

### III. BAHAN DAN METODE

#### 3.1. Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Penyakit Tumbuhan dan di Rumah Kasa Sentral Pengembangan Pertanian (SPP) Fakultas Pertanian Universitas Riau Pekanbaru, dengan ketinggian tempat kurang lebih 10 m diatas permukaan laut. Penelitian ini dilaksanakan selama 5 bulan dimulai bulan Februari sampai Juni 2009.

#### 3.2. Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan untuk penelitian ini adalah kulit udang putih (*Penaeus merguensis*), NaOH, HCL, asam cuka, kecambah kelapa sawit hasil persilangan Dura X Pisifera, daun kelapa sawit yang terserang *Cercospora* sp., *Potato Dextrose Agar* (PDA), plastik tahan panas, plastik transparan, aquades steril, alkohol 70 %, kertas saring steril, *cling wrap* (plastik pembungkus), *aluminium foil*, kapas steril, tisu, indikator pH, dan *polybag* ukuran 14 x 22 cm.

Alat yang digunakan yaitu otoklaf, oven, cawan petri, pinset steril, *cork borer* (pemotong agar), pipet tetes, erlenmeyer volume 250 ml, gelas piala volume 1000 ml, gelas ukur, lampu bunsen, *laminar air flow cabinet*, kulkas, inkubator, jarum inokulasi steril, kaca objek, kaca penutup, mikroskop binokuler, *haemocytometer*, panci, dandang, timbangan analitik, timbangan biasa, gembor, kompor gas, batang pengaduk, meteran, cangkul, ember, gunting, blender, saringan kain, *sprayer* volume 50 ml, pisau steril, kertas milimeter, termohigrometer, dan alat-alat tulis lainnya.

#### 3.3. Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan secara eksperimen menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 6 perlakuan 4 ulangan sehingga terdapat 24 unit percobaan. Pada uji penghambatan jamur *Cercospora* sp. pada media PDA tiap unit percobaan terdiri dari 2 cawan petri sehingga dibutuhkan 48 cawan petri dan untuk aplikasi kitosan pada bibit kelapa sawit, tiap unit percobaan terdapat 2 bibit kelapa sawit sehingga dibutuhkan 48 bibit kelapa sawit. Bagan percobaan dapat

dilihat pada Lampiran 1. Perlakuan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tingkat konsentrasi kitosan (K).

$K_0 = 0$  mg kitosan/ml air

$K_1 = 10$  mg kitosan/ml air

$K_2 = 15$  mg kitosan/ml air

$K_3 = 20$  mg kitosan/ml air

$K_4 = 25$  mg kitosan/ml air

$K_5 = 30$  mg kitosan/ml air

Data yang diperoleh dari hasil penelitian dianalisis secara statistik dengan menggunakan analisis ragam dengan model linear sebagai berikut:

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

Keterangan:

$Y_{ij}$  = hasil pengamatan pada suatu unit percobaan pada konsentrasi ke-i ulangan ke-j

$\mu$  = nilai tengah umum

$\alpha_i$  = pengaruh konsentrasi

$\epsilon_{ij}$  = galat percobaan pada konsentrasi ke-i dan ulangan ke-j

Data hasil analisis ragam bila F hitung > F tabel dilakukan uji lanjut dengan uji *Duncan's New Multiple Range Test* (DNMRT) pada taraf 5 %.

### 3.4. Pelaksanaan Penelitian

#### 3.4.1. Di Laboratorium

##### 3.4.1.1. Isolasi Jamur Patogen

Isolasi patogen *Cercospora* sp. diambil dari daun bibit kelapa sawit di Sentral Pengembangan Pertanian (SPP) Fakultas Pertanian yang menunjukkan gejala bercak kecil berwarna cokelat tua, dalam bercak pertama terdapat bercak lagi, terdapat halo klorotik berwarna cerah, dan bercak biasanya bulat kadang-kadang lonjong (Lampiran 2). Bagian daun dipotong setengah bagian yang sakit dan setengah bagian daun yang sehat dengan ukuran 1 cm x 1 cm. Potongan daun yang bergejala penyakit disterilisasi dengan merendam potongan daun tersebut dalam alkohol 70% selama 2 menit lalu dibilas dengan merendam dalam aquades steril selama 2 menit. Potongan daun tersebut diletakkan pada cawan petri yang telah dilapisi kertas saring sebanyak 3 lapis dan ditetesi aquades steril

hingga lembab. Tiap cawan petri terdapat 5 potongan daun yang disusun terpisah. Selanjutnya diinkubasi dalam inkubator selama 1 minggu.

Miselium yang tumbuh dari bagian daun diisolasi kembali pada media PDA dan diinkubasi selama 1 minggu. Hasil isolasi pertama belum murni kemudian dilakukan isolasi kembali pada media PDA hingga didapat isolat murni. Hasil dari isolasi kemudian diidentifikasi secara makroskopis dan mikroskopis untuk memastikan isolat yang didapat benar merupakan jamur *Cercospora* sp. yang meliputi bentuk dan warna miselium, bentuk spora, arah pertumbuhan miselium, bercabang atau tidaknya hifa, bersekat atau tidak. Identifikasi *Cercospora* sp. dilakukan dengan mencocokkan pada buku identifikasi jamur "*Illustrated Genera of Imperfect Fungi*" oleh Barnett dan Hunter (1972). Jika hasil identifikasi isolat yang tumbuh benar merupakan isolat jamur *Cercospora* sp., maka isolat tersebut dapat digunakan sebagai inokulum pada uji aplikasi kitosan terhadap bibit kelapa sawit. Kegiatan isolasi dilakukan di dalam *laminar air flow cabinet* untuk mencegah kontaminasi pada biakan jamur. Hasil isolasi dan identifikasi jamur *Cercospora* sp. dapat dilihat pada Lampiran 3.

#### **3.4.1.2. Uji Patogenesitas**

Uji patogenesitas dilakukan dengan menggunakan 6 bibit kelapa sawit di dalam *polybag*. Setiap bibit diinokulasikan suspensi jamur *Cercospora* sp. dalam bentuk larutan sebanyak 3 ml pertanaman yang disemprotkan ke bagian bawah daun. Setelah itu diamati gejala yang muncul dengan ciri bercak daun kecil berwarna coklat tua. Kemudian bercak daun tersebut direisolasi dan diidentifikasi untuk memastikan patogen tersebut adalah *Cercospora* sp. Hasil reisolasi dan identifikasi dapat dilihat di Lampiran 4.

#### **3.4.1.3. Ekstraksi Kulit Udang Putih untuk Mendapatkan Kitosan**

Ekstraksi kitosan dari kulit udang mengikuti metode Reinisa (2003). Ekstraksi kulit udang melewati 3 tahapan pengolahan yaitu demineralisasi, deproteinisasi, dan deasetilisasi. Kulit yang didapat dari tempat pengolahan udang dicuci dan dibersihkan sehingga tersisa kulit atau cangkang, kemudian tiriskan dan dijemur hingga kering. Selanjutnya kulit udang dihancurkan dengan blender hingga membentuk serbuk kasar. Bagan pembuatan kitosan dari kulit udang dapat dilihat pada Lampiran 5.



Tahap demineralisasi, kulit udang dalam bentuk serbuk kering dicampur dengan asam klorida (HCL) 1 N dengan perbandingan serbuk kulit udang dengan pelarut 1:10 (g/ml), lalu dipanaskan pada suhu 90°C selama 1 jam. Larutan didinginkan dan disaring. Hasil saringan dicuci dengan air dan diukur pHnya dengan menggunakan kertas lakmus sampai didapat pH 7 (netral). Hasil setelah diukur pHnya dikeringkan dengan oven pada suhu 60°C selama 4 jam. Hasilnya masih dalam bentuk serbuk.

Tahap deproteinisasi, serbuk yang telah didemineralisasi kemudian dicampurkan dengan larutan NaOH 3,5 % dengan perbandingan serbuk dengan pelarut 1:10 (g/ml), selanjutnya dipanaskan pada suhu 90°C selama 1 jam. Larutan didinginkan dan disaring. Hasil saringan dicuci dengan air dan diukur pHnya dengan menggunakan kertas lakmus sampai didapat pH 7 (netral). Hasil setelah diukur pHnya dikeringkan dengan oven pada suhu 60°C selama 4 jam. Hasil dari tahap deproteinisasi adalah kitin.

Tahap deasetilisasi, kitin yang terbentuk direbus dengan NaOH 60 % dengan perbandingan kitin dengan pelarut 1:10 (g/ml), kemudian dipanaskan pada suhu 100°C selama 1,5 jam. Larutan didinginkan dan disaring. Hasil saringan dicuci dengan air dan diukur pHnya dengan menggunakan kertas lakmus sampai didapat pH 7 (netral). Hasil setelah diukur pHnya keringkan dalam oven pada suhu 60°C selama 4 jam. Serbuk yang terbentuk dari proses ini adalah kitosan.

Serbuk kitosan yang terbentuk dihaluskan kembali dengan blender hingga benar-benar halus yang bertujuan untuk mempermudah proses kelarutan kitosan. Kitosan disimpan dalam plastik. Sebelum melakukan aplikasi kitosan, dibuat terlebih dahulu larutan induk dengan melarutkan 30 g tepung kitosan dalam 100 ml asam asetat (asam cuka). Aduk merata dengan *orbital shaker* sampai larut kemudian ditambahkan aquades hingga volume larutan menjadi 1 liter.

#### 3.4.1.4. Uji Penghambatan Patogen pada Cawan Petri (*in vitro*)

Sebelum aplikasi kitosan terhadap *Cercospora* sp. pada cawan petri, dilakukan pengenceran pada larutan induk dengan menambahkan aquades steril hingga mencapai masing-masing konsentrasi. Larutan kitosan dituangkan dalam cawan petri sebanyak 0,4 ml/cawan petri. Selanjutnya PDA cair (suhu ± 40°C) sebanyak 10 ml dituangkan ke dalam cawan petri tersebut, kemudian digoyang



agar tercampur merata dengan larutan kitosan. PDA cair kemudian didiamkan hingga membeku.

Pengujian dilakukan dengan menumbuhkan inokulum biakan murni jamur *Cercospora* sp. pada media PDA yang telah dicampur dengan larutan kitosan sesuai dengan konsentrasi masing-masing perlakuan. Kegiatan inokulasi jamur pada PDA dilakukan di dalam *laminar air flow cabinet* untuk mencegah kontaminasi patogen lain. Biakan murni *Cercospora* sp. diambil menggunakan *cork borer* berdiameter 5 mm dan diletakkan di bagian tengah cawan petri pada PDA yang telah diberi perlakuan. Biakan tersebut diinkubasi dengan memasukkan ke dalam inkubator. Pengamatan dilakukan setiap hari sampai pertumbuhan jamur pada tanpa perlakuan memenuhi cawan petri.

### 3.4.2. Di Rumah Kasa

#### 3.4.2.1. Persiapan Tempat Penelitian

Tempat yang akan digunakan adalah Rumah Kasa Sentral Pengembangan Pertanian (SPP) Fakultas Pertanian. Kemudian diukur luas tempat penelitian dengan ukuran 4 m x 3,5 m untuk meletakkan medium percobaan. Jarak antar *polybag* 40 cm dan jarak antar unit 60 cm. Penempatan masing-masing perlakuan pada setiap unit dilakukan secara acak. Tempat yang sudah diukur kemudian dibersihkan dari gulma, sampah, dan sisa-sisa tanaman lainnya dengan menggunakan cangkul.

#### 3.4.2.2. Persiapan Medium Pembibitan

Medium tanam yang digunakan adalah tanah bagian atas (*top soil*) pada ketebalan 10-20 cm yang diambil dari tanah kebun percobaan Sentral Pengembangan Pertanian (SPP) Fakultas Pertanian. Tanah dihaluskan dengan cara diremas dan dikeringanginkan selama 1 minggu. Tanah dicampur dengan pupuk kandang dengan perbandingan 3:1 dan diayak dengan menggunakan ayakan berdiameter 5 mm untuk membuang kotoran yang ada, selanjutnya disterilkan dengan menggunakan dandang selama 1 jam perhari selama 3 hari. Tanah tersebut diisikan kedalam *polybag* berukuran 14 x 22 dengan tebal 0,10 mm.

### 3.4.2.3. Pemberian Naungan

Pemberian naungan bertujuan untuk mengurangi pengaruh langsung sinar matahari terhadap bibit kelapa sawit. Naungan berupa daun kelapa sawit. Naungan dibuat dengan ketinggian 1,60 m dengan ukuran 4 x 3,5 m. Pada bulan pertama sepertiga naungan dikurangi, pada bulan kedua dikurangi lagi sepertiga, dan pada bulan ketiga tanpa naungan.

### 3.4.2.4. Penanaman Kecambah Kelapa Sawit

Kecambah kelapa sawit yang diperoleh dari PPKS Medan ditanam ke dalam *polybag* yang telah berisi medium tersebut sebanyak 96 *polybag*. Setiap *polybag* berisi 1 buah kecambah kelapa sawit. *Polybag* beserta tanaman diletakkan di rumah kaca sampai tanaman berumur 45 hari. Sebanyak 48 bibit kelapa sawit yang seragam diseleksi untuk digunakan pada uji aplikasi kitosan pada bibit kelapa sawit.

### 3.4.2.5. Pemeliharaan

#### 3.4.2.5.1. Penyiraman

Penyiraman dilakukan 2 kali sehari pada pagi dan sore. Penyiraman dilakukan dengan gembor.

#### 3.4.2.5.2. Penyiangan

Penyiangan dilakukan secara fisik dan mekanik dengan membersihkan gulma yang tumbuh di dalam *polybag* dan di sekeliling areal pertanaman.

#### 3.4.2.5.3. Pengendalian hama dan penyakit

Pengendalian hama dilakukan secara mekanik dengan menggunakan kuas terhadap hama kutu daun yang menyerang bibit di sekitar areal penelitian lalu membunuhnya. Pengendalian penyakit bercak daun yang disebabkan oleh Jamur *Cercospora* sp. dilakukan dengan penggunaan kitosan yang diharapkan dapat mengendalikan penyakit tersebut.

### 3.4.2.6. Uji Pengaruh Aplikasi Kitosan terhadap Penyakit Bercak Daun oleh *Cercospora* sp. pada Pembibitan Awal Kelapa Sawit (*in vivo*)

Inokulum jamur *Cercospora* sp. yang digunakan adalah isolat murni yang didapat dari reisolasi jamur patogen. Koloni jamur dengan diameter 0,5 cm dibiakkan dalam cawan petri yang berisi 10 ml media PDA, dan diinkubasi selama 10 hari pada suhu kamar. Suspensi konidia diperoleh melalui penambahan 10 ml

aquades steril ke dalam biakan *Cercospora* sp. di dalam cawan petri, kemudian digoyang-goyang agar konidianya terlepas dan dihitung populasi konidianya dengan *haemocytometer* sampai diperoleh populasi konidia  $1,8 \times 10^5/\text{ml}$ . Perhitungan kepadatan spora konidia bertujuan mendapatkan keseragaman potensi inokulum pada tiap perlakuan.

Sebelum aplikasi kitosan dilakukan, suspensi konidia dari jamur *Cercospora* sp. diinokulasikan dengan cara menyemprotkan ke seluruh permukaan bagian bawah daun bibit kelapa sawit dengan menggunakan sprayer volume 50 ml sebanyak 3 ml tiap bibit dan disungkup selama 24 jam dengan plastik transparan. Penyemprotan dilakukan pada siang hari jam 12.00 WIB. Kemudian tanaman yang telah diinokulasikan jamur tetap dibiarkan berada di rumah kaca sampai timbulnya gejala awal yaitu berupa bercak kecil berwarna cokelat tua (15 hari). Setelah itu dilakukan penyemprotan larutan kitosan secara merata pada seluruh bagian tanaman yang telah diinokulasikan jamur dengan *sprayer* volume 50 ml sesuai dengan masing-masing perlakuan sebanyak 7 ml tiap bibit. Kemudian tanaman yang telah diberi perlakuan tetap dibiarkan berada di lapangan untuk diamati selanjutnya.

### 3.5. Pengamatan

#### 3.5.1. Di Laboratorium

##### 3.5.1.1. Masa Inkubasi Jamur *Cercospora* sp. pada Media PDA (hari)

Masa inkubasi diamati dengan melihat miselium yang tumbuh pada media PDA. Pengamatan dilakukan setelah inokulasi jamur dan aplikasi kitosan pada tiap unit percobaan dalam cawan petri hingga pertumbuhan jamur pada tanpa perlakuan memenuhi cawan petri. Timbulnya pertumbuhan jamur ditandai dengan tumbuhnya miselium pertama pada pinggiran koloni jamur yang pertama pada media PDA.

##### 3.5.1.2. Diameter Koloni Jamur *Cercospora* sp. (mm)

Pengamatan diameter koloni dilakukan pada saat koloni pada tanpa perlakuan kitosan memenuhi cawan petri (6 hari setelah inokulasi). Cara kerja pengamatan diameter koloni dengan membuat garis vertikal dan horizontal yang saling berpotongan dan membagi cawan petri menjadi empat bagian yang sama besar. Titik perpotongan antara kedua garis berada tepat pada titik pusat koloni



jamur. Pengukuran diameter dilakukan dengan menghitung pertumbuhan miselium dari suatu titik terluar pertumbuhan koloni sampai titik yang lain dalam setiap garis yang dibuat secara horizontal dan vertikal. Alat yang digunakan dalam pengukuran adalah kertas skala dengan ukuran millimeter.

### 3.5.1.3. Kemampuan Menghambat Kitosan terhadap Jamur *Cercospora* sp. (%)

Kemampuan menghambat kitosan terhadap jamur *Cercospora* sp. dihitung pada saat koloni jamur pada tanpa perlakuan kitosan memenuhi cawan petri. Kemampuan menghambat tersebut dihitung merujuk rumus Pandey dkk. (1982) dalam Noveriza dan Tombe (2003):

$$P = \frac{a-b}{a} \times 100\%$$

Keterangan:

P = kemampuan menghambat kitosan terhadap jamur *Cercospora* sp.

a = diameter koloni jamur pada tanpa perlakuan kitosan

b = diameter koloni jamur pada perlakuan kitosan

## 3.5.2. Di Rumah Kasa

### 3.5.2.1. Intensitas Serangan Penyakit Bercak Daun (%)

Penghitungan intensitas serangan penyakit bercak daun dilakukan pada saat umur bibit kelapa sawit 4 bulan. Intensitas serangan bercak daun pada bibit kelapa sawit dihitung dengan rumus gejala bervariasi (Natawigena, 1993).

Rumus intensitas serangan untuk gejala bervariasi:

$$I = \frac{\sum_{i=1}^n n_i \times v_i}{Z \times N} \times 100\%$$

Keterangan :

I = intensitas serangan

$n_i$  = daun bibit kelapa sawit yang diamati tiap kategori serangan.

$v_i$  = nilai skala kerusakan dari tiap kategori serangan

Z = nilai skala kerusakan tertinggi dari tiap kategori serangan

N = banyak daun bibit kelapa sawit yang diamati



Skala yang digunakan dalam penilaian serangan penyakit ini merujuk metode **Rahaju (1999)**, yaitu:

0 = tidak ada bercak atau gejala

1 = jumlah bercak (  $1 \leq 20\%$  )

2 = jumlah bercak (  $21 \leq 40\%$  )

3 = jumlah bercak (  $41 \leq 60\%$  )

4 = jumlah bercak (  $\geq 61\%$  )

### 3.5.2.2. Pengamatan Pendukung

#### 3.5.2.2.1. Pengukurun Suhu ( $^{\circ}\text{C}$ )

Pengukuran suhu dilakukan setiap hari pada pagi pukul 07.00 WIB, siang pukul 12.00 WIB, dan sore pada puku 17.00 WIB dengan menggunakan termometer pada termohigrometer yang diletakkan tepat ditengah areal penelitian (data suhu terlampir pada Lampiran 9). Selanjutnya dicari suhu rata-rata hariannya dengan rumus:

$$Tr = \frac{2x t \text{ pagi} + t \text{ siang} + t \text{ sore}}{4}$$

Ket:  $Tr$  = suhu rata-rata

$t$  = suhu

#### 3.5.2.2.2. Pengukuran Kelembaban (%)

Pengukuran kelembaban dilakukan setiap hari pada pagi pukul 07.00 WIB, siang pukul 12.00 WIB, dan sore pada puku 17.00 WIB dengan menggunakan higrometer pada termohigrometer yang diletakkan tepat ditengah areal penelitian (data kelembaban terlampir pada Lampiran 9). Selanjutnya dicari kelembaban rata-rata hariannya dengan rumus:

$$Kr = \frac{2x k \text{ pagi} + k \text{ siang} + k \text{ sore}}{4}$$

Ket:  $Kr$  = kelembaban rata-rata

$k$  = kelembaban