

III. BAHAN DAN METODE PENELITIAN

3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian Laboratorium dilaksanakan di Laboratorium Agroteknologi, Universitas Medan Area. Penelitian Lapangan dilaksanakan di desa Durin Tonggal Dusun 3 Ujung Bandar, Kec. Pancur Batu, Kab. Deli Serdang mulai dari April 2016 sampai dengan Juli 2016.

3.2. Bahan dan Alat

Bahan yang di gunakan dalam penelitian ini antara lain adalah bibit karet okulasi (klon PB 260) umur 7 bulan sebanyak 96 batang, biakan murni *R. microporus*, asap cair tempurung kelapa (grade D), *Trichoderma* sp dengan kerapatan konidia 3×10^7 , PDA, Alkohol 70 %, klorox 0,1 % dan aquadest steril dan bahan pendukung lain nya.

Sedangkan alat yang di gunakan adalah alat pembuatan asap cair, cawan petri, gelas ukur, beaker glass, jarum inokulasi, pinset, mikroskop, lampu bunsen, tabung reaksi, drum, papan label, ember, pisau, cangkul, polybag (35 cm x 50 cm), *autoclave*, *laminar air flow*, erlenmeyer, lup, kuas, cat, alat tulis dan alat pendukung lainnya.

3.3. Metode Penelitian

Dalam penelitian ini, percobaan dilakukan dengan 2 tahap yaitu percobaan di laboratorium dan percobaan di lapangan.

3.3.1. Percobaan Laboratorium

Percobaan ini dirancang dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) secara non faktorial yaitu aplikasi limbah cair tempurung kelapa (A)

Faktor perlakuan limbah cair tempurung kelapa (A) yang terdiri dari 6 taraf perlakuan dan 4 ulangan yakni:

A_0 = Kontrol positif, diberikan *Trichoderma sp* (kerapatan konidia 3×10^7)

A_1 = Kontrol negatif, tanpa *trichoderma sp* dan tanpa asap cair

A_2 = Aplikasi asap cair dengan konsentrasi 0,5 % /liter

A_3 = Aplikasi asap cair dengan konsentrasi 1 % /liter

A_4 = Aplikasi asap cair dengan konsentrasi 1,5 % /liter

A_5 = Aplikasi asap cair dengan konsentrasi 2 % /liter

Perlakuan diulang sebanyak 4 kali sehingga dapat diperoleh 24 unit percobaan. Jumlah ulangan diperoleh dengan rumus sebagai berikut :

$$t(r-1) \geq 15$$

$$6(r-1) \geq 15 \quad r \geq 3,5$$

$$6r - 6 \geq 15 \quad r = 4 \text{ (dibulatkan)}$$

$$6r \geq 21$$

$$6r \geq 21/6$$

Dimana :

t : jumlah perlakuan

r : jumlah ulangan

3.3.1.1. Metode Analisa Data

Metode analisis data yang dipakai adalah menggunakan Rancangan Acak Lengkap Non Faktorial dengan rumus model linier aditif :

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \epsilon_{ij}$$

Dimana ;

Y_{ij} : Hasil Pengamatan yang mendapat perlakuan taraf ke-j dan ditempatkan di ulangan ke-i

μ : Nilai tengah

τ_j : Pengaruh ulangan ke - i

ϵ_{ij} : Pengaruh galat percobaan dari perlakuan taraf ke-j dan ulangan ke-i

Selanjutnya bila hasil sidik ragam menunjukkan pengaruh nyata atau sangat nyata, maka dilanjutkan dengan Uji Duncan (Bangun, 1991)

3.3.2. Percobaan di Lapangan

Percobaan ini dirancang dengan Rancangan Acak Kelompok (RAK) secara non faktorial yaitu aplikasi limbah cair tempurung kelapa (A).

Faktor perlakuan limbah cair tempurung kelapa (A) terdiri dari 6 taraf perlakuan dan 4 ulangan yakni:

A_0 = Kontrol positif, diberikan *Trichoderma sp* dengan kerapatan konidia 3×10^7 /gr (50 gr/polybag)

A_1 = Kontrol negatif, tanpa *trichoderma sp* dan tanpa asap cair

A_2 = Aplikasi asap cair dengan konsentrasi 5 ml/liter

A_3 = Aplikasi asap cair dengan konsentrasi 10 ml/liter

A_4 = Aplikasi asap cair dengan konsentrasi 15 ml/liter

A_5 = Aplikasi asap cair dengan konsentrasi 20 ml/liter

Satuan Penelitian:

- Jumlah ulangan = 4 ulangan
- Jumlah plot = 24 plot
- Ukuran plot = 1 m x 1 m
- Jumlah tanaman / plot = 4 tanaman
- Jarak tanam = 30 cm x 30 cm
- Jumlah tanaman sampel / plot = 4 tanaman
- Jarak antar plot = 50 cm
- Jarak antar ulangan = 50 cm
- Jumlah tanaman seluruhnya = 96 tanaman

Dengan demikian, maka jumlah ulangan yang akan digunakan adalah sebagai berikut :

$$(t-1)(r-1) \geq 15 \quad r \geq 20/5$$

$$(6-1)(r-1) \geq 15 \quad r \geq 4$$

$$5(r-1) \geq 15 \quad r = 4$$

$$5r - 5 \geq 15$$

$$5r \geq 20$$

Dimana :

t : jumlah perlakuan

r : jumlah ulangan

3.3.2.1. Metode Analisis Data

Metode analisis data yang dipakai adalah menggunakan Rancangan Acak

Kelompok Non Faktorial dengan rumus model linier aditif :

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \alpha_j + \epsilon_{ij}$$

Dimana ;

Y_{ij} : Hasil Pengamatan yang mendapat perlakuan taraf ke-j dan ditempatkan di ulangan ke-i

μ : Nilai tengah

τ_j : Pengaruh ulangan ke i

α_j : Pengaruh perlakuan taraf ke-j

ϵ_{ij} : Pengaruh galat percobaan dari perlakuan taraf ke-j dan ulangan ke-i.

Selanjutnya bila hasil sidik ragam menunjukkan pengaruh nyata atau sangat nyata, maka dilanjutkan dengan Uji Duncan (Bangun, 1991).

3.4. Pelaksanaan Penelitian

Penelitian aplikasi asap cair tempurung kelapa untuk menekan pertumbuhan dan perkembangan JAP (*Rigidoporus microporus*) pada okulasi bibit karet (*Hevea brasiliensis*) dilaksanakan di desa Durin Tonggal Dusun 3 Ujung Bandar, Kec. Pancur Batu, Kab. Deli Serdang dan Laboratorium Universitas Medan Area.

3.4.1. Persiapan Bibit Karet

Bibit tanaman karet diperoleh dari pembibitan tanaman karet (klon PB 260) dengan umur 7 bulan sebanyak 96 batang yang sudah memiliki payung 2, lalu kemudian bibit karet di pindahkan ke dalam polybag yang lebih besar dengan ukuran 35 cm x 50 cm dan susun secara rapi di lapangan.

3.4.2. Pembuatan Asap Cair Tempurung Kelapa

Tempurung kelapa dibakar di dalam drum pembakaran sampai api menyala besar. Kemudian drum pembakaran ditutup dengan penutup yang telah disambung pipa besi untuk mengalirkan asap ke tangki pendingin (kondensor) yang diisi air. Asap yang telah terkondensasi dalam bentuk cair ditampung pada wadah jerigen. Produksi asap cair akan selesai apabila aliran asap cair telah berhenti sebagai tanda bahwa tempurung kelapa telah terbakar sempurna.

3.4.3. Pembuatan Media PDA (*Potato Dextrose Agar*)

Media biakkan yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah media *Potato Dextrose Agar* (PDA). Prosedur dalam pembuatan media PDA adalah menimbang kentang seberat 250 gr kemudian diiris (dikupas) dan di bentuk dadu dan direbus dalam 500 ml aquades selama \pm 30 menit . Ekstrak kentang diambil dengan cara menyaring air rebusannya kemudian tambahkan aquades lagi hingga mencapai volume 1 liter. Larutan ekstrak kentang dicampur dengan 20 gr agar dan 20 gr *dextrose* kemudian dipanaskan di atas *hot plate*. Setelah larut sempurna, media dipindahkan ke dalam botol (*erlenmeyer*). Media disterilkan dengan menggunakan *autoclave* dengan suhu 121 °C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit. Sebelum media dituangkan media di biarkan terlebih dahulu dalam udara terbuka agar panas nya menurun sampai pada hangat kuku (45⁰C), jika sudah hangat kuku lalu media di tuangkan pada masing-masing *petridish* dan tabung reaksi dalam kondisi steril di *laminar air flow*. PDA dapat disimpan di dalam lemari es dengan suhu 6-10°C.

Untuk penelitian di laboratorium media di tuang dan dicampurkan dengan asap cair sesuai dengan dosis perlakuan ke dalam *petridish* lalu mencampurkan larutan hingga homogen kemudian di simpan dilemari es.



3.4.4. Isolasi dan Inokulasi *R. microporus*

Sumber inokulum diambil dari jaringan tanaman yang diserang oleh *R. microporus* yaitu akar. Sebelum mengisolasi terlebih dahulu dilakukan pengamatan adanya spora atau tidak pada sampel akar yang terserang. Selain itu perlu juga untuk mengamati adanya tungau yang berpotensi akan merusak biakan.

Akar yang terserang penyakit JAP (*R. microporus*) dipotong dengan ukuran 5 x 1 cm. Kemudian potongan tersebut disterilisasi permukaan dengan cara dicuci dengan air mengalir selama 5-10 menit. Selanjutnya potongan akar direndam dengan alkohol 70% selama ± 2 menit dan dibilas dengan aquades steril sebanyak 2 kali lalu dikeringkan pada suhu kamar. Kemudian diinokulasikan pada media PDA. Inkubasi dilakukan pada suhu kamar selama 3 – 4 hari (Junita, 2015)

3.4.5. Pemurnian Isolat *R. microporus*

Pemurnian isolat jamur bertujuan untuk menjaga kemurnian biakan isolat dan tidak terkontaminasi oleh mikrobia lain. Pemurnian dilakukan dengan cara membiakkan kembali jamur yang telah didapat pada media yang sama. Pada waktu pengambilan isolat dari biakan asal, harus diambil dari bagian tepi pertumbuhan. Pengambilan di bagian tengah dari biakan menyebabkan biakan murni yang baru sering terkontaminasi (Junita, 2015)

3.4.6. Perbanyak Isolat *R. microporus*

Media PDA dimasukan kedalam tabung reaksi dan *petridish*. Media dimasukkan dengan volume 1/3 dari tabung reaksi dan di letakan dalam keadaan

miring. Diambil potongan isolat *R. microporus* dengan *cork borer* dari biakan murni, kemudian diinokulasikan ke dalam media PDA pada tabung reaksi. Media PDA yang diinokulasikan dalam tabung reaksi dibuat sebanyak 96 media sesuai banyak perlakuan dan ulangan. Setelah itu media disimpan dalam inkubator selama maksimal 7 hari pada suhu 27 °C.

Setelah *R. microporus* berkembang, pada percobaan lapangan 10-25 ml akuades steril dimasukan ke dalam setiap media PDA *R. microporus* di dalam tabung reaksi, kemudian tabung reaksi tersebut digoyang-goyang hingga konidia terlepas dan tercampur ke dalam akuades (terbentuk suspensi konidia *R. microporus*). Setiap 15 ml suspensi dari masing-masing tabung reaksi yang berjumlah 96 tabung (pulungan, 2013)

3.4.7. Pemberian *R. microporus* di *petridish* pada Penelitian Laboratorium

Diambil potongan isolat *R. microporus* dengan *cork borer* dari biakan murni, kemudian diinokulasikan ke dalam media PDA untuk perlakuan kontrol, *Trichoderma* dan yang sudah tercampur dengan larutan asap cair dalam *petridish*.

3.4.8. Pemberian *R. microporus* Pada Bibit Karet

Pemberian suspensi dilakukan 30 hari setelah pemindahan bibit karet ke polybag yang lebih besar. Suspensi *R. microporus* yang terdapat dalam tabung reaksi yang berisi media diaplikasikan ke bibit tanaman karet dengan cara membuka terlebih dahulu permukaan tanah sedalam 2-3 cm, lalu disiramkan cairan yang berisi *R. microporus* lalu menutupnya kembali dengan tanah. *R. microporus* dapat menyerang akar bibit tanaman karet 20-30 hari.

3.4.8. Aplikasi Asap Cair Tempurung Kelapa Pada Bibit Tanaman Karet.

Aplikasi asap cair tempurung kelapa dilapangan dilakukan 4 minggu setelah aplikasi *R.microporus* dan diberikan sesuai dengan konsentrasi yang telah dibuat lalu di larutkan dengan larutan air, lalu disiram ke tanaman bibit karet. Cara pengaplikasian asap cair yaitu dengan cara membuka permukaan tanah pada polybag sedalam 2-3 cm lalu menyiram asap cair kepermukaan tanah dan menutup kembali permukaan tanah.

3.5. Parameter Yang Diamati

Parameter yang di amati dalam penelitian ini terdapat 2 pengamatan yaitu pengamatan di Laboratorium dan pengamatan di lapangan.

3.5.1. Pengamatan di Laboratorium

3.5.1.1. Luas Pertumbuhan Koloni *R.microporus*

Pengukuran luas pertumbuhan koloni jamur *R. microporus* dilakukan dengan cara:

1. Diamati pertumbuhan luas koloni jamur *R. Microporus* secara periodik pada perlakuan kontrol sampai perlakuan asap cair. Diukur mulai hari ke 2, 4, 6, 8 (setelah inokulasi) dengan interval waktu pengamatan 2 hari.
2. Dihitung diameter jamur pada setiap pengamatan dengan menggunakan pengukur (Rol).Pengukuran dilakukan sebanyak mungkin agar hasil yang di dapat lebih akurat.
3. Hitung luas koloni jamur dengan menggunakan rumus:

$$\text{Luas koloni} = \pi \cdot r^2$$

3.5.2.2. Persentase Penghambatan

Untuk mengetahui persentase penghambatan dapat dilakukan dengan menghitung persentase penghambatan asap cair menggunakan rumus :

$$EF = \frac{x - y}{x} \times 100\%$$

Dimana ; EF : Persentase penghambatan

x : Luas koloni pada kontrol

y : Luas koloni pada perlakuan

Perlakuan yang diuji dikatakan efektif apabila tingkat feikasi (TE) lebih besar atau sama dengan 30% (Nasahi, 2009).

3.5.2. Pengamatan di Lapangan

3.5.2.1. Parameter Pertumbuhan dan Perkembangan Bibit

1. Tinggi Bibit Karet

Pengamatan tinggi tanaman karet dilakukan setiap seminggu sekali. Pengukuran tinggi tanaman karet menggunakan meteran. Pengukuran tinggi tanaman yaitu mulai dari titik tumbuh tunas pada bibit (2 cm dari titik tumbuh tunas) sampai pada ujung titik tumbuh bibit. Pengamatan tinggi tanaman mulai dari aplikasi asap cair sampai dengan 4 msa (1 bulan setelah aplikasi) kemudian dihitung pertambahan tinggi tanaman dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Penambahan} = \text{TT 1 MSAAC(sesudah)} - \text{TT PAAC}$$

Keterangan:

TT = tinggi tanaman

TT 1 MPAAC = tinggi tanaman 1 minggu setelah aplikasi asap cair

TT PAAC = tinggi pada aplikasi asap cair

2. Jumlah Daun

Pengamatan jumlah daun dilakukan dengan cara menghitung jumlah daun yang terbentuk dari tunas hasil okulasi setiap seminggu sekali. Pengamatan dilakukan mulai dari pada aplikasi asap cair sampai dengan 4msa (empat minggu setelah aplikasi asap cair)

$$\text{Penambahan} = \text{JD 1 MSAAC} - \text{JD PAA}$$

Keterangan:

JD = jumlah daun

JD 1 MPAAC = jumlah daun 1 minggu setelah aplikasi asap cair

JD PAAC = jumlah daun pada aplikasi asap cair

3. Diameter Tunas

Pengukuran diameter tunas hasil okulasi dimulai pada aplikasi asap cair dengan interval 1 minggu sekali sampai akhir penelitian. Untuk keseragaman pengukuran dilakukan 2 cm diatas titik tumbuh tunas pada setiap tanaman sampel dengan mengukur dua sisi tunas. Pengukuran dilakukan dengan menggunakan jangka sorong dengan satuan mm.

$$\text{Penambahan} = \text{DT 1 MSAAC} - \text{DT PAAC}$$

Keterangan:

DT = diameter tunas

DT 1 MPAAC = diameter tunas 1 minggu setelah aplikasi asap cair

DT PAAC = diameter tunas pada aplikasi asap cair

4. Volume Akar

Pengukuran volume akar dapat dihitung dengan dengan cara memotong seluruh akar lalu mencucinya dengan air sampai bersih, setelah itu lalu akar ditiriskan. Pengukuran volume akar dilakukan dengan cara memasukkan akar kedalam gelas ukur / erlenmeyer kemudian tuangkan air sebanyak 600 ml kedalam erlenmeyer yang tidak berisi akar, lalu tuangkan air tersebut kedalam erlenmeyer yang berisi akar sampai pada volume 600 ml. Kemudian hitung sisa air pada erlenmeyer yang tidak berisi akar dengan gelas ukur. Sisa dari volume air tersebut lah sebagai volume akar.

5. Volume Akar Terinfeksi

Pengukuran volume akar yang terinfeksi dapat dilakukan dengan cara memotong akar yang terinfeksi pada setiap tanaman lalu memasukkannya kedalam tabung reaksi, kemudian tabung reaksi yang masih kosong diisi dengan air sebanyak 40 ml, setelah itu tuangkan air pada tabung reaksi kedalam tabung reaksi yang berisi akar sampai pada volume 40 ml. Hitung volume air yang tersisa pada tabung reaksi yang hanya berisikan air, hasil dari pengukuran tersebut adalah volume akar yang terinfeksi.

3.5.2.2. Parameter Serangan

1. Persentase Serangan (*R. microporus*)

Pengamatan persentase serangan dilakukan 14 hari sekali selama 1 bulan setelah aplikasi asap cair, pengamatan dilakukan dengan cara membuka tanah disekitar leher akar dan mengamati miselium berwarna putih yang menyelimuti

permukaan akar dan melakukan penentuan skala serangan sesuai nilai skala serangan JAP menurut (Pawirosoemardjo & Purwantara, 1985) yaitu sebagai berikut:

skala :

0 = Tanaman sehat, akar tanaman bebas patogen

1 = Permukaan akar tanaman telah ditumbuhi miselium jamur

2 = Kulit akar tanaman telah terinfeksi, dan terjadi perubahan warna pada kulit akar.

3 = Bagian kulit dan akar tanaman telah terinfeksi oleh patogen dan jaringan akar sudah mulai membusuk

4 = Tanaman hampir mati atau mati karena jaringan akar tanaman telah membusuk sampai ke pangkal batang dan daun mulai berguguran.

Setelah mengetahui nilai kategori serangan, kemudian ditentukan intensitas serangan *R. microporus* dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

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

Keterangan:

I = Intensitas serangan

n = Jumlah akar tanaman sakit dari setiap kategori serangan

V = Nilai skala dari setiap kategori serangan

Z = Nilai skala dari kategori serangan tertinggi (4)

N = Jumlah tanaman yang diamati

(Triwahyu & Suryaminarsih, 2009).

Nilai skor penyakit

- Skor : 0 (sehat) = Bagian tanaman terserang 0 %
- 1 (ringan) = Bagian tanaman terserang 1-25 %
- 2 (sedang) = Bagian tanaman terserang 26-50 %
- 3 (berat) = Bagian tanaman terserang 50-75 %
- 4(sangat berat)= Bagian tanaman terserang > 75 %

