

III. TATA CARA PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di *Greenhouse* dan Laboratorium Agrobioteknologi Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari 2012 sampai bulan Mei 2013.

B. Bahan dan Alat Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Benih Cabai merah besar Varietas Branang, kompos dari kotoran sapi dan serasah dedaunan, daun sirih, Delsene MX 80-WP, *Potato Dextrose Agar* (PDA) dan Tanaman Cabai yang Terserang penyakit rebah kecambah. Benih Cabai diperoleh dari Balai Pengembangan Perbenihan Tanaman Pangan dan Hortikultura Unit Produksi Pakem, Sleman.

Sedangkan alat yang digunakan adalah *Leaf Area Meter*, Oven, cangkul, ember, blender, timbangan, kain saring, cawan petri, tabung reaksi, Erlenmeyer, jarum ose, mikroskop, autoclaf, bak perkecambahan dan alat tulis.

C. Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan metode eksperimental yang dilaksanakan di *Greenhouse* dan disusun dalam rancangan acak lengkap (RAL) faktor tunggal, yang terdiri dari 13 perlakuan, yaitu pemberian:

1. A = Ekstrak daun sirih konsentrasi 40% dengan lama perendaman 1 jam
2. B = Ekstrak daun sirih konsentrasi 40% dengan lama perendaman 2 jam
3. C = Ekstrak daun sirih konsentrasi 40% dengan lama perendaman 3 jam
4. D = Ekstrak daun sirih konsentrasi 60% dengan lama perendaman 1 jam

5. E = Ekstrak daun sirih konsentrasi 60% dengan lama perendaman 2 jam
6. F = Ekstrak daun sirih konsentrasi 60% dengan lama perendaman 3 jam
7. G = Ekstrak daun sirih konsentrasi 80% dengan lama perendaman 1 jam
8. H = Ekstrak daun sirih konsentrasi 80% dengan lama perendaman 2 jam
9. I = Ekstrak daun sirih konsentrasi 80% dengan lama perendaman 3 jam
10. J = Delsene MX 80WP 0,3% dengan lama perendaman 1 jam
11. K = Delsene MX 80WP 0,3% dengan lama perendaman 2 jam
12. L = Delsene MX 80WP 0,3% dengan lama perendaman 3 jam
13. M = Kontrol, tanpa pemberian fungisida dan tanpa perendaman

Setiap perlakuan terdiri dari 3 ulangan, sehingga terdapat 39 unit percobaan.

Setiap unit percobaan membutuhkan 20 benih cabai sehingga dibutuhkan 780 benih cabai. Denah rancangan penelitian dapat dilihat pada lampiran 1.

D. Cara Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dalam dua tahapan, yaitu tahapan laboratorium dan tahapan lapangan.

1. Tahapan Laboratorium

a. Pembuatan Medium

Medium yang digunakan untuk pertumbuhan isolat cendawan penyebab penyakit *damping-off* adalah medium *Potato Dextrose Agar* (PDA) dan *Potato Dextrose Cair* (PDC). Pembuatan PDA sebanyak 1 liter membutuhkan kentang sebanyak 200 gr, dextrose 15 gr, dan agar 20 gr. Kentang direbus dalam air sebanyak 2 liter hingga tersisa 1 liter, kemudian ditambah dengan dextrose dan agar, setelah itu semua dipanaskan hingga semua bahan terlarut. Bahan yang telah

larut kemudian dimasukkan ke dalam *Erlenmeyer* atau tabung reaksi (media agar miring) kemudian di tutup dengan menggunakan kapas dan kertas sampul, setelah itu disterilkan dengan menggunakan otoklaf pada tekanan 1 atm selama 15 menit. Setelah media dingin, PDA siap dituangkan ke cawan petri. Cara dan bahan yang digunakan dalam pembuatan media PDC sama dengan pembuatan media PDA hanya saja tidak menggunakan agar.

b. Isolasi sumber penyakit

Sumber penyakit diambil dari tanaman yang terserang penyakit rebah kecambah. Tanah yang berada dalam zona perakaran dan bagian tanaman yang sakit diambil, kemudian diencerkan hingga pengenceran 10^2 dan diinokulasi pada cawan petri yang berisi PDA dengan metode Surface. Cendawan yang telah tumbuh diidentifikasi dan dipisahkan untuk mendapatkan biakan murni. Uji pendahuluan dilakukan guna mengetahui cendawan yang paling efektif dalam menyebabkan penyakit rebah kecambah.

Uji pendahuluan dilakukan dengan cara menshaker cendawan yang telah dimurnikan pada media PDC dengan kecepatan 135 rpm selama 72 jam. Setelah dishaker cendawan disemprotkan ke media tanam yang telah disterilisasi dan diletakkan di bak perkecambahan. Benih yang telah direndam dalam air dengan suhu 60°C hingga air mendingin kemudian diletakkan di bak perkecambahan yang telah diberi tanah dan cendawan. Pengamatan dilakukan dengan mengamati daya kecambah, indeks vigor dan intensitas serangan rebah kecambah. Setiap perlakuan terdiri dari 1 ulangan dan 20 sampel.

2. Perbanyak cendawan penyebab penyakit

Perbanyak isolat *Sclerotium rolfsii* untuk menginokulasi media tanam dilakukan dengan menanam 5 sklerotium pada media biakan *corn meal sand* kemudian diinkubasi selama 12 hari pada suhu ruang (Fery *et.al.*, 1993). Bahan dan alat yang digunakan untuk membuat *corn meal sand* adalah 2% tepung jagung, 98% pasir, dan aquadest sebanyak 20% dari berat total media (Fery *et.al.*, 1993). Media yang digunakan untuk perbanyak disterilkan terlebih dahulu dalam autoclaf selama 1 jam dengan suhu 121⁰C dan tekanan 1 atm. Kegiatan perbanyak cendawan penyebab penyakit ini dilakukan secara aseptik.

3. Persiapan media

Media semai terbaik untuk infeksi pathogen penyebab rebah kecambah adalah media pasir, tanah dan pupuk kandang dengan perbandingan 2:1:1 (Mulyati, 2009). Campuran tersebut disterilkan dengan menggunakan autoclaf selama 1 jam, kemudian didinginkan selama 15 menit. Setelah disterilkan tanah dikeringanginkan di dalam ruangan tertutup dengan sirkulasi udara yang baik, setelah itu tanah diisi ke dalam bak-bak perkecambahan. Bak perkecambahan yang akan digunakan berukuran 30 x 21 x 5 cm. Perhitungan jumlah media tanam yang dibutuhkan dapat dilihat pada lampiran 2.

4. Penyiapan fungisida nabati

Daun sirih segar yang memiliki ukuran hampir sama sebanyak 500 gram dicuci dengan air bersih, kemudian ditambahkan *aquadest* 500 ml dan diblender. Larutan fungisida diinkubasi selama 24 jam pada suhu kamar untuk melepaskan metabolit sekunder yang terlarut dalam sel daun sirih. Setelah diinkubasi larutan

disaring dengan menggunakan kain kasa, sehingga diperoleh larutan ekstrak daun sirih dengan konsentrasi 100%. Kebutuhan ekstrak daun sirih untuk perlakuan dilakukan dengan metode pengenceran, setiap perlakuan konsentrasi ekstrak daun sirih membutuhkan 250 ml. Perhitungan kebutuhan fungisida nabati dan Delsene MX 80 WP dapat dilihat di lampiran 3.

5. Inokulasi cendawan patogen

Metode yang digunakan untuk mendapatkan media tanam terkontaminasi adalah pencampuran, yaitu dengan mencampurkan media tanam dengan *Corn Meal Sand* yang telah mengandung *Sclerotium rolfsii* dengan perbandingan 10:1 (b/b). Media yang telah diinokulasi dibiarkan selama 1 minggu sebelum digunakan digunakan untuk media semai. Perhitungan untuk kebutuhan inokulum dapat dilihat pada lampiran 2.

6. Perendaman benih

Setiap benih cabai yang didesinfeksi dengan menggunakan alkohol 70% selama 3 menit kemudian dibilas dengan air steril, kemudian benih direndam dalam larutan yang telah ditentukan sesuai perlakuan yang diberikan.

7. Penyemaian

Benih yang telah direndam disemai dalam bak persemaian yang telah disiapkan sebelumnya, benih ditanam sedalam ± 1 cm.

8. Pemeliharaan

Pemeliharaan yang dilakukan hanya berupa penyiraman. Penyiraman dilakukan setiap dua hari sekali disesuaikan dengan kondisi lapang, tanah diusahakan dalam kondisi lembab. Penyiraman dilakukan dengan menggunakan gembor dengan jarak yg dekat agar tidak merusak persemaian.

E. Parameter yang diamati

1. Pembuktian viabilitas spora pada media tanam

Sampel media tanam yang telah diinokulasi cendawan penyebab penyakit *damping-off* dan telah berumur satu minggu diuji viabilitas spornya. Pengujian dilakukan dengan metode umpan, umpan yang digunakan adalah timun. Pengamatan dilakukan sebelum benih disemai.

2. Daya Kecambah

Daya Berkecambah (DB) (%), dihitung berdasarkan pengamatan persentase jumlah kecambah normal dibandingkan dengan jumlah total benih yang ditanam dikalikan dengan 100%. Pengamatan daya berkecambah dilakukan pada hingga hari ke-14. Daya berkecambah dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$DB = \frac{\text{Jumlah benih berkecambah}}{\text{Total Benih}} \times 100\%$$

Keterangan :

DB = Daya Berkecambah

3. Kecepatan berkecambah (First Count)

Pengamatan kecepatan berkecambah (*first count*) dengan menghitung persentase benih berkecambah pada hari ke-7 setelah semai atau dengan menggunakan rumus sebagai berikut;

$$KB = \frac{\text{Jumlah benih berkecambah pada hari ke - 7}}{\text{Total Benih}} \times 100\%$$

Keterangan :

KB = Kecepatan Berkecambah (%)

4. Indeks Vigor

Pengamatan dilakukan setiap hari setelah semai dengan menghitung lama waktu munculnya hipokotil dalam satuan hari setelah tanam. Pengamatan dilakukan setiap hari hingga hari ke-14. Indeks Vigor dapat dihitung dengan rumus;

$$IV = \sum \frac{A_n}{T_n}$$

IV = Indeks Vigor

A_n = Jumlah benih berkecambah pada hari tertentu

T_n = waktu yang berkorespondensi dengan A

5. Koefisien Perkecambahan

Koefisien perkecambahan diamati setiap hari sampai hari ke-14, pengamatan dilakukan terhadap jumlah kecambah normal dan perbedaan waktu pengamatan. CG dihitung dengan rumus :

$$CG = \frac{100x \sum An}{\sum AnTn}$$

CG = Koefisien Perkecambahan

An = Jumlah benih berkecambah pada hari tertentu

Tn = waktu yang berkorespondensi dengan A

6. Intensitas serangan rebah kecambah (Damping-off)

Pengamatan parameter intensitas serangan rebah kecambah dilakukan pada saat tanaman berumur 28 hari setelah semai. Hal ini dilakukan karena bibit cabai dapat dipindahtanamkan ke lapangan setelah berumur 28 hari setelah semai.

Pada umur 28 hari setelah semai, tanaman dibongkar dan akar dicuci dengan air mengalir, kemudian dihitung intensitas serangan rebah kecambah. Menurut Jontar (2008) intensitas serangan rebah kecambah dihitung dengan menggunakan rumus;

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

IS = Intensitas Serangan, n = jumlah tanaman pada tiap scoring, v = nilai scoring serangan penyakit tiap individu tanaman, N = jumlah tanaman yang diamati, dan Z = Nilai scoring tertinggi

Skala serangan yang digunakan adalah:

Skala 0 = Tanaman sehat

Skala 4 = >75% busuk

Skala 1 = 1-25 % busuk

Skala 5 = Busuk total dan tidak bisa

Skala 2 = 26-50% busuk

hidup lagi

Skala 3 = 51-70% busuk

7. Pembuktian serangan damping-off

Bagian tanaman yang terkena penyakit *damping-off* diisolasi dan dikulturkan dalam laboratorium untuk membuktikan bahwa penyebab rebah kecambah adalah cendawan *Pythium sp*, *Rizoctonia solani*, *Fusarium sp*, *Sclerotium rolfsii*, atau *phytophthora sp*. Pengamatan dilakukan pada hari ke-28 setelah semai dengan mengambil 2 sampel dalam setiap perlakuan.

8. Jumlah Daun

Dilakukan dengan menghitung jumlah daun yang ada, tanpa mengikut sertakan daun dengan ukuran yang masih sangat kecil dan belum berkembang membuka. Pengamatan dilakukan pada 14 Hari Setelah Semai (HSS), 21 HSS, dan 28 HSS.

9. Tinggi Tanaman

Tinggi tanaman merupakan parameter tambahan, dilakukan dengan mengukur tinggi tanaman (dalam satuan cm) dari titik tumbuh ke titik di dekat pangkal batang yang telah diberi tanda. Pengamatan dilakukan pada 14 HSS, 21 HSS, dan 28 HSS.

10. Luas Daun

Luas daun diukur dengan menggunakan alat *Leaf Area Meter*. Pengamatan dilakukan pada 28 HSS. Satuan untuk luas daun adalah cm^2 .

11. Panjang akar

Bibit dikeluarkan dari media persemaian secara perlahan-lahan sehingga akar Bibit tidak rusak. Akar dicuci dengan menggunakan pancaran air kemudian

didiamkan beberapa saat hingga air cucian hilang. Setelah kering akar diluruskan dan diukur panjangnya. Pengukuran Panjang Akar menggunakan Penggaris. Pengamatan dilakukan pada 28 HSS.

12. Berat Segar Akar

Akar dipotong sebatas pangkal akar kemudian di timbang. Pengukuran berat segar akar dilakukan pada 28 HSS dan diukur setelah pengukuran panjang akar. Satuan pengukuran untuk berat segar akar adalah gram.

13. Berat Kering Akar

Akar yang telah dipotong dimasukkan ke dalam wadah kertas kemudian dimasukkan ke dalam oven selama pada suhu 80°C hingga berat mengalami titik konstan. Pengukuran berat kering akar dilakukan pada 28 HSS. Satuan Pengukuran untuk berat kering akar adalah gram.

F. Analisis Data

Hasil pengamatan atau data yang diperoleh dianalisis dengan sidik ragam pada taraf $\alpha = 5\%$, dan jika terdapat beda nyata antar perlakuan maka dilakukan uji jarak berganda Duncan's Multiple Range Test (DMRT) pada taraf $\alpha = 5\%$.