

### III. METODOLOGI

#### 3.1 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari 2013 sampai bulan Mei 2013. Penelitian dilakukan di lahan riset PT. DuPont Indonesia (Pioneer) yang berada di desa Ngijo, Kecamatan Karangploso, Kabupaten Malang. Ketinggian tempat  $\pm$  450 m dpl. Pada bulan Februari – Mei tercatat rata-rata suhu udara berkisar 24,20 °C – 31,75 °C curah hujan berkisar 301 – 400 mm dengan kelembaban berkisar 74% – 94%.

#### 3.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat bajak, garu, cangkul, mikroskop, preparat, pinset, gunting, alat tulis, kamera. Bahan-bahan yang digunakan antara lain pupuk urea 300 kg/Ha, KCl 100 kg/Ha dan SP36 150 kg/Ha; larutan *Iodine Kalium Iodide* ( $I_2KI$ ); 106 calon tetua galur mandul jantan  $F_1$  (lampiran 3) yang diduga memiliki gen tahan hawar daun bakteri, yaitu Xa3, Xa7, Xa21 dan Xa26 (galur 13CCMS001A – 13CCMS108A). Tiga varietas pembandingan yang digunakan sebagai cek, yaitu varietas peka hawar daun bakteri (IR64) dan varietas tahan hawar daun bakteri (IRBB21 dan IRBB7).

Calon tetua galur mandul jantan ( $F_1$ ) yang diduga memiliki gen tahan hawar daun bakteri merupakan hasil persilangan galur mandul jantan ( $P_1$ ) dengan  $P_2$ . Tetua jantan ( $P_2$ ) merupakan hasil seleksi marker SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*). Tetua jantan yang terpilih, memiliki gen tahan hawar daun.

#### 3.3 Metode Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode rancangan *Augmented Design* yang terdiri dari 6 blok acak. Tiap blok terdiri atas 19 plot percobaan, yaitu 18 plot galur  $F_1$  dan 1 plot cek (terdiri atas 3 varietas pembandingan). Plot galur  $F_1$  ditanam 1 baris dengan jumlah rumpun 12 pada 1 baris tanam. Untuk varietas pembandingan ditanam masing–masing 12 rumpun pada 1 baris tanam. Masing-masing galur  $F_1$  jika sudah ditanam pada satu blok tidak ditanam lagi pada blok yang lain, sedangkan varietas pembandingan (cek) ditanam pada setiap blok sebagai ulangan.

### 3.4 Pelaksanaan Penelitian

#### 3.4.1 Penanaman padi

##### 3.4.1.1 Persemaian

Persemaian dilakukan dengan sistem kering (*dry bed*), dengan cara menebar benih di bedengan setinggi 5 cm dan diairi secara teratur setiap hari. Bedengan berukuran lebar 30 cm dengan panjang 4 m dan jarak antar bedengan 20 cm. Benih yang akan disemai terlebih dahulu direndam dalam air selama 24 jam, kemudian ditiris di tempat yang aman dan diperam selama 2 x 24 jam. Benih yang sudah berkecambah 1 mm, kemudian disebar merata di bedengan persemaian.

##### 3.4.1.2 Persiapan lahan

Lahan sawah disiapkan 15 hari sebelum tanam. Pengolahan tanah dilakukan 2-3 kali. Pengolahan I, tanah dibajak dalam keadaan macak-macak; pengolahan II, tanah dibajak dan digaru untuk meratakan lahan agar siap ditanami bibit padi. Pada pengolahan tanah terakhir (III), diberikan pupuk kandang atau pupuk kompos jerami.

##### 3.4.1.3 Penanaman

Penanaman dilakukan pada saat bibit yang siap tanam, dengan sistem tanam pindah (*transplanting*). Bibit yang sudah berumur  $\pm$  15 hari setelah sebar, dapat dipindah di lahan penanaman. Jarak tanam yang digunakan 20 cm x 20 cm dan ditanam 1 bibit per rumpun. Setiap plot pada setiap blok mempunyai 3 baris, baris galur F<sub>1</sub> ditanam berseling diantara baris galur tetua jantan (lampiran 2). Galur F<sub>5</sub> ditanam pada baris pertama, kemudian 1 baris galur F<sub>1</sub> ditanam, setelah itu 1 baris galur tetua jantan ditanam lagi (tetua jantan – galur F<sub>1</sub> – tetua jantan). Tiap baris ditanami 12 rumpun bibit padi.

##### 3.4.1.4 Pemupukan

Pemupukan dilakukan dengan cara menebar pupuk merata ke seluruh areal tanam. Dosis pemupukan yaitu pupuk urea 300 kg/Ha, KCl 100 kg/Ha dan SP36 150 kg/Ha. Pupuk urea diaplikasikan 3 kali, aplikasi pertama dilakukan sebelum tanam (100 kg/Ha), aplikasi kedua pada umur

21 hst (100 kg/Ha) dan terakhir pada umur 45 hst (100 kg/Ha). Pupuk KCl dan SP36 diaplikasikan sebagai pupuk dasar pada awal sebelum tanam.

#### 3.4.1.5 Perawatan

Perawatan dilakukan dengan membersihkan area pertanaman dari gulma dan tanaman lain yang tidak diinginkan. Secara periodik juga dilakukan pengamatan terhadap kemungkinan adanya organisme pengganggu tanaman (OPT) dengan cara melakukan pengamatan tiap minggu, mulai dari persemaian hingga tanaman menjelang panen. Selain pengendalian OPT juga dilakukan pengairan, dimana kondisi sawah tetap dijaga agar dalam kondisi basah. Untuk musim hujan jika air berlebih, maka air perlu dialirkan keluar sawah.

#### 3.4.2 Inokulasi Buatan Hawar Daun Bakteri

Metode inokulasi buatan yang digunakan adalah metode pengguntingan daun (*leaf cutting method*). Metode pengguntingan daun adalah metode yang paling umum digunakan dari semua metode inokulasi pada hawar daun bakteri. Inokulasi dilakukan pada saat tanaman mencapai umur 60 hst. Isolat bakteri berasal dari daun tanaman rentan hawar daun bakteri yang sudah terinfeksi penyakit dan diambil secara acak. Daun yang terinfeksi diambil dan dipotong kecil-kecil (1 cm), kemudian dicuci dengan aquades. Air cucian ditampung dalam ember, kemudian potongan daun diremas-remas.

Inokulasi dilakukan dengan cara pengguntingan daun sebagai jalan masuk bagi infeksi bakteri untuk pelukaan. Hasil laboratorium menunjukkan kerapatan populasi bakteri *Xanthomonas oryzae* yang digunakan sebagai inokulum adalah  $2,69 \times 10^9$  CFU/ml. Pengguntingan daun dilakukan dengan cara menggunting ujung daun menggunakan gunting. Ujung daun padi dipotong sekitar sepertiga panjang tanaman padi  $\pm 5$  cm. Ujung daun yang telah dipotong kemudian dicelupkan ke dalam ember berisi air cucian isolat bakteri hawar daun bakteri. Gejala serangan dapat diamati setelah 3 minggu dengan metode skoring (tabel 1).

#### 3.4.3 Uji Sterilitas Polen

Uji sterilitas dilakukan dengan metode pewarnaan serbuk sari. Serbuk sari diambil dari 5 sampel/galur pada stadia 6 pertumbuhan tanaman (*heading*).

Pengambilan serbuk sari dilakukan pada bunga padi yang belum mekar (umur 68 – 75 hst), dilakukan pada pagi hari antara pukul 08.00 – 10.00. Empat sampai lima kepala sari (*anther*) diambil dari bunga untuk diekstrak pada gelas obyek, kemudian serbuk sari dikeluarkan dengan pinset dan diletakkan di atas kaca obyek. Serbuk sari dihaluskan dengan cara dipukul-pukul menggunakan ujung pinset yang tumpul, kemudian ditetesi dengan 1–2 tetes larutan 1% *Iodine Kalium Iodide* ( $I_2KI$ ). Serbuk sari yang sudah ditetesi lalu ditutup dengan kaca penutup (*cover glass*) dan ditekan secara memutar (*squash*). Sterilitas serbuk sari siap diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 10 x 10.

### 3.5 Pengamatan

#### 3.5.1 Sterilitas Polen

Diamati menggunakan mikroskop pada perbesaran 10 x 10, setelah serbuk sari diwarnai dengan larutan *Iodine Kalium Iodide* ( $I_2KI$ ) 1%. Pengamatan serbuk sari minimal dilakukan pada 4 bidang pandang mikroskop. Polen yang layu dan tidak terwarnai (*unstained withered, unstained spherical*) atau terwarnai sebagian (*partially stained round*) dikelompokkan sebagai serbuk sari steril, sedangkan serbuk sari yang bulat terwarnai (*stained round*) merupakan serbuk sari yang fertil. Klasifikasi polen yang dinyatakan steril atau fertil dapat dilihat pada contoh (gambar 1).

Selain pengamatan secara mikroskopis, dilakukan juga pengamatan karakter. Pengamatan karakter yang dilakukan yaitu pengamatan warna polen dan posisi malai dari helai pelepah daun bendera. Warna polen yang diamati dikelompokkan menjadi warna putih, putih kekuningan dan warna kuning. Sedangkan pengamatan posisi malai dikelompokkan menjadi 2, yaitu posisi malai di atas helai pelepah daun bendera dan di bawah helai pelepah daun bendera.

#### 3.5.2 Skoring Serangan Penyakit Hawar Daun Bakteri

Setiap rumpun yang diamati diberi skor terhadap gejala serangan hawar daun bakteri. Penentuan tanggap tanaman dilakukan 3 minggu setelah inokulasi dengan cara menilai/skoring luas gejala infeksi penyakit berdasarkan *Standar Evaluation System* (IRRI, 1996) seperti tertera pada tabel 1.

Skor 1 memperlihatkan tingkatan sangat tahan (ST), skor 3 memperlihatkan tingkatan tahan (T), skor 5 memperlihatkan tingkatan agak tahan

(AT), skor 7 memperlihatkan tingkatan agak rentan (AR) dan skor 9 memperlihatkan tingkatan sangat rentan (SR). Sampel yang diamati ada 5 tanaman. Pengamatan gejala hawar daun bakteri dilihat dari luasan serangan yang muncul pada setiap helai daun pada rumpun padi. Dihitung panjang daun yang terkena serangan hawar daun bakteri untuk skoring.

### 3.5.3 Intensitas Serangan Penyakit Hawar Daun Bakteri

Intensitas serangan adalah kemampuan menyerang patogen dalam suatu populasi tanaman, dihitung dengan menggunakan rumus dari IRRI (1996):

$$IS = \frac{\sum n \times v}{\sum N \times V} \times 100\%$$

Keterangan : IS = Intensitas Serangan hawar daun bakteri

n = Jumlah rumpun yang terkena hawar daun bakteri

v = Nilai skor serangan tiap rumpun

N = Jumlah tanaman dari semua rumpun yang diamati

V = Nilai skor serangan hawar daun bakteri tertinggi

Intensitas serangan dihitung dalam bentuk persentase (%). Setelah mengetahui tingkat serangan penyakit hawar daun bakteri, maka dapat dilihat tingkat ketahanan penyakitnya (tabel 1).

Tabel 1. Skoring gejala penularan hawar daun bakteri pada tanaman padi berdasarkan *Standar Evaluation System* (IRRI, 1996).

Nilai Skoring	Tingkat serangan (%)	Tingkat ketahanan
1	1 – 5	Sangat tahan (ST)
3	6 – 12	Tahan (T)
5	13 – 25	Agak tahan (AT)
7	26 – 50	Agak rentan (AR)
9	51 – 100	Sangat rentan (SR)

### 3.6 Analisis Data

Menganalisis nilai dari semua galur yang dibandingkan dengan tiap varietas pembanding dengan menggunakan metode perluasan (*Augmented Design*) yaitu :

1. Menghitung nilai rata-rata setiap varietas pembanding pada setiap blok.

Tabel 2. Nilai rata-rata varietas pembanding pada tiap blok.

Varietas Pembanding (c)	Blok (r)			Jumlah	Rata-rata
	1	2	R		
C <sub>1</sub>	X <sub>1.1</sub>	X <sub>1.2</sub>	X <sub>1.r</sub>	C <sub>1</sub>	x <sub>1</sub>
C <sub>2</sub>	X <sub>2.1</sub>	X <sub>2.2</sub>	X <sub>2.r</sub>	C <sub>2</sub>	X <sub>2</sub>
C <sub>3</sub>	X <sub>3.1</sub>	X <sub>3.2</sub>	X <sub>3.r</sub>	C <sub>3</sub>	X <sub>3</sub>
Jumlah	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>r</sub>	G	
Rata-rata	x.1	x.2	x.r		X

Ket : C<sub>1</sub> . . . Cr = Total hasil masing-masing varietas pada semua blok

R<sub>1</sub> . . . R<sub>r</sub> = Total hasil masing-masing blok

G = Total hasil semua varietas pada keseluruhan blok

x<sub>1</sub> . . . x<sub>r</sub> = C/r = Rata-rata masing-masing varietas pada semua blok

x = G/rc = Rata-rata semua varietas pada semua blok

2. Menghitung hasil penyesuaian dari tiap galur pada setiap bloknya

Tabel 3. Hasil pengamatan dibandingkan dengan hasil penyesuaian.

Galur	Hasil	
	Pengamatan	Penyesuaian
1	Y <sub>1j</sub>	y <sub>1j</sub>
2	Y <sub>2j</sub>	y <sub>2j</sub>
3	.	.
.	.	.
.	.	.
V	y <sub>vj</sub>	y <sub>vj</sub>

Ket : y<sub>1j</sub> .y<sub>vj</sub> = Hasil dari seleksi galur pada j blok

y<sub>1j</sub>...y<sub>vj</sub> = y<sub>ij</sub> A<sub>r</sub>

3. Menghitung nilai ANOVA dari varietas pembanding

Tabel 4. ANOVA dari varietas pembanding dari metode perluasan:

Sumber	db	SS	MSS
Antar galur (e)	e-1	eSS	eMS
Antar varietas (c)	c-1	cSS	cMS
Varietas (v)	v-1	vSS	vMS
c X v	1	cvSS	cvMS
Galat	c(b-1)	ESS	EMS
Total	N-1	TSS	

(Sharma, 2006)

Dimana :

- GCF (faktor koreksi) =  $GT^2/N$
- TSS =  $\sum_{i=1}^c \sum_{j=1}^b c_{ij}^2 + \sum_{l=1}^v v_l^2 - GCF$
- eSS =  $\frac{\sum_i^c TC_i^2}{3} + \sum_l^v v_l^2 - GCF$
- cCF =  $Tc^2/bc$
- cSS =  $\frac{\sum_i^c TC_i^2}{3} - cCF$
- cMS =  $cSS/(c-1)$
- vCF =  $Tv^2/v$
- vSS =  $\sum_l^v v_l^2 - vCF$
- vMS =  $vSS/(v-1)$
- cvSS =  $eSS - cSS - vSS$
- cvMS =  $cvSS/1$
- ESS =  $TSS - eSS$
- EMS =  $ESS/c(b-1)$

4. Perhitungan dilanjutkan dengan menghitung perbedaan rata-rata antar galur dan kultivar pembanding dengan Uji LSI pada taraf 5% (Baihaki, 2000) :

$$LSI = t_{\alpha} \sqrt{\frac{(r+1)(c+1)MSE}{rc}}$$

Dimana  $t_{\alpha}$  = nilai t-student pada derajat bebas error  $(r-1)(c-1)$ , yaitu derajat bebas dari MSE, c = jumlah ulangan cek, r = jumlah ulangan entri, dan MSE = varians error percobaan.

5. Nilai penyesuaian tiap galur dibandingkan dengan nilai observasi+LSI sebagai batas atas dan nilai observasi-LSI sebagai batas bawah galat.

