kerapatan sporanya.

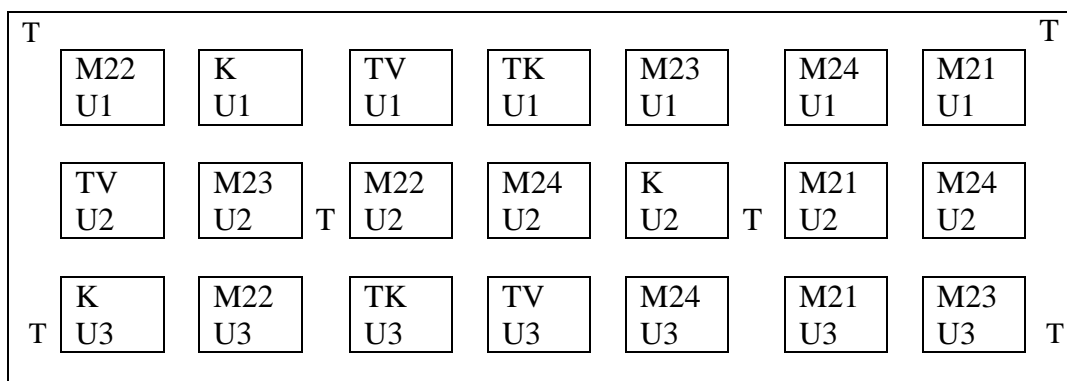
3.4.6 Penanaman benih jagung

Benih yang telah diberikan perlakuan kemudian ditanam pada masing-masing pot sesuai perlakuan. Penanaman dilakukan dengan cara membuat lubang kira-kira sedalam 3 cm, kemudian benih dimasukkan dan ditutup kembali dengan tanah. Masing-masing pot ditanam sepuluh benih jagung. Setelah itu dilakukan penyiraman secara rutin untuk menjaga kelembaban tanah.

3.4.7 Inokulasi *P. maydis* dan *D. maydis*

Inokulasi *P. maydis* dilakukan dengan dua cara yaitu inokulasi alami dan buatan. Sedangkan inokulasi *D. maydis* dilakukan secara alami. Inokulasi *P. maydis* dan *D. maydis* secara alami dilakukan dengan meletakkan tanaman jagung yang terserang penyakit bulai dan hawar daun diantara tanaman yang sehat. Inokulasi dengan cara ini bertujuan agar tanaman dapat terserang patogen yang terbawa

oleh angin atau percikan air hujan. Inokulasi alami dilakukan pada saat tanaman berumur 7 HST. Berikut ini merupakan gambar tata letak inokulasi secara alami.



Gambar 2. Tata letak perlakuan secara alami. T = tanaman bergejala bulai dan hawar daun sebagai sumber inokulum untuk inokulasi alami.

Inokulasi *P. maydis* secara buatan dilakukan sebanyak dua kali yaitu, pertama pada saat tanaman berumur 10 hari setelah tanam (HST). Inokulasi dilakukan dengan cara mengumpulkan daun-daun jagung yang terserang penyakit bulai dan terdapat tepung-tepung di sisi bawah daun yang merupakan kumpulan spora *P. maydis*. Daun-daun tersebut dimasukkan kedalam aquades kemudian daun diserut dengan menggunakan pisau scapel. Setelah itu inokulum dimasukkan ke dalam sprayer dan disemprotkan pada seluruh bagian tanaman secara merata. Inokulasi ini dilakukan pada dini hari pukul 05.00 WIB.

3.4.8 Pengamatan

Peubah yang diamati pada penelitian ini adalah masa inkubasi, keterjadian penyakit bulai, keparahan penyakit hawar daun, tinggi tanaman, dan bobot kering tanaman.

a. Masa inkubasi dan keterjadian penyakit bulai

Masa inkubasi adalah lamanya waktu yang dibutuhkan tanaman dari inokulasi sampai munculnya gejala awal. Pengamatan keterjadian penyakit bulai dilakukan setiap hari setelah inokulasi patogen dengan mengamati tanaman yang menunjukkan gejala penyakit bulai. Hal tersebut digunakan untuk mengetahui masa inkubasinya. Keterjadian penyakit bulai dihitung dengan rumus sebagai berikut (Sudarsono & Ginting, 2003).

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

Keterangan:

KP : keterjadian penyakit
 n : jumlah tanaman yang terserang
 N : jumlah tanaman yang diamati.

b. Keparahan penyakit hawar daun

Pengamatan keparahan penyakit hawar daun dilakukan setiap tiga hari sekali. Pengamatan dilakukan dengan mengamati gejala penyakit yaitu bercak daun dengan cara membuat skor keparahan penyakit sebagai berikut (Tabel 1).

Tabel 1. Skor keparahan hawar daun jagung yang dimodifikasi dari Reid & Zhu (2005)

No	Luas serangan (%)	Skor
1	0 (tidak ada serangan)	0
2	1-20	1
3	21-40	2
4	41-60	3
5	61-80	4
6	81-100	5

Kemudian hasil skoring dihitung keparahan serangan *D. maydis* dengan menggunakan rumus menurut Mayee dan Datar (1986) dalam Latifahani *et al.* (2014):

$$KPP = \frac{\sum n \times v}{ZN} \times 100\%$$

Keterangan:

- K = keparahan penyakit
- N = jumlah setiap tanaman yang terserang dengan skor tertentu
- v = nilai skor serangan pada setiap tanaman yang terserang
- N = jumlah total tanaman yang diamati
- Z = skor tertinggi

c. Tinggi tanaman

Pengukuran tinggi tanaman dimulai pertama kali pada saat tanaman berumur tiga hari setelah inokulasi (HSI). Pengukuran tinggi tanaman selanjutnya dilakukan setiap tiga hari sekali.

d. Bobot kering tanaman

Tanaman jagung yang telah dipanen dikeringkan beberapa saat, kemudian dipotong kecil-kecil dan dibungkus kertas koran, setelah itu dioven pada suhu 70°C selama 3 hari (72 jam). Bobot kering tanaman diukur dengan cara menimbang berat brangkasan (daun, batang, dan akar).