

### III. MATERI DAN METODE

#### 3.1. Waktu dan Tempat

Penelitian ini telah dilaksanakan di Laboratorium *Plant Protection Section* (PPS) Divisi *Research and Development* (R&D) PT. Arara Abadi Desa Pinang Sebatang, Perawang, Kecamatan Tualang, Kabupaten Siak. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret sampai Juni.

#### 3.2. Alat dan Bahan

##### 3.2.1. Alat

Alat yang digunakan adalah petridish, *laminar air flow cabinet*, *microwave*, *autoclave*, tabung reaksi, bunsen, kawat ose, alkohol, timbangan, stirrer, magnet, erlenmeyer, plastik clip, tali, alat tulis, camera, gunting, penggaris dan springkel.

##### 3.2.2. Bahan

Bahan yang digunakan adalah isolat cendawan *Cylindrocladium*, *Kiramycess* dan *Cryptosporiopsis* bersumber di PPS (*Plant Protection Section*) PT. Arara Abadi, media PSA (*Potato Sukrosa Agar*), bibit *Eucalyptus* sp yang telah berumur kurang lebih 2 bulan, alkohol 70%, aquades, tisu dan kapas, aluminium foil, selotip dan kertas label.

#### 3.3. Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan di *green house* luas *green house* lebih kurang 4 x 10 m, sistem pengairan di *green house* menggunakan springkel. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang disusun secara faktorial dengan 3 ulangan dan 2 faktor yaitu:

Faktor 1 adalah jenis spesies *Eucalyptus* (E), yaitu :

E<sub>1</sub> = *Eucalyptus urophylla*

E<sub>2</sub> = *Eucalyptus urograndis*

E<sub>3</sub> = *Eucalyptus brassiana*

E<sub>4</sub> = *Eucalyptus pellita*

E<sub>5</sub> = *Eucalyptus robusta*

Faktor 2 adalah cendawan patogen (P), yaitu:

$B_1 = \textit{Cylindrocladium}$  sp

$B_2 = \textit{Kiramycess}$  sp

$B_3 = \textit{Cryptosporiopsis}$  sp

Adapun kombinasi perlakuan dapat dilihat pada Tabel. 3.1. di bawah ini:

Tabel. 3.1. Kombinasi perlakuan

Perlakuan	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>3</sub>
E <sub>1</sub>	E <sub>1</sub> P <sub>1</sub>	E <sub>1</sub> P <sub>2</sub>	E <sub>1</sub> P <sub>3</sub>
E <sub>2</sub>	E <sub>2</sub> P <sub>1</sub>	E <sub>2</sub> P <sub>2</sub>	E <sub>2</sub> P <sub>3</sub>
E <sub>3</sub>	E <sub>3</sub> P <sub>1</sub>	E <sub>3</sub> P <sub>2</sub>	E <sub>3</sub> P <sub>3</sub>
E <sub>4</sub>	E <sub>4</sub> P <sub>1</sub>	E <sub>4</sub> P <sub>2</sub>	E <sub>4</sub> P <sub>3</sub>
E <sub>5</sub>	E <sub>5</sub> P <sub>1</sub>	E <sub>5</sub> P <sub>2</sub>	E <sub>5</sub> P <sub>3</sub>

Setiap perlakuan diulang 3 kali sehingga terdapat 45 satuan percobaan di mana setiap satuan percobaan terdapat 5 tanaman, sehingga jumlah keseluruhan tanaman yaitu 225 tanaman.

### 3.4 Pelaksanaan Penelitian

#### 3.4.1 Pembuatan media PSA (*Potato sucrose agar*)

Bahan yang digunakan untuk membuat media PSA adalah : kentang 200 g, sucrose 20 g, agar 15 g, dan air 1 L. Cara pembuatan media PSA yaitu 200 g kentang yang telah diiris menjadi sebesar potongan dadu direbus dengan air 800 ml sampai kentang lunak. Air rebusan tersebut disaring dan ditambahkan sukrosa sebanyak 20 g dan air sampai 1 L. Setelah itu dituang ke dalam erlenmeyer yang telah berisi agar. Media kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 20 menit. Media yang akan digunakan ditambahkan streptomycin sulfat sebanyak 0,05 g untuk 400 ml ketika suhu media berkisaran antara 45°C- 50°C.

#### Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.

b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar UIN Suska Riau.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin UIN Suska Riau.

### 3.4.2 Pembiakan sumber cendawan

Isolat yang digunakan berasal dari *Plant Protection Section* (PPS) PT. Arara Abadi, Pembiakan cendawan dilakukan untuk memperbanyak isolat cendawan *Cylindrocladium* sp, *Kiramycess* sp, dan *Cryptosporiopsis* sp dengan cara media padat (PSA) yang dituang ke dalam cawan petri berdiameter 9 cm. Setelah dingin, ditanam pada bagian tengah media satu potongan inokulum *Cylindrocladium*, *Kiramycess* dan *Cryptosporiopsis*. Cawan ditutup dan disegel menggunakan plastik wrap. Biakan kemudian diinkubasi pada suhu lebih kurang 28°C sampai cendawan memenuhi cawan petri. Setiap perlakuan dilakukan dengan 3 ulangan, dan tiap ulangan terdiri atas satu biakan dalam cawan petri.

### 3.4.3 Pengecekan morfologi cendawan

Untuk melihat karakteristik cendawan patogen *Cylindrocladium*, *Cryptosporiopsis*, dan *Kirramyces* dengan menggunakan mikroskopik untuk memastikan benar cendawan patogen *Cylindrocladium*, *Cryptosporiopsis*, dan *Kirramyces* yang digunakan.

### 3.4.4 Persiapan klon tanaman *Eucalyptus*

Klon tanaman *Eucalyptus* yang telah berumur 2 bulan, jumlah daun lebih kurang 11 helai dan tinggi tanaman lebih kurang 19 cm tanpa ada gejala nekrotik. Persiapan klon tanaman eucalyptus dipilih sesuai kriteria yang sudah ditentukan dan bersumber di *nursery* PT. Arara Abadi. Klon tanaman *Eucalyptus* yang digunakan *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus urophylla*, *Eucalyptus saligna*, *Eucalyptus urograndis*, *Eucalyptus brassiana*, *Eucalyptus camaldulensis*, *Eucalyptus dunni*, *Eucalyptus botryoides*.

### 3.4.5 Persiapan isolat cendawan patogen

Isolat cendawan patogen dipersiapkan sebelum di aplikasikan ke tanaman dan memastikan benar cendawan patogen *Cylindrocladium*, *Cryptosporiopsis* dan *kirramyces* yang di aplikasikan ketanamann.

### 3.4.6 Pemanenan spora cendawan

Pemanenan spora dilakukan setelah cendawan dibiakan di dalam *petridis*, masukkan air steril sebanyak 10 ml ke dalam *petridis* yang berisi cendawan kemudian di *scrob*.

### 3.4.7 Aplikasi cendawan pada klon *Eucalyptus*.

Spora cendawan yang sudah dipanen kemudian dilakukan pengenceran sebanyak  $10^3$  dan ditambahkan air steril 100 ml lalu dilakukan penyemprotan inokulum ke tanaman ini dilakukan dengan menggunakan *sprayer* setiap tanaman disemprotkan 10 ml inokulum dan dilakukan secara bergantian terhadap tanaman.

### 3.4.8 Reisolasi cendawan patogen yang diuji setiap satu kali seminggu setelah inokulasi.

Reisolasi adalah mengisolasi kembali cendawan yang telah diuji setelah di Inokulasi. Inokulasi dilakukan dengan cara menanam pada media padat (PSA) yang dituang ke dalam cawan petri berukuran 9 cm, ditanam satu potongan inokulum *Cylindrocladium*, *Cryptosporiopsis* dan *Kirramycess* berdiameter 1 cm (yang diambil dengan bor gabus berdiameter 1 cm) yang telah disterilkan pada bagian tengah media. Cawan ditutup dan disegel menggunakan plastik wrap. Biakan kemudian diinkubasi sampai cendawan memenuhi cawan petri. Setiap perlakuan dilakukan dengan 3 ulangan, dan tiap ulangan terdiri atas satu biakan dalam cawan petri (Achmad dan Eny, 2009)

### 3.4.9 Uji kompatibilitas dengan isolat cendawan patogen asalnya.

Reisolasi adalah mengisolasi kembali daun yang telah terinfeksi atau yang telah timbul gejala akibat dari *Cylindrocladium*, *Kirramycess* dan *Cryptosporiopsis* kemudian dilakukan uji kompatibilitas. Uji kompatibilitas adalah persamaan miselia yang sesama genetik atau strainnya, pada isolat yang dipasangkan dengan dirinya sendiri atau *self-pairings* yang menunjukkan tidak adanya keragaman genetik, Miselium jamur akan menggabung dan tumbuh bersama membentuk koloni tunggal (Puspitasari dan Rimbawanto, 2010)

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.

b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar UIN Suska Riau.



### 3.5 Parameter Pengamatan

#### 3.5.1 Pengamatan Morfologi Cendawan Patogen

Pengamatan morfologi cendawan diketahui dengan ciri makroskopik dan mikroskopik, Ciri- ciri makroskopik cendawan yang diamati yaitu ciri koloni seperti warna koloni kemudian diameter koloni. Ciri-ciri mikroskopiknya, adapun yang diamati adalah ciri- ciri dari hifa seperti ada tidaknya sekat pada hifa, tipe percabangan hifa, dan ciri-ciri konidia berupa bentuk dan rangkaian konidia.

#### 3.5.2 Menghitung persentase kejadian penyakit

Menghitung persentase kejadian penyakit diamati berdasarkan jumlah tanaman yang terinfeksi cendawan patogen dengan jumlah tanaman yang diamati berdasarkan metode Suharti *et al.* (2013) yaitu dengan menggunakan rumus:

$$KP = \frac{\text{Jumlah tanaman yang terserang}}{\text{Jumlah tanaman yang diamati}} \times 100\%$$

#### 3.5.3 Tingkat Keparahan Tanaman yang terinfeksi cendawan patogen

Tingkat keparahan tanaman bisa dihitung dengan intensitas penyakit terhadap daun *Eucalyptus*, Menurut Simorangkir (2014) intensitas serangan dapat diamati berdasarkan tingkat kerusakan, yang ditentukan dengan rumus:

$$I = \frac{\sum (n \times v)}{Z \times N} \times 100 \%$$

Keterangan :

I : Intensitas serangan

n : Jumlah daun dari setiap kategori serangan

v : Nilai skala dari tiap kategori serangan tertinggi (Nilai skala terbesar 4)

Z : Harga numerik dari kategori serangan tertinggi (Nilai skala terbesar 4)

N : Jumlah daun tanaman yang diamati

Tingkat keparahan bisa diamati dengan menentukan skala dari tiap serangan dengan ditentukan dengan mengetahui kedudukan kerapatan bercak pada daun yang dapat diamati :

1. Tidak ada bercak (0 bercak/ daun)
2. Bercak sedikit (1-8 bercak/ daun)
3. Bercak sedang (9-16 bercak/ daun)
4. Bercak banyak (> 16 bercak/ daun)

Tabel 3.2. Penilaian tingkat intensitas serangan penyakit dan reaksi tanaman berdasarkan intensitas serangan

Intensitas serangan %	Skor	Reaksi tanaman
0	0	Imun (I)
1-25	1	Resisten (R)
26-50	2	Agak resisten (AR)
51-75	3	Agak Rentan (Ar)
76-100	4	Rentan (r)

### 3.5.4 Pengamatan morfologi cendawan hasil reisolasi dan uji kompatibilitas

Pengamatan morfologi cendawan hasil reisolasi diketahui dengan ciri-ciri makroskopik dan mikroskopik sesuai pengamatan morfologi cendawan patogen asal indukan, dan uji kompatibilitas untuk mengetahui hasil reisolasi sama atau kompatibilitas terhadap asal indukan cendawan patogen.

### 3.6 Analisa Data

Data hasil pengamatan dari masing-masing perlakuan diolah secara statistik dengan menggunakan Analisis Sidik Ragam RAL Faktorial. Model Rancangan Acak Lengkap Faktorial yang digunakan adalah:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + E_{ijk}$$

Keterangan:

- $Y_{ijk}$  = Pengamatan pada faktor E taraf ke-*i*, faktor P dalam ke-*j* dan ulangan ke- *k*
- $\mu$  = Rataan umum
- $\alpha_i$  = Pengaruh faktor E
- $\beta_j$  = Pengaruh faktor P

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar UIN Suska Riau.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin UIN Suska Riau.

$(\alpha\beta)_{ij}$  = Pengaruh interaksi faktor E faktor P taraf ke-j

$E_{ijk}$  = Pengaruh acak/galat dari faktor E taraf ke-i, faktor P dalam baris ke-j, dan ulangan ke-k.

Apabila terdapat berbeda nyata dari perlakuan sidik ragam maka dilanjutkan dengan menggunakan DMRT (*Duncan Multiple Range Test*) pada taraf 5%. Model uji jarak Duncan yaitu:

$$FK = \frac{Y..2}{ij}$$

$$JKT = \sum Y_{ijk}^2 - FK$$

$$JKA = \sum \frac{Y_{i..}^2}{br} - FK$$

$$JKB = \sum \frac{Y_{.j.}^2}{ar} - FK$$

$$JKP = \sum \frac{Y_{ij.}^2}{r} - FK$$

$$JK (AXB) = JKP - JKA - JKB$$

$$JKG = JKT - JKP$$

$$\text{Rataan umum} = \underline{X} = G/r.a.b$$

$$UJD \alpha = R \alpha (\rho, db \text{ galat}) \times \sqrt{\frac{KTG}{Ulangan}}$$

Tabel 3.3. Analisis Sidik Ragam

SK	DB	JK	KT	F Hitung	F Tabel	
					0.05	0.01
E	E-1	JKK	KTK	KTK/KTG		
P	P-1	JKS	KTS	KTS/KTG		
E x P	(e-1)(p-1)	JK (KxS)	KT (KxS)	KT(KxS)/KTG		
Galat	(e p-1)(r-1)	JKG	KTG			
Total	r e p-1	JKT				