

## LAMPIRAN

### Lampiran 1 Pembuatan Larutan SAP *Ustilago scitamineum* (Penyakit Luka Api) di BPTP Surabaya

Spora Luka Api diambil dari kebun tebu KTG yang terserang Luka Api. Daun tebu varietas yang terinfeksi luka api digunakan sebagai bahan pembuatan larutan SAP. Prosedur pembuatannya adalah sebagai berikut:

#### A. Pembuatan Buffer

Buffer yang digunakan sebagai bahan pembuatan SAP adalah potasium phosphat buffer yang terdiri dari larutan dipotassium hidrogen phosphat ( $K_2HPO_4$ ) dan potasium dihidrogen phosphat ( $KH_2PO_4$ ). Cara membuat buffer adalah sebagai berikut:

1. Buat 0,1 M  $KH_2PO_4$ , dengan cara melarutkan 13,609 g  $KH_2PO_4$  kedalam 1 liter akuades steril.
2. Buat 0,1 M  $K_2HPO_4$ , dengan cara melarutkan 17,418 g  $K_2HPO_4$  kedalam 1 liter akuades steril.
3. Campur larutan 1 dan 2 dengan perbandingan 2:1
4. Kemudian ukur pHnya
5. Atur pH sampai 7 dengan menambahkan salah satu larutan.
6. Setelah pH 7 maka encerkan 10 kali dengan akuades steril (0,01M).
7. Buffer siap digunakan

#### B. Pembuatan SAP (sumber inokulum)

Cara pembuatan SAP oleh BPTP Surabaya adalah sebagai berikut :

1. Campur Spora Luka Api (250 gram) dengan 4 liter buffer phosphat
2. Hitung Kepadatan spora dibawah mikroskop minimal  $10^6$
3. Simpan dalam lemari es (suhu  $4^{\circ}C$ ) selama 1 jam
4. Sap siap digunakan untuk infeksi Bagal tebu atau SBP Tebu sehat
5. SAP dibawa dalam kondisi dingin sehingga dibutuhkan termos atau *ice box* selama proses infeksi.

Rumus Menghitung molaritas

$$\frac{M \times BM \times ml}{1000} = Gram$$

Keterangan :

M : Molaritas

BM : Berat Molekul senyawa

ml : Volume yang diinginkan.

Gram : Massa senyawa yang harus dilarutkan

### **C. Pencampuran Spora Luka Api Untuk Tanaman Tebu**

Spora yang telah di dapat dari BPTP Surabaya selanjutnya akan diracik untuk diberikan ke tanaman tebu yang sedang diteliti. Berikut cara pencampurannya :

1. Campur 1 gr spora dengan 10 liter air bersih
2. Aduk sampai tercampur rata
3. Siram tanaman tebu hingga basah
4. Tuang 100ml ke tiap polybag
5. Tanaman tebu yang terinfeksi akan memunculkan gejala setelah 2 minggu pemberian spora luka api

### **D. Pembuatan mosaik bergaris**

0,1 g sampel tanaman digiling dalam larutan buffer fosfat (PBS) (1 L terdiri dari 8,0 g NaCl, 0,2 g KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>, 1,42 g Na<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub> .12 H<sub>2</sub> O, 0,2 g KCl, pH 7,4) yang mengandung 2% polivinil pirolidon ( PVP ), disentrifugasi pada 10.000 g selama 10 menit. Supernatan dipindahkan ke dalam tabung Eppendorf, diinkubasi selama 3 jam pada suhu 37°C, dicuci 2 kali dengan PBS ditambah 0,05% tween-20 (PBST). Total RNA disuspensikan kembali dalam 50 µL air dietil-pirokarbonat (DEPC) steril.

Daun/batang/pelepah tebu sebanyak 0,1 g digiling sampai halus dalam nitrogen cair menggunakan mortar dan alu, kemudian diberi 600 µL buffer PBST (1L PBS buffer, 500 µL Tween-20) yang digunakan untuk ELISA dengan modifikasi rasio jaringan tanaman dan PBST dari 1:1 (b/v) hingga 1:6 (b/v) dan tabung PCR yang digunakan dari 0,5 mL hingga 0,2 mL. Getah kasar diambil sebanyak 50 µL, dimasukkan ke dalam tabung PCR (Axygen), diinkubasi selama 15 menit pada suhu ruang. Getah dikeluarkan dengan

bagian ujungnya terpotong, dan tabung PCR dicuci dengan PBST 100  $\mu$ L sebanyak 2 - 4 kali hingga tidak ada jaringan yang tersisa. Segera dimasukkan ke dalam tabung PCR sebanyak 30  $\mu$ L air DEPC steril yang mengandung 15 U RNase Inhibitor (NEB; 40 U  $\mu$ L<sup>-1</sup>), kemudian diinkubasi pada suhu 95°C selama 1 menit pada mesin PCR, dan segera didinginkan dalam es selama 1 menit. menit dan siap digunakan.



## Lampiran 2 Analisis sidik ragam (ANOVA)

Tabel 1 Analisis Sidik Ragam (Anova) Rata-Rata Tinggi Batang (Cm) Perlakuan Luka Api Umur 2MST

SK	DB	JK	KT	F HIT		F TAB	
						0,05	0,01
Perlakuan	59	7354,9	124,7	12,1	*	1,4	1,7
Galat	120	1238,1	10,3				
Total	179	1,5					

Tabel 2 Analisis Sidik Ragam (Anova) Rata-Rata Tinggi Batang (Cm) Perlakuan Blendok Umur 2MST

SK	DB	JK	KT	F HIT		F TAB	
						0,05	0,01
Perlakuan	59	7929,4	134,4	10,9	*	1,4	1,7
Galat	120	1476,6	12,3				
Total	179	1,7					

Tabel 3 Analisis Sidik Ragam (Anova) Rata-Rata Tinggi Batang (Cm) Perlakuan Mosaik Umur 2MST

SK	DB	JK	KT	F HIT		F TAB	
						0,05	0,01
Perlakuan	59	3942,6	66,8	68,0	*	1,4	1,7
Galat	120	117,9	1,0				
Total	179	0,5					

Tabel 4 Analisis Sidik Ragam (Anova) Rata-Rata Tinggi Batang (Cm) Perlakuan Luka Api Umur 3 MST

SK	DB	JK	KT	F HIT		F TAB	
						0,05	0,01
Perlakuan	59	541222,6	9173,3	7141,0	*	1,4	1,7
Galat	120	154,2	1,3				
Total	179	0,5					

Tabel 5 Analisis Sidik Ragam (Anova) Rata-Rata Tinggi Batang (Cm) Perlakuan Blendok Umur 3 MST

SK	DB	JK	KT	F HIT		F TAB	
						0,05	0,01
Perlakuan	59	574458,3	9736,6	4705,1	*	1,4	1,7
Galat	120	248,3	2,1				
Total	179	0,7					

Tabel 6 Analisis Sidik Ragam (Anova) Rata-Rata Tinggi Batang (Cm) Perlakuan Mosaic Umur 3 MST

SK	DB	JK	KT	F HIT		F TAB	
						0,05	0,01
Perlakuan	59	539205,9	9139,1	2202,5	*	1,4	1,7
Galat	120	497,9	4,1				
Total	179	1,0					

Tabel 7 Analisis Sidik Ragam (Anova) Rata-Rata Tinggi Batang (Cm) Perlakuan Luka Api Umur 4 MST

SK	DB	JK	KT	F HIT		F TAB	
						0,05	0,01
Perlakuan	59	54528,4	924,2	629,3	*	1,4	1,7
Galat	120	176,2	1,5				
Total	179	0,6					

Tabel 8 Analisis Sidik Ragam (Anova) Rata-Rata Tinggi Batang (Cm) Perlakuan Blendok Umur 4 MST

SK	DB	JK	KT	F HIT		F TAB	
						0,05	0,01
Perlakuan	59	53948,5	914,4	383,4	*	1,4	1,7
Galat	120	286,2	2,4				
Total	179	0,7					

Tabel 9 Analisis Sidik Ragam (Anova) Rata-Rata Tinggi Batang (Cm) Perlakuan Mosaic Umur 4 MST

SK	DB	JK	KT	F HIT		F TAB	
						0,05	0,01
Perlakuan	59	52137,3	883,7	152,8	*	1,4	1,7
Galat	120	694,2	5,8				
Total	179	1,1					

Tabel 10 Analisis Sidik Ragam (Anova) Rata-Rata Tinggi Batang (Cm) Perlakuan Luka Api Umur 5 MST

SK	DB	JK	KT	F HIT		F TAB	
						0,05	0,01
Perlakuan	59	121724,8	2063,1	95,1	*	1,4	1,7
Galat	120	2604,6	21,7				
Total	179	2,2					

Tabel 11 Analisis Sidik Ragam (Anova) Rata-Rata Tinggi Batang (Cm) Perlakuan Blendok Umur 5 Mst

SK	DB	JK	KT	F HIT		F TAB	
						0,05	0,01
Perlakuan	59	127205,5	2156,0	1769,6	*	1,4	1,7
Galat	120	146,2	1,2				
Total	179	0,5					

Tabel 12 Analisis Sidik Ragam (Anova) Rata-Rata Tinggi Batang (Cm) Perlakuan Mosaik Umur 5 MST

SK	DB	JK	KT	F HIT		F TAB	
						0,05	0,01
Perlakuan	59	127213,0	2156,2	199,8	*	1,4	1,7
Galat	120	1294,7	10,8				
Total	179	1,5					

Tabel 13 Analisis Sidik Ragam (Anova) Rata-Rata Jumlah Daun Umur 2MST

SK	DB	JK	KT	F HIT		F TAB	
						0,05	0,01
Perlakuan	59	109,6	1,9	10,3	*	1,4	1,7
Galat	120	21,6	0,2				
Total	179	0,2					

Tabel 14 Analisis Sidik Ragam (Anova) Rata-rata Jumlah Daun Umur 3MST

SK	DB	JK	KT	F HIT		F TAB	
						0,05	0,01
Perlakuan	59	465,8	7,9	17,4	*	1,4	1,7
Galat	120	54,6	0,5				
Total	179	0,3					



Tabel 15 Analisis Sidik Ragam (Anova) Rata-rata Jumlah Daun Umur 4MST

SK	DB	JK	KT	F HIT		F TAB	
						0,05	0,01
Perlakuan	59	1072,1	18,2	38,4	*	1,4	1,7
Galat	120	56,8	0,5				
Total	179	0,3					

Tabel 16 Analisis Sidik Ragam (Anova) Rata-rata Jumlah Daun Umur 5MST

SK	DB	JK	KT	F HIT		F TAB	
						0,05	0,01
Perlakuan	59	1578,4	26,8	150,7	*	1,4	1,7
Galat	120	21,3	0,2				
Total	179	0,2					



### Lampiran 3 Dokumentasi Kegiatan Penelitian



Gambar 1 Klon Tebu



Gambar 2 Penebangan Klon Tebu



Gambar 3 Tanaman Tebu 1 Mst



Gambar 4 Tanaman Tebu 2 Mst



Gambar 5 Tanaman Tebu 3 Mst



Gambar 6 Tanaman Tebu 4 Mst





Gambar 7 Penyakit Mosaic Bergaris

Gambar 8 Penyakit Luka Api

