

### III. BAHAN DAN METODE

#### 3.1. Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Penyakit Tumbuhan, Laboratorium Tanaman dan di Kebun Percobaan Unit Pelaksana Teknis (UPT) Fakultas Pertanian, Universitas Riau Pekanbaru, Kampus Bina Widya, Kecamatan Tampan, Kelurahan Simpang Baru Panam, Kota Pekanbaru, dengan ketinggian tempat 10 m dpl. Penelitian ini telah dilaksanakan selama 5 bulan yang dimulai dari bulan Mei sampai bulan Agustus 2009.

#### 3.2. Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang dipergunakan dalam penelitian ini adalah benih *Acacia crassiparva* yang didapat dari salah satu pabrik yang ada di Riau, *dregs* padat yang didapat dari salah satu pabrik kertas yang ada di Riau, tanah gambut yang di ambil dari desa Rimbo Panjang Kecamatan Tambang Kabupaten Kampar, isolat *Trichoderma harzianum* (T-ak) dari Rizosfir akasia dan sumber inokulum berupa isolat *Fusarium oxysporum* yang diperoleh dari salah satu pabrik yang ada di Riau, pupuk NPK *blue*, aquades steril, alkohol 70%, plastik tahan panas, pasir, paralon dengan diameter 1 inci, kertas label, *aluminium foil*, kertas saring, tissue gulung, jagung dan *polybag* dengan ukuran 1 kg, medium PDA (*Potato Dextrose Agar*).

Alat-alat yang digunakan adalah cawan petri, tabung reaksi, rak tabung reaksi, gelas piala 1000 ml, erlenmeyer 250 ml, gelas ukur, batang pengaduk, pipet tetes, jarum ose, *cut borer* (pemotong agar), *autoclave*, inkubator (ruang inkubasi), oven, kulkas, kompor gas, *hand sprayer*, *laminar air flow cabinet* (ruang isolasi), timbangan analitik, lampu spiritus, mikroskop binokuler, *objek glass* dan *cover glass*, kuas steril, kertas saring, kain kassa, pisau steril, cangkul, parang, baskom, saringan, meteran, hektar, sarung tangan balon dan alat-alat tulis.

### 3.3. Metode Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan secara eksperimen dengan menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri dari 7 perlakuan dan 3 ulangan, sehingga didapat 21 unit percobaan. Setiap unit percobaan terdiri dari 7 bibit yang ditanam dalam *polybag* (denah penelitian dapat dilihat pada Lampiran 1). Perluannya adalah uji berbagai dosis *dregs* pada penggunaan *T. harzianum* (T-ak) untuk pengendalian penyakit rebah semai pada pembibitan akasia di medium gambut.

$$D_0 = 0 \text{ g dregs/kg gambut}$$

$$D_1 = 5 \text{ g dregs/kg gambut}$$

$$D_2 = 10 \text{ g dregs/kg gambut}$$

$$D_3 = 15 \text{ g dregs/kg gambut}$$

$$D_4 = 20 \text{ g dregs/kg gambut}$$

$$D_5 = 25 \text{ g dregs/kg gambut}$$

$$D_6 = 30 \text{ g dregs/kg gambut}$$

Data yang diperoleh dari hasil penelitian ini di analisis secara statistik dengan menggunakan analisis ragam. Model linier digunakan adalah:

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

Dimana:  $Y_{ij}$  = Hasil pengamatan pada suatu unit percobaan dalam perlakuan *dregs* ke- $i$  yang mendapat ulangan ke- $j$

$\mu$  = Nilai tengah umum

$\tau_i$  = Pengaruh *dregs*

$\varepsilon_{ij}$  = Galat percobaan pada perlakuan *dregs* ke- $i$  dan pada ulangan ke- $j$

Hasil analisis ragam dilanjutkan dengan uji lanjut *Duncan's New Multiple Range Test* (DNMRT) taraf 5%.

### 3.4. Pelaksanaan Penelitian

#### 3.4.1. Di laboratorium

##### 3.4.1.1. Penyiapan Sumber Inokulum *Fusarium oxysporum*

Isolat *F. oxysporum* yang digunakan adalah isolat yang telah diuji patogenesisnya pada bibit akasia yakni mempunyai patogenesis  $> 75\%$ . Isolat *F. oxysporum* direisolasi pada medium PDA dan diinkubasikan selama 15 hari. Perbanyakan massal dilakukan pada medium CMS. Medium ini dimasukkan sebanyak 100 g ke dalam kantong plastik tahan panas (volume 1 kg) dan pada ujungnya dipasang cincin pipa paralon dan ditutup dengan kapas. Medium ini disterilkan dalam *autoclave* selama 1 menit pada suhu  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  dan tekanan 15 atm, sterilisasi ini dilakukan 2 kali. Substrat yang telah dingin diinokulasi dengan isolat *F. oxysporum* dengan ukuran  $3 \times 1\text{ cm}^2$ . Biakan *F. oxysporum* pada medium CMS tersebut diinkubasi selama 14 hari.

##### 3.4.1.2. Penyiapan *T. harzianum*.

Isolat *T. harzianum* (T-ak) direisolasi dengan memindahkan hifa yang tumbuh ke dalam medium PDA (Komposisi dan cara kerja pembuatan PDA dapat dilihat pada Lampiran 2) dalam cawan petri dengan menggunakan jarum ose yang telah disterilkan dengan cara pemijaran dan didinginkan yang dilakukan di dalam ruangan isolasi. Isolasi ini dilakukan sampai mendapatkan biakan *T. harzianum* (T-ak) yang murni dan homogen.

Biakan murni tersebut diperbanyak lagi ke dalam erlenmeyer 250 ml yang berisi 50 ml PDA dan diinkubasi selama 7 hari. Suspensi konidia diperoleh dengan menambahkan 15 ml aquades steril ke dalam biakan *T. harzianum* (T-ak) di dalam erlenmeyer. Kemudian dilepaskan dengan kuas steril. Perbanyakan masal jamur *T. harzianum* (T-ak) dilakukan dengan mengambil sebanyak 5 ml/kantong dan diinkubasi selama 14 hari pada medium jagung. Komposisi dan cara kerja pembuatan medium jagung dapat dilihat pada Lampiran 3.

### 3.4.2. Di lapangan

#### 3.4.2.1. Uji Patogenesitas

Uji patogenesitas dilakukan dengan menggunakan 20 bibit akasia di dalam *polybag* yang berisi tanah gambut 1 kg. Setiap *polybag* diinokulasi dengan 15 g inokulum *F. oxysporum* dalam bentuk media CMS menurut metode Habazar *et al* (1994). Komposisi dan cara kerja dapat dilihat pada Lampiran 4. Kemudian diinkubasi selama 7 hari. Setelah itu 4 benih disemai pada masing-masing *polybag* dan diamati gejala penyakit yang muncul dengan ciri yaitu daun berubah warna menjadi kuning dan layu, terdapat pembusukan pada batang yang berada diatas permukaan tanah, bibit kehilangan turgor dan pada tingkat serangan yang lebih berat dapat menyebabkan bibit menjadi rebah dan akhirnya mati.

#### 3.4.2.2. Persiapan Medium Tanam

Tanah gambut diambil di daerah Rimbo Panjang dengan kematangan kategori saprik. Teknik pengambilannya yaitu secara acak dengan ke dalaman 0-40 cm. Tanah yang digunakan dalam penelitian ini tidak dilakukan analisis tanah karena merujuk dari hasil penlitian Elfina *et. al* (2007) sudah diteliti sebelumnya pada lokasi yang sama dan hanya dilakukan analisis pH, kemudian tanah gambut yang diambil dibersihkan dari sisa-sisa tanaman dan diaduk sampai homogen.

#### 3.4.2.3. Persiapan Tempat Penelitian

Tempat yang digunakan adalah lahan yang memiliki topografi datar. Kemudian dilakukan pengukuran luas tempat, yaitu seluas (5X6) m yang digunakan untuk meletakkan medium percobaan dengan jarak (30X15) cm. Tempat yang telah diukur dibersihkan dari gulma atau sisa tanaman lainnya dengan menggunakan cangkul.

#### 3.4.2.4. Pemberian Naungan

Pemberian naungan bertujuan untuk mengurangi pengaruh langsung sinar matahari terhadap bibit akasia. Naungan dibuat menghadap ke timur, dengan ketinggian tiang pada bagian timur 1,70 m dan bagian barat 1,50 m dan atap naungan terdiri dari pelepah sawit. Pada bulan pertama 1/3 naungan dikurangi, pada bulan ke dua dikurangi lagi 1/3, dan pada bulan ketiga tanpa naungan.

### 3.4.2.5. Pemberian *Dregs*

*Dregs* diberikan 2 minggu sebelum pemberian *T. harzianum* (T-ak) sesuai dengan perlakuan. Cara pemberian *dregs* yaitu dengan menaburkan pada medium tanam dan diaduk rata sampai *dregs* dan tanah tercampur rata. Setelah itu campuran *dregs* dan tanah diinkubasi selama 2 minggu.

### 3.4.2.4.6. Introduksi Jamur Antagonis

Introduksi jamur antagonis *T. harzianum* (T-ak) dilakukan dua minggu setelah pemberian *dregs* dan 6 minggu sebelum penyemaian benih dengan menggunakan metode Habazar *et al* (1994), yaitu untuk setiap kg tanah ditambahkan 25 g biakan *T. harzianum* (T-ak) dari medium jagung, kemudian diaduk sampai homogen dan diinkubasi selama 4 minggu.

### 3.4.2.7. Infestasi Jamur Patogen

Infestasi jamur patogen dilakukan 4 minggu setelah pemberian Introduksi jamur antagonis dan satu minggu sebelum penyemaian benih dengan menggunakan metode Habazar *et al* (1994), yaitu untuk setiap kg tanah ditambahkan 15 g biakan *F. oxysporum* dalam medium CMS, kemudian diaduk sampai homogen dan diinkubasi selama 1 minggu.

### 3.4.2.8. Penyemaian

Benih akasia disemai 8 minggu (2 bulan) setelah pemberian *dregs*, *T. harzianum* (T-ak) dan *F. oxysporum*. Penyemaian dilakukan dengan cara memasukkan 2 benih ke dalam *polybag* dengan ke dalaman 1 cm dan ditutup kembali dengan tanah. Benih yang diperlukan adalah 295 benih.

### 3.4.2.9. Pemeliharaan

#### 3.4.2.9.1. Penyiraman

Penyiraman dilakukan dua kali sehari yaitu pada pagi hari dan sore hari, tergantung pada kondisi lingkungan dan cuaca. Apabila terjadi hujan tidak dilakukan penyiraman, penyiraman dilakukan dengan volume yang sama.

### 3.4.2.9.2. Penyiangan

Penyiangan di pembibitan ini terdiri dari dua macam yaitu penyiangan di sekitar *polybag* dan di dalam *polybag*. Penyiangan di sekitar *polybag* bertujuan untuk membersihkan areal pembibitan dari vegetasi lain selain bibit akasia dengan menggunakan cangkul dan parang. Penyiangan di dalam *polybag* bertujuan untuk membersihkan gulma yang berada dalam *polybag* dengan cara mencabut gulma.

### 3.4.2.9.3. Penjarangan

Penjarangan dilakukan dengan mengurangi jumlah bibit sehingga dalam *polybag* hanya terdapat satu bibit. Penjarangan dilakukan setelah bibit berumur satu minggu dengan tujuan untuk menyeragamkan besarnya bibit, mengurangi kelembaban, mendapatkan cahaya matahari dan air yang merata, serta untuk pengerasan dan menguatkan batang (Nurzihad, 1998).

### 3.4.2.9.4. Pemupukan

Pemupukan akasia menggunakan NPK *blue* 20 g/bibit yang dilakukan dua kali. Pemupukan pertama dilakukan setelah inokulasi *T. harzianum* (T-ak) dengan dosis 10 g/bibit, dengan cara menaburkan pada medium tanam didalam *polybag*. Pemupukan kedua dilakukan pada saat tanaman berumur 1,5 bulan setelah semai dengan dosis yang digunakan adalah 10 g/bibit.

### 3.4.2.9.5. Pengendalian Hama

Pengendalian hama dilakukan secara mekanik yaitu dengan mengambil hama yang menyerang bibit di sekitar areal pertanaman. Pengendalian penyakit tidak dilakukan karena dengan penggunaan *T. harzianum* (T-ak) diharapkan dapat mengendalikan penyakit.

### 3.5. Pengamatan

#### 3.5.1. Di lapangan

##### 3.5.1.1. Masa Inkubasi ( hari )

Gejala serangan pertama (masa inkubasi) *F. oxysporum* pada bibit akasia ditandai dengan adanya gejala rebah semai yang mempunyai ciri yaitu daun berubah warna menjadi kuning dan layu, terdapat pembusukan pada batang yang berada diatas permukaan tanah, bibit kehilangan turgor dan pada tingkat serangan yang lebih berat dapat menyebabkan bibit menjadi rebah dan akhirnya mati.

##### 3.5.1.2. Persentase Bibit Terserang Setelah Muncul ke Permukaan Tanah

Persentase bibit yang terserang setelah muncul ke permukaan tanah dihitung dengan rumus:

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

Keterangan:

K = Persentase bibit yang terserang setelah muncul ke permukaan tanah

n = Jumlah bibit yang terserang

N = Jumlah bibit yang disemai

Pengamatan dilakukan setelah bibit mulai muncul ke permukaan tanah sampai akhir pengamatan dengan interval waktu 1 x 3 hari.

##### 3.5.1.3. Tinggi Bibit (cm)

Pengukuran pertama dilakukan 2 minggu setelah tanam (2 MST), tinggi bibit diukur setiap 2 minggu sampai bibit berumur 3 bulan, tinggi bibit diukur 2 cm dari leher akar sampai titik tumbuh tertinggi dan tempat pengukuran ditandai dengan memberi ajir.

##### 3.5.1.4. Ratio Tajuk Akar

Pengamatan Ratio Tajuk Akar dilakukan dengan cara memisahkan bagian tajuk dan akar kemudian dimasukkan kedalam amplop dengan ukuran 37,5 cm x 27,5 cm, selanjutnya amplop tersebut dimasukkan ke dalam oven pengeringan selama 2 hari dengan suhu 70°C, setelah itu dilakukan penimbangan berat

kering bagian tajuk dan akar tanaman dengan menggunakan timbangan analitik. Nilai Ratio Tajuk Akar dapat diperoleh dengan rumus :

$$\text{Ratio Tajuk Akar} = \frac{\text{Berat Kering Tajuk Tanaman}}{\text{Berat Kering Akar Tanaman}}$$

### 3.5.1.5. Indeks Mutu Bibit

Indek mutu bibit diukur dengan rumus Dickson *et al*, 1960.

$$\text{Indek Mutu Bibit}(q) = \frac{\text{Berat Kering Total (g)}}{\text{Tinggi(cm)/Diameter(mm) + Berat Kering Tajuk(g)/Berat Kering Akar(g)}} \times 100\%$$

Bibit baik dan mampu bertahan dilapangan jika memiliki nilai  $q > 0,09$ .

## 3.6. Pengamatan Pendukung

### 3.6.1. Pengukuran Suhu Medium dalam *Polybag* (°C)

Pengukuran suhu tanah dilakukan pada medium tanam pada masing-masing perlakuan. Pengukuran suhu ini dilakukan dengan cara menancapkan bagian ujung termometer ke dalam tanah sedalam 10 cm. Termometer tersebut dibiarkan selama 10 menit. Pengukuran dilakukan setiap hari pada pagi pukul 07.00 WIB, siang pukul 12.00 WIB dan sore pada pukul 17.00 WIB. Setelah didapatkan hasilnya untuk masing-masing waktu kemudian dijumlahkan dan dicari suhu rata-rata harinya dengan rumus:

$$T(^{\circ}\text{C}) = \frac{2 \times T \text{ pagi} + T \text{ siang} + T \text{ sore}}{4}$$

Hasil pengukuran suhu medium dalam *polybag* dapat dilihat pada Lampiran 5a.

### 3.6.2. Pengukuran Suhu dalam Naungan (°C)

Pengukuran suhu didalam naungan dilakukan dengan menggunakan termometer yang digantungkan di dalam naungan. Pengukuran suhu ruang naungan dilakukan setiap hari yaitu pukul 07.00 WIB, siang pukul 12.00 WIB dan sore pukul 17.00 WIB. Kemudian dijumlahkan dan dicari suhu rata-rata harinya dengan rumus:

$$T(^{\circ}\text{C}) = \frac{2 \times T \text{ pagi} + T \text{ siang} + T \text{ sore}}{4}$$

Hasil pengukuran suhu medium dalam naungan dapat dilihat pada Lampiran 5b.

### 3.6.3. Pengukuran pH Tanah dalam *Polybag*

Pengukuran pH tanah dalam *polybag* dilakukan sebanyak empat kali yaitu di awal, setelah inkubasi *dreg* saat sebelum tanam, dan pada akhir penelitian dengan mengambil sampel tanah sebanyak 10 g. Sampel tanah tersebut diukur pH Laboratorium Tanah Fakultas Pertanian, Universitas Riau, Pekanbaru. Hasil pengukuran pH tanah dalam *polybag* dapat dilihat pada Lampiran 6.

Tabel 1. Rata-rata Masa Inkubasi *F. oxysporum* di Dumbarelak Akumulasi pada Penggunaan *T. harriense* (T-ak).

Perlakuan	Masa Inkubasi (hari)
D6-30 g <i>dreg</i> + 0 g gambut	0,707 a
D5-25 g <i>dreg</i> + 5 g gambut	0,707 a
D4-20 g <i>dreg</i> + 10 g gambut	2,569 a
D2-10 g <i>dreg</i> + 20 g gambut	3,326 a
D0-0 g <i>dreg</i> + 30 g gambut	3,589 a
D1-5 g <i>dreg</i> + 5 g gambut	4,082 a
D3-15 g <i>dreg</i> + 15 g gambut	4,149 a

Angka angka yang berbeda pada huruf yang sama diartikan oleh hasil uji beda nyata bermakna (DMS) pada taraf 5% setelah di transformasi ke  $\ln \cdot Y + 2$ .

Tabel 1 memperlihatkan bahwa masa inkubasi *F. oxysporum* dengan berbagai dosis *dreg* dan *T. harriense* (T-ak) pada semua perlakuan tidak berbeda nyata. Hal ini diduga karena *T. harriense* sudah beradaptasi dengan rhizosfer untuk perkembangannya sehingga *T. harriense* lebih cepatnya dapat mengondisikan jamur patogen *F. oxysporum*. Selain itu pada *T. harriense* masih aktif dalam melakukan perombakan bahan organik yang terdapat pada tumpukan gambut untuk kebutuhan nutrisinya dengan bantuan enzim besar yaitu ekstraseluler (Li, 2011) glukonase dan kitinase. Menurut Griffin (1981) *T. harriense* ini untuk dapat tumbuh dan berkembang memerlukan nutrisi esensial yaitu karbon, hidrogen, oksigen, fosfor, nitrogen, sulfur dan kalium. Kekurangan nutrisi esensial akan menyebabkan terganggunya proses fisiologi jamur. Mikroorganisme akan menggunakan nitrogen sebagai sumber energi untuk berkembang baik dan mendekomposisi bahan organik.