

### III. PROSEDUR KERJA

#### 4.1 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Penyakit Tumbuhan Faperta UNRI, Laboratorium Tanah Faperta UNRI dan Rumah Kaca di Kebun Percobaan Sentra Pengembangan Pertanian (SPP) Fakultas Pertanian Universitas Riau Jalan Bina Widya Desa Simpang Baru Kecamatan Tampan Pekanbaru, dengan ketinggian tempat 10 m dpl. Penelitian ini dilaksanakan selama 10 bulan dimulai bulan Maret 2011 sampai Desember 2011.

#### 4.2 Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang digunakan adalah : benih padi sawah varietas IR 42, tanah sawah, pupuk urea, SP 36 dan KCl, isolat *Trichoderma pseudokoningii*, *T.harzianum*, *T. koningii* dan isolat *T. viride*, larutan 1 N KCl, larutan penyangga (buffer pH 4 dan pH 7, indikator bromkresol hijau, klorofenol merah, Bromtimol biru, larutan 1 N Kalium kromat, asam sulfat pekat, barium klorida, sakarosa baku, natrium sulfat anhidrat, Serbuk selenium, larutan natrium hidroksida, asam borat, Indikator campuran hijau bromkresol dan merah metil, Natrium hidroksida, etanol, Calcium, indikator kalkon, Magnesium indikator Eriokrom hitam T, NH<sub>4</sub>Cl, NH<sub>4</sub>OH, Hidroksilamin hidroksida, Kalium Sianida, Kalium ferrosianida, Triatenolamine, NH<sub>4</sub>, 1 amino 2naftol 4 sulfaonat, Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, Molibdat, Hidrogen peroksida, batu didih, karborandum. HNO<sub>3</sub>, Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>, Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> 4H<sub>2</sub>O, SnCl<sub>2</sub>, Trisodium cobalnitrit, sekam (serbuk gergaji), dedak sebagai substrat stater *Trichoderma*, aquades steril, plastik tahan panas, paralon dengan diameter 1 inci, kertas label, alkohol 70%, *aluminium foil*, dan tisu gulung,.

Alat-alat yang digunakan adalah : ember, cangkul cawan petri, tabung reaksi, rak tabung reaksi, gelas piala 200 ml, gelas piala 500 ml, mikropipet, pipet tetes, mikroskop, *object glass*, *cover glass*, jarum inokulasi, elemenyer 250 ml, kuas, elektroda gelas, ph meter, kertas indikator pH, piring porselen, tabung plastik 50 ml yang bertutup automatic mixer, botol semprot plastik,, pipet takar 50 ml, pipet gondok, buret, gelas ukur 40 ml labu ukur 100 ml, labu ukur 250 ml. Unit destilasi Kjedaahl, corong kaca, labu ekstraksi, pipet, spektrofotometer, AAS (*Atonic Absorbtion Specthrofotometer*), termohigrometer. Milkrochamber, *cruss porselen*, gelas ukur, batang pengaduk, jarum ose, pinset, autoklaf, ruang isolasi, ruang inkubasi, lampu *bunsen*, timbangan analitik, kompor, cangkul, gembor,

ember, *hand sprayer*, parang, ani-ani, ajir ayakan, sekop, meteran, jangka sorong, amplop, penggaris, buku dan alat tulis lainnya.

#### 4.3 Rancangan Percobaan

Penelitian ini dilakukan secara eksperimen dengan menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 5 perlakuan dan 3 ulangan, sehingga diperoleh 15 unit percobaan. Tiap unit percobaan terdiri dari 4 tanaman padi yang ditanam dalam pot (ember). Perilakunya adalah penggunaan berapa isolat agens hayati *Trichoderma* sp lokal Riau sebagai bahan aktif biofertilizer dan biopestisida dalam PHT untuk mengendalikan penyakit padi

T0 = Tanpa Isolat *Trichoderma* sp

T1 = Isolat *T. pseudokoningii*

T2 = Isolat *T. harzianum*

T3 = Isolat *T. koningii*

T4 = isolat *T. viride*

#### 4.4 Analisis Data

Data ada tidaknya zona zona hambatan yang terbentuk, analisis kompos yang berbahan aktif trichoderma lokal Riau, analisis tanah awal (sebelum perlakuan), dan analisis tanah pada masing-masing perlakuan setelah penanaman ditabulasi dan dianalisis secara deskriptif. Data parameter pengamatan yang lainnya dianalisis secara statistik dengan sidik ragam dan dilanjutkan dengan uji *Duncan New Multile Range Test* (DNMRT) pada taraf 5 %.

#### 4.5 Pelaksanaan Penelitian

##### 4.5.1 Uji Potensi Beberapa Isolat *Trichoderma* Lokal Riau secara *in vitro*

##### 4.5.1.1 Reisolasi Jamur Antagonis *Trichoderma* spp

Isolat *Trichoderma* lokal Riau (*Trichoderma pseudokoningii*, *T. harzianum*, *T. koningii* dan *T. viride*) diperoleh dari laboratorium Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Riau. Isolat *Trichoderma* spp direisolasi dengan memindahkan hifa yang tumbuh dalam medium PDA pada cawan petri (28-30 C) sampai diperoleh biakan murni.

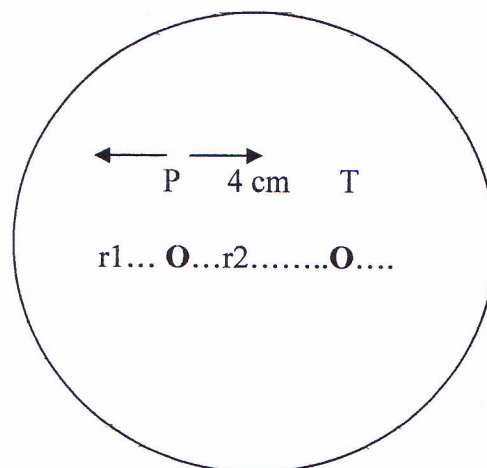
#### 4.5.1.2 Penyiapan Jamur Patogen *R.solani* dan *P.oryzae*

Sumber inokulum jamur patogen *R. solani* diambil dari bagian batang/pelelah tanaman padi yang terserang penyakit busuk pelelah dengan metode penanaman jaringan pada medium PDA. Bagian tanaman yang bergejala penyakit dipotong-potong 1 cm (1/2 bagian yang sehat dan 1/2 bagian bergejala penyakit) Potongan-potongan bagian tanaman tersebut direndam dengan alkohol selama 30 detik dan dibilas dengan aquades, dan diinkubasi dalam inkubator. Miselium yang tumbuh disolasi dan dipindahkan ke medium PDA dalam cawan petri yang lain sampai didapatkan biakan murni. Biakan ini kemudian diidentifikasi secara makroskopis dan mikroskopis yang berpedoman kepada literatur. Hasil identifikasi secara makroskopis dan mikroskopis dapat dilihat pada Lampiran 1

Jamur patogen *P. oryzae* diambil dari daun/malai tanaman padi yang terserang penyakit blas dengan metode penanaman jaringan pada medium PDA. Bagian tanaman yang bergejala penyakit dipotong-potong 1 cm (1/2 bagian yang sehat dan 1/2 bagian bergejala penyakit) Potongan-potongan bagian tanaman tersebut direndam dengan alkohol selama 30 detik dan dibilas dengan aquades, dan diinkubasi dalam inkubator. Miselium yang tumbuh disolasi dan dipindahkan ke medium PDA dalam cawan petri yang lain sampai didapatkan biakan murni. Biakan ini kemudian diidentifikasi secara makroskopis dan mikroskopis yang berpedoman kepada literatur. Hasil identifikasi secara makroskopis dan mikroskopis dapat dilihat pada Lampiran 2

#### 4.5.1.3 Uji antagonis

Pengujian ini menggunakan uji antagonis metode biakan ganda (*dual inoculation*) dengan patogen uji yang digunakan adalah isolat *R. solani* penyebab penyakit busuk pelelah padi. Ambil biakan jamur antagonis *Trichoderma* spp dan jamur patogen *R solani* yang berumur 7 hari pada medium PDA dengan menggunakan pemotong agar (*cork borer*) yang berdiameter 0,5 cm kemudian letakkan secara bersama-sama dalam cawan petri yang berisi PDA. dengan jarak antara kedua potongan tersebut 4 cm. Biakan tersebut di inkubasi selama 7 hari pada suhu kamar (28 -30 °C).



Gambar 1. Pengujian antagonis dengan metode biakan ganda  
Keterangan:

P =Potongan biakan koloni jamur patogen *R. solani*

T =Potongan biakan koloni jamur antagonis *Trichoderma* spp

r1 =Jari-jari koloni patogen yang menjauhi jamur antagonis *Trichoderma* spp

r2 =Jari-jari koloni patogen yang mendekati jamur antagonis *Trichoderma*

#### 4.5.2 Uji Potensi Beberapa Isolat *Trichoderma* Lokal Riau secara *in Planta*

##### 4.5.2.1 Penyiapan Sumber Inokulum Patogen *R. solani* dan *P. oryzae*.

Untuk bahan pengujian pada uji *in planta* pada tanaman di dalam pot biakan *R. solani* ditumbuhkan kembali dalam medium PDA dan dinkubasi selama 7 hari. Selanjutnya dibiakkan secara massal pada medium *Corn Meal sand* (CMS).

Untuk bahan pengujian pada uji *in planta* di dalam pot biakan *P. oryzae* ditumbuhkan kembali dalam medium PDA dan dinkubasi selama 7 hari pada dalam ruang inkubasi. Selanjutnya biakan *P.oryzae* yang ditumbuhkan pada medium PDA ditumbuhkan lagi pada medium *Oat Meal Agar*(OMA). Koloni Jamur *P.oryzae* ini ditumbuhkan pada media ini selama 10 hari dalam ruang inkubasi. Supaya terjadi sporulasi dilakukan penggosokan I dan II. Penggosokan I dilakukan dengan cara menggosok miselia jamur dengan menggunakan kuas gambar yang telah disterilkan. Larutan aquades dan 0,2 g streptomycin per liter air dipakai untuk mempermudah penggosokan. Cawan petri dibiarkan terbuka selama dua hari dalam ruang inkubasi yang berlampu TL berkekuatan 20 watt supaya sporulasi terjadi. Selanjutnya dilakukan penggosokan II yaitu dengan cara menggosok miselia jamur dengan campuran 1 liter aquades dan 1 cc tween 20 dengan menggunakan kuas

gambar yang telah disterilkan. Larutan hasil penggosokan merupakan suspensi spora/konidia jamur *P.oryzae*. Kerapatan konidia dihitung dengan menggunakan haemocytometer. Kerapatan konidia yang dipakai adalah  $3 \times 10^5$  konidia/ml larutan

#### **4.5.2.2 Penyiapan Starter *Trichoderma* spp.**

Isolat *Trichoderma* spp direisolasi dengan memindahkan hifa yang tumbuh ke dalam medium PDA dalam cawan petri dengan menggunakan jarum ose yang telah disterilkan dengan cara pemijaran dan didinginkan yang dilakukan di dalam ruang isolasi. Tujuh hari kemudian diambil koloni jamur yang tumbuh dan diisolasi dengan memindahkan ke dalam cawan petri baru yang telah berisi PDA baru sampai diperoleh biakan murni.

Biakan murni tersebut diperbanyak lagi dalam elemenyer 250 ml yang berisi 50 ml PDA dan diinkubasi selama 7 hari. Suspensi konidia diperoleh dengan menambahkan 15 ml aquades steril ke dalam biakan *Trichoderma* spp di dalam elemenyer, kemudian dilepaskan dengan kuas steril. Perbanyak massal jamur *Trichoderma* spp dilakukan dengan menginokulasikan suspensi *Trichoderma* spp sebanyak 1 cc/kantong dan diinkubasi selama 10 hari pada dedak sekam (1:1).

#### **4.5.2.3 Persiapan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan di dalam rumah kaca (*green house*). Tempat penelitian ini dibersihkan dari rumput-rumputan, sampah, tanah dan lain-lain. Kemudian dilakukan pengukuran luas tempat, yaitu seluas (6,5 m x 4 m) yang digunakan untuk meletakkan pot-pot penelitian

#### **4.5.2.4 Persiapan Medium Tanam**

Medium tanam yang digunakan adalah tanah sawah yang diambil dari persawahan rakyat di desa Tambang Kecamatan Tambang Kabupaten Kampar. Tanah yang telah diambil dibersihkan dari sisa-sisa tanaman, batuan atau sampah-sampah lainnya. Tanah disterilkan dengan cara Tyndalisasi selama 1 jam dengan suhu  $121^\circ\text{C}$ , disterilisasi selama 3 hari berturut-turut dengan selang waktu istirahat selama 24 jam. Kemudian tanah dimasukkan ke dalam pot.

#### 4.5.2.5 Pembuatan Biofertilizer dan Biopestisida yang berbahan aktif *trichoderma* lokal Riau

Jerami padi yang digunakan berasal dari pertanaman padi rakyat di desa Rumbio Kecamatan Rumbio Jaya Kabupaten Kampar. Jumlah kompos untuk masing-masing perlakuan yang dibutuhkan adalah 31,25.



Gambar 2 Biofertilizer dan Biopestisida berupa Trichokompos yang berbahan aktif *Trichoderma* spp lokal Riau

#### 4.5.2.6 Aplikasi Biofertilizer dan Biopestisida yang Berbahan *Trichoderma* Lokal Riau

Aplikasi biofertilizer dan biopestisida berupa trichokompos yang berbahan aktif beberapa isolat *Trichoderma* lokal Riau sesuai perlakuan dengan dosis 5 ton/ha (31,25 g/pot) dengan cara mencampurkan dengan medium tanah yang telah disiapkan, diaduk rata dan diinkubasi selama 1 minggu. Selama inkubasi pengadukan dan penyiraman terus dilakukan dan pada akhir inkubasi dilakukan penyemaian/penanaman benih.

#### 4.5.2.7 Persemaian/Penanaman

Sebelum disemai benih direndam dalam air. Benih yang baik untuk disemai adalah benih yang tenggelam. Kemudian benih yang terpilih (tenggelam) direndam selama 24 jam kemudian ditiriskan selama 2 hari. Selanjutnya disemaikan. Selanjutnya dalam media tanah dan pupuk organik (pupuk kandang sapi). Media tanah disterilkan terlebih dahulu dengan melakukan metode Tyndalisasi yaitu memanaskan tanah tersebut dengan uap panas dalam dandang selama 1 jam dan didinginkan selama 24 jam, ini dilakukan selama 3 hari berturut-turut. Tanah dan

pupuk kandang yang telah disterilkan tersebut dimasukkan kedalam wadah seedbed dengan ukuran 30 x 20 cm, setelah 15 hari bibit siap tanam.

#### 4.5.2.8 Penanaman

Penanaman dilakukan setelah benih disemai dengan cara pindah tanam, bibit pindah tanam ketika berumur 15 hari setelah tanam (HST). Penanaman benih padi varietas IR 42 dilakukan dengan sistem tugal dengan kedalaman lubang tanam 2 cm dan setiap lubang tanami 1 batang padi.

#### 4.5.2.9 Inokulasi Patogen.

Inokulasi *R.solani* dan *P.oryzae* dilakukan pada umur 50 hari setelah tanam. Inokulasi *R. solani* dilakukan dengan mencampurkan 15 g biakan *R. solani* yang telah ditumbuhkan pada medium CMS dengan medium tanam (tanah sawah dalam pot). Sedangkan inokulasi *P.oryzae* dilakukan dengan menyemprotkan suspensi spora dengan kerapatan  $3 \times 10^5$  yang telah dipersiapkan ke tanaman padi. Tanaman yang telah diinokulasi ditempatkan dalam ruang lembab (*mikro chamber*) sampai timbul gejala pada tanaman yang tidak diperlakukan. Ruang lembab tersebut dibuat dengan menyungkup dengan sungkup plastik. Pada ruang lembab dilakukan penyemrotan air dengan menggunakan sprayer agar terjadi kelembaban dan pengembunan. Setelah gejala muncul pada tanaman yang tidak diperlakukan sungkup plastik dibuka.



Gambar 3. Tanaman padi setelah inokulasi patogen dalam ruang lembab(mikrochamber)

#### **4.5.2.10 Pemeliharaan**

Pemeliharaan yang dilakukan meliputi :

##### **4.5.2.10.1 Penyulaman**

Penyulaman dilakukan seminggu setelah tanam, bila ada tanaman dalam pot pertumbuhannya tidak normal atau mati dilakukan penggantian.

##### **4.5.2.10.2 Penyiangan**

Penyiangan dilakukan apabila terdapat gulma atau tumbuhan pengganggu di dalam pot, dilakukan 2-3 kali dengan interval 10 hari dengan cara manual yaitu dicabut dengan menggunakan tangan.

##### **4.5.2.10.3 Pemberian air**

Untuk memenuhi kebutuhan air tanaman, maka dilakukan penyiraman secara teratur mulai awal pertumbuhan sampai dengan seminggu sebelum panen. Penyiraman dilakukan 2 kali sehari, jumlah air yang diberikan sama untuk setiap pot

##### **4.5.2.10.4 Pemupukan**

Pupuk yang diberikan adalah pupuk urea (N), KCI ( $K_2O$ ), dan TSP ( $P_2O_5$ ) sesuai dosis anjuran masing-masing perlakuan pupuk yakni urea 200 kg/ha yang dikurangi dengan dosis pada trichokompos jerami padi 75 kg/ha sehingga pupuk urea yang diberikan sebanyak 125 kg/ha (0,78 g/pot), pupuk KCI 100 kg/ha (0,625 g/pot) dan TSP 150 kg/ha yang dikurangi dengan dosis pada trichokompos jerami padi 37,5 kg/ha sehingga pupuk TSP yang diberikan sebanyak 112,5 kg/ha (0,70 g/pot). Pemberian pupuk urea diberikan 2 tahap (1/2 pada saat tanam, 1/2 saat umur tanaman 5 minggu), sedangkan pupuk TSP dan KCI diberikan pada saat tanam.

##### **4.5.2.10.5 Pengendalian Hama**

Pengendalian hama dilakukan secara mekanik yaitu mengambil/menangkap hama dan kemudian membunuhnya.

##### **4.5.2.10.6 Panen**

Panen dilakukan setelah tanaman menua, ditandai dengan menguningnyavsemua bulir secara merata. Daun bersera berwarna kuning kecoklatan, bila bulir digigit tidak sampai mengeluarkan air, tangkai daun sudah merunduk dan batang malai kering. Alat yang digunakan adalah sabit.



### 4.6.2.3 Masa Inkubasi / Munculnya Gejala Awal Penyakit (hari)

#### 4.6.2.3.1 Masa inkubasi/Munculnya Gejala Awal Penyakit Busuk Pelepah (hari)

Masa inkubasi/munculnya gejala awal penyakit busuk pelepah diamati setiap hari dimulai saat inokulasi (50 hari setelah tanam) sampai terlihatnya gejala awal yang ditandai dengan terdapatnya bercak kecoklatan bertepi tidak teratur, berbentuk jorong pada batang atau pelepah daun.

#### 4.6.2.3.2 Masa inkubasi/Munculnya Gejala Awal Penyakit Blast (hari)

Masa inkubasi/munculnya gejala awal penyakit blas diamati setiap hari dimulai saat inokulasi (50 hari setelah tanam) sampai terlihatnya gejala awal yang ditandai dengan timbulnya bercak kecil berukuran sebesar ujung jarum atau lebih dan berwarna coklat.

### 4.6.2.4 Intensitas Serangan Penyakit (%)

Intensitas seranganl penyakit diamati 30 hari setelah inokulasi.

#### 4.6.2.4.1 Penyakit Busuk Pelepah

Rumus yang digunakan adalah berdasarkan Jia (2007), sebagai berikut:

$$IP = \frac{\text{Tinggi bercak}}{\text{Tinggi tanaman}} \times 100 \%$$

Keterangan : IP = Intensitas penyakit

#### 4.6.2.4.2 Penyakit Blas

Rumus yang di gunakan adalah berdasarkan Townsend dan Heiberger (1943) dalam Sinaga (2003), sebagai berikut:

$$IP = \frac{\sum_{i=0}^i (nivi)}{ZxN} \times 100\%$$

Keterangan : IP = Intensitas penyakit

ni =Jumlah tanaman dengan skor ke-i

vi =Nilai skala penyakit dari I= 0,1,2, sampai t-skor tertinggi

N =Jumlah tanaman yang diamati

Z= Skor tertinggi

Untuk mengamati intensitas serangan penyakit blas di gunakan skor penilaian tingkat kerusakan tanaman berdasarkan penetapan skala berdasarkan standar IRRI 1996) seperti tertera pada Tabel 1



Tabel 1. Kriteria Penilaian Serangan Blas Daun pada Tanaman Padi

Skala	Keterangan
0	Tidak ada bercak
1	bercak kecil berukuran sebesar ujung jarum atau lebih besar dan berwarna coklat, tanpa ada pusat sporulasi
2	bercak abu-abu berbentuk bundar agak lonjong berdiameter 1-2 mm, memiliki tepi berwarna coklat, umumnya ditemukan pada daun bawah
3	Tipe bercak sama dengan skala 2 tetapi umumnya pada daun atas
4	bercak khas blas berukuran 3 mm atau lebih panjang, luas daun terinfeksi kurang dari 4 %
5	bercak khas blas, luas daun terinfeksi 4-10 %
6	bercak khas blas, luas daun terinfeksi 4-10 %
7	bercak khas blas, luas daun terinfeksi 11-25 %
8	bercak khas blas, luas daun terinfeksi 26-50 %
9	bercak khas blas, luas daun terinfeksi 51-75% dan banyak daun yang mati

#### 4.6.2.5. Persentase tanaman yang terserang penyakit

Persentase tanaman padi yang terserang penyakit dihitung dengan menghitung tanaman yang terserang penyakit dibagi dengan jumlah tanaman seluruhnya dikali 100 %

#### 4.6.2.6 Berat Gabah Kering per pot (kg)

Berat gabah kering giling dihitung dengan menimbang seluruh gabah kering yang dihasilkan dari setiap pot yang telah dijemur selama 3 hari.

#### 4.6.2.7 Pengamatan Pendukung

##### 4.6.2.7.1 Analisis Kompos

Analisis kompos dilakukan pada masing-masing perlakuan setelah kompos dipanen. Analisis karakteristik sifat fisik dan kimia mencakup bahan ikutan kadar air, pH H<sub>2</sub>O, C-organik, N-organik, C?N, Ptotal, Ktotal, dan kadar unsur mikro Fe, Mn, Cu dan Zn

#### 4.6.2.7.2. Analisis Tanah

Analisis tanah yang dilakukan analisis tanah awal (sebelum perlakuan) mencakup: pH, C-organik, N, C/N, P, K, Na, Ca, Mg, KTK, dan Kejenuhan basa, analisis tanah pada masing-masing perlakuan setelah perlakuan mencakup analisis pH, unsur hara C-organik, N-total, C?N, unsur hara P dan K.

#### 4.6.2.7.3 Pengukuran Suhu Selama Pengomposan

Suhu selama pengomposan diamati seminggu sekali, pagi hari pukul 07.00 WIB, siang hari pukul 13.00 WIB, dan sore hari pukul 17.00 WIB. Pengukuran suhu dilakukan dengan termometer yang bagian ujungnya ditancapkan pada 5 tempat pada sisi tumpukan. Suhu rata-rata minggguan kompos dapat dihitung dengan rumus:

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

#### 4.6.2.7.4 Pengukuran Suhu Harian di Rumah Kaca

Pengukuran suhu harian di rumah kaca dilakukan setiap hari, yaitu pagi pukul 07.00 WIB, siang pukul 13.00 WIB, dan sore pukul 17.00 WIB. Kemudian diamati suhunya dan dicari suhu rata-rata hariannya dengan rumus:

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

#### 4.6.2.6.5 Pengukuran Kelembaban Harian di Rumah Kaca

Pengukuran kelembaban harian di rumah kaca dilakukan setiap hari, yaitu pagi pukul 07.00 WIB, siang pukul 13.00 WIB, dan sore pukul 17.00 WIB. Kemudian diamati kelembabannya dan dicari kelembaban harian dengan rumus:

$$\text{RH} (\%) = \frac{2 \times \text{RH pagi} + \text{RH siang} + \text{RH sore}}{4}$$