3. BAHAN DAN METODE

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian dilaksanakan pada 11 Januari sampai 15 April 2016. Pelaksanaan terdapat di dua tempat, yaitu 1) Laboratorium Mikologi, Fakultas Pertanian, Universitas Brawijaya dan 2) Kebun Bibit Dinas Perkebunan dan Kehutanan, Jl. Raya Bromo, Desa Pohgading, Kecamatan Pasrepan, Kabupaten Pasuruan.

3.2 Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ialah tanaman tebu (*bud chip*), wortel, agar dan aquadest. Bahan media tanam menggunakan tanah endemik terserang jamur *Pythium* sp. Peralatan yang digunakan ialah cawan petri, tabung erlenmeyer, autoclave, pipet, kertas saring, timbangan, bunsen, *jarum ose*, oven, polibag ukuran 13 x 18 cm, plastik wrapping, hot plate, cangkul, gelas ukur, ember, meteran, mikroskop dan jangka sorong.

3.3 Metode Penelitian

Penelitian menggunakan Rancangan Petak Terbagi (Split Plot Design) yang terdiri dari dua faktor yang diulang sebanyak 3 kali sehingga diperoleh 14 kombinasi perlakuan dan 42 petak percobaan. Setiap satuan percobaan terdiri dari atas 10 tanaman sehingga populasi 420 tanaman.

Faktor 1 (petak utama): Kondisi tanah, yaitu:

1. P0 = Tanah tanpa terserang jamur *Pythium* sp (steril dari jamur)
2. P1 = Tanah yang terserang jamur *Pythium* sp

Faktor 2 (anak petak): Klon tebu terdiri dari tujuh klon tebu, yaitu:

1. V1 = PSJT 941
2. V2 = Bulu Lawang
3. V3 = Kidang Kencana
4. V4 = PS 862
5. V5 = PS 864
6. V6 = PSBM 901
7. V7 = PS 865

Perlakuan tersebut didapatkan 14 kombinasi perlakuan, yaitu:

Tabel 1. Kombinasi Kondisi Tanah dan Klon Tebu

Kondisi Tanah	Klon Tebu						
	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7
P0	P0V1	P0V2	P0V3	P0V4	P0V5	P0V6	P0V7
P1	P1V1	P1V2	P1V3	P1V4	P1V5	P1V6	P1V7

Keterangan:
P0V1 = Perlakuan tanah tanpa terserang jamur *Pythium* sp (kontrol) pada klon PSJT 941.
P1V1 = Kombinasi perlakuan antara klon PSJT 941 dengan pemberian tanah yang terserang jamur *Pythium* sp.
P0V2 = Perlakuan tanah tanpa terserang jamur *Pythium* sp (kontrol) pada klon Bulu Lawang.
P1V2 = Kombinasi perlakuan antara klon Bulu Lawang dengan pemberian tanah yang terserang jamur *Pythium* sp.
P0V3 = Perlakuan tanah tanpa terserang jamur *Pythium* sp (kontrol) pada klon Kidang Kencana.
P1V3 = Kombinasi perlakuan antara Kidang Kencana dengan pemberian tanah yang terserang jamur *Pythium* sp.
P0V4 = Perlakuan tanah tanpa terserang jamur *Pythium* sp (kontrol) pada klon PS 862
P1V4 = Kombinasi perlakuan antara klon PS 862 dengan pemberian tanah yang terserang jamur *Pythium* sp.
P0V5 = Perlakuan tanah tanpa terserang jamur *Pythium* sp (kontrol) pada klon PS 864.
P1V5 = Kombinasi perlakuan antara klon PS 864 dengan pemberian tanah yang terserang jamur *Pythium* sp.
P0V6 = Perlakuan tanah tanpa terserang jamur *Pythium* sp (kontrol) pada klon PSBM 901.
P1V6 = Kombinasi perlakuan antara klon PSBM 901 dengan pemberian tanah yang terserang jamur *Pythium* sp.
P0V7 = Perlakuan tanah tanpa terserang jamur *Pythium* sp (kontrol) pada klon PS 865
P1V7 = Kombinasi perlakuan antara klon PS 865 dengan pemberian tanah yang terserang jamur *Pythium* sp.

3.4 Pelaksanaan

3.4.1 Pembuatan Media Agar Wortel dan Isolasi *Pythium* sp

Pengujian jamur *Pythium* sp diperoleh dari tebu yang rebah pada lahan yang berada di Desa Bandaran, Kecamatan Winongan, Kabupaten Pasuruan. Hal tersebut bertujuan untuk menguji kebenaran tanah terserang jamur *Pythium* sp. Pengujian dilaksanakan dengan membiakkan isolat jamur di media agar wortel. Cara kerja pembuatan media agar wortel menurut Drenth dan Sendall (2001), yaitu mencuci 200 g wortel yang diiris tebal. Selanjutnya, wortel

dimasukan dalam autoclave dengan ditambahkan 500 ml aquadest. Wortel yang sudah diautoclave diblender dengan kecepatan tinggi selama 40 detik. Setelah itu, homogenat wortel diperas dalam 4 lapisan kertas saring.

Hasil saringan ditambahkan air aquadest hingga 1 liter, dengan 15 g agar yang dipanaskan di autoclave. Setelah dari autoclave, media dimasukkan pada cawan petri yang berfungsi mempermudah pemeriksaan mikroskopis dengan menghasilkan 40-50 piring. Setelah 2 jam dimasukan cawan petri media akan memadat. Jamur *Pythium* sp dilakukan isolasi di media agar wortel, dengan mengambil 1 cm bagian daun dan akar tanaman tebu yang terserang. Isolasi dilakukan setengah bagian tanaman sakit dan sehat. Dilakukan penanaman di media ditunggu selama 7 hari. Setelah 7 hari dilakukan purifikasi 2 kali kedalam media baru, selama 1 kali purifikasi membutuhkan waktu 7 hari.

3.4.2 Penyiapan Media Tanam

Penyiapan media tanam terdiri dari beberapa kegiatan, yaitu pengambilan tanah endemik terserang penyakit rebah kecambah, diisi dalam polibag ukuran 13 x 18 cm. Polibag dibutuhkan sejumlah 420 buah, masing-masing diisi dengan tanah 1.000 g. Dilakukan pembedaan kontrol dengan tanah terserang jamur *Pythium* sp sehingga terdapat 210 buah untuk kontrol dan 210 diisi tanah terserang jamur *Pythium* sp. Tanah kontrol dilakukan sterilisasi dengan metode yang dilakukan dengan uap panas (oven) 100^{o} C selama dua jam. Tanah yang terserang jamur *Pythium* sp terlebih dahulu dilakukan pencampuran (pengadukan) sebelum dimasukkan polibag, yang fungsinya agar populasi jamur *Pythium* sp didalam tanah merata pada setiap perlakuan.

3.4.3 Penanaman

Penanaman menggunakan tebu dengan mata tunas satu (*bud chip*). Benih tanaman tebu yang digunakan diantaranya PSJT 941, Bulu Lawang, Kidang Kencana, PS 862, PS 864, PSBM 901 dan PS 865. Penanaman benih dilakukan dengan posisi mata tunas menghadap keatas. Bibit yang telah ditanam kemudian ditutup dengan tanah setebal bibit itu sendiri. Setelah itu, dilakukan penyiraman awal.

3.4.4 Tanah

Tanah yang digunakan adalah tanah dari Desa Bandaran, Kecamatan Winongan, Kabupaten Pasuruan yang diklasifikasikan sebagai jenis tanah inceptisol dengan menggunakan 70% tingkat kelembaban. Penentuan kapasitas lapang dilakukan dengan memasukkan contoh tanah kedalam polibag yang telah dilubangi bagian dasar, kemudian diberi air sampai keadaan lewat jenuh. Setelah itu ditimbang, selanjutnya tanah dikering udarakan dengan cara mengeringkan tanah contoh di dalam oven (suhu 100^{o} C). Menurut Proklamasiningsih *et al*., (2012), kondisi kapasitas lapang, dapat dirumuskan sebagai berikut:

$$W = \frac{Tb - Tk}{Tk} \; x \; 100 \; \%$$

Keterangan:
W = kapasitas lapang
Tb = berat media tanam jenuh air
Tk = berat media tanam kering mutlak

3.4.5 Penyiraman

Penyiraman dilakukan dengan volume yang dihasilkan dari hasil perolehan kadar air dan kapasitas lapang. Volume tersebut merupakan volume yang diaplikasikan per polibag. Penyiraman pada persemaian tebu dilakukan setiap hari sebab pada fase vegetatif awal memerlukan air yang tinggi sehingga penyiraman lebih baik setiap hari.

3.4.6 Penyiangan

Penyiangan dilakukan setiap minggu maupun jika tidak terdapat gulma maka tidak perlu dilakukan penyiangan. Tanah yang tidak dilakukan penyiangan, akan menyebabkan tanaman tumbuh dengan lambat. Kecambah tebu berkompetisi dengan tanaman lain dari persaingan sinar matahari, maupun unsur hara.

3.5 Pengamatan

Pengamatan dilakukan pada setiap individu tanaman. Karakter yang diamati yaitu kuantitatif yang menunjukkan sifat morfologi suatu tanaman, meliputi:

1. Tinggi batang (cm), diukur menggunakan meteran dimulai permukaan tanah hingga titik tumbuh pada batang utama pada saat umur 4 minggu, 6 minggu, 8 minggu dan 10 minggu.
2. Diameter batang (cm), diukur menggunakan jangka sorong pada batang utama pada ketinggihan ruas ketiga dari permukaan tanah, pada saat umur 4 minggu, 6 minggu, 8 minggu dan 10 minggu.
3. Jumlah daun, diukur dari jumlah helai daun pada tiap sampel tanaman pada saat umur 4 minggu, 6 minggu, 8 minggu dan 10 minggu.
4. Lebar daun (cm), diukur dari titik terlebar pada saat umur 4 minggu, 6 minggu, 8 minggu dan 10 minggu.
5. Panjang daun (cm), diukur dari titik pangkal hingga pucuk daun pada saat umur 4 minggu, 6 minggu, 8 minggu dan 10 minggu.
6. Panjang akar (cm), diukur dari titik batas akar dari permukaan tanah sampai ujung akar pada saat umur 4 minggu, 6 minggu, 8 minggu dan 10 minggu.
7. Bobot tanaman (g), diukur dengan menggunakan timbangan. Penimbangan dilakukan pada saat umur 4 minggu, 6 minggu, 8 minggu dan 10 minggu.
8. Intensitas serangan penyakit rebah kecambah (*damping off*) dihitung dengan rumus (Handoko, Abadi dan Aini, 2014):

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

Keterangan:

Perhitungan intensitas serangan:
- I = intensitas serangan penyakit
- n = jumlah skor yang sama
- v = nilai skoring tiap penyakit tiap individu tanaman
- N = jumlah sampel yang diamati
- Z = nilai skor tertinggi

Skala serangan:
- 0 = tidak ada serangan
- 1 = kerusakan antara 1-20 %
- 2 = kerusakan antara 21-40 %
- 3 = kerusakan antara 41-60 %
- 4 = kerusakan antara 61-80 %
- 5 = kerusakan antara 81-100 %.

3.6 Analisis data

Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan analisis ragam (uji F) pada taraf 5 %, apabila terdapat pengaruh nyata maka dilanjutkan dengan uji Duncan Mutiple Range Test (DMRT) pada taraf 5 % dan dilakukan analisis hubungan korelasi. Berikut tabel analisis ragam menurut Hanafiah (2012), yaitu:

Tabel 2. Analisis Ragam Rancangan Petak Terbagi

SK	Db	JK	KT	F hit	F tab
Petak Utama	rm-1 = v1	JKPU	JKPU/v1 = KTPU	KTPU/Ea	(v1,vb)
Kelompok	r-1 = v2	JKK	JKK/v2 = KTK	KTK/Ea	(v2,va)
Faktor A	m-1 = v3	JKA	JKA/v3 = KTA	KTA/Ea	(v3,va)
Galat A	v1-v2-v3 = va	JKGa	JKGa/va = Ea		
Faktor B	n-1 = v4	JKB	JKB/v4 = KTB	KTB/Eb	(v4,vb)
Interaksi	v3xv4 = v5	JKI	JKI/v5 = KTI	KTI/Eb	(v5,vb)
Galat B	vt-v1-v4-v5 = vb	JKGb	JKGb/vb = Eb		
Total	rmn-1 = vt				

Keterangan:
r = Jumlah kelompok
m = Jumlah perlakuan A (petak utama)
n = Jumlah perlakuan B (petak bagian)
v4 = Derajat bebas perlakuan B = n-1
Ea = Kuadrat tengah galat a
Eb = Kuadrat tengah galat b
* = Nilai baku terbeban dihitung:
B = $\frac{(n-1)Eb\ Bb + EaBa}{(n-1)Eb + Ea}$
Bb = Nilai baku b, n-1 = v4
Ba = Nilai baku a
PPU = Perlakuan petak utama
PPB = Perlakuan petak bagian
v1 = Derajat bebas petak utama
v2 = Derajat bebas kelompok
v3 = Derajat bebas perlakuan A = m-1
v5 = Derajat bebas interaksi
va = Derajat bebas galat A
vb = Derajat bebas galat B
JKPU = Jumlah kuadrat petak utama
JKK = Jumlah kuadrat kelompok
JKA = Jumlah kuadrat perlakuan A
JKGa = Jumlah kuadrat galat A
JKB = Jumlah kuadrat perlakuan B
JKI = Jumlah kuadrat interaksi
JKGb = Jumlah kuadrat galat B
KTPU = Kuadrat tengah petak utama
KTK = Kuadrat tengah kelompok
KTA = Kuadrat tengah perlakuan A
KTB = Kuadrat tengah perlakuan B
KTI = Kuadrat tengah interaksi.