

III. BAHAN DAN METODE

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Penyakit Tumbuhan dan *screen house* Fakultas Pertanian, Universitas Brawijaya, Malang di mulai pada bulan Januari 2013 – Juni 2013.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: autoklaf, laminar air flow, inkubator, timbangan analitik, gelas ukur, erlenmeyer, cawan petri, polibag, tabung reaksi, bunsen, corming tube, *ependorf*, mikropipet, plastik wrapping, aluminium foil, pipet, pinset, spatula, gunting, kapas, scalpel, ose, penggaris, *cork borer*, baki tertutup, *object glass*, *cover glass*, tube, dan vortex mixer.

Bahan yang digunakan dalam penelitian antara lain: *Bacillus* sp. Isolat UB-ABS1, UB-ABS2, UB-ABS3, UB-ABS4, dan UB-ABS5, *Pseudomonas* sp. Isolat UB-PF2 dan UB-PF5 koleksi Laboratorium Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian, Universitas Brawijaya, Nutrient agar (NA), King's B, aquades steril, alkohol 70%, tanah, benih Jagung (P21), larutan gula, formalin 4%, dan Fungisida berbahan aktif Dimetomorf 50%.

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Uji Penghambatan Sporulasi dan Perkecambahan Jamur *Peronosclerospora maydis* dengan Bakteri Antagonis

Penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 9 perlakuan (kontrol, 5 isolat *Bacillus* sp. UB-ABS1, UB-ABS2, UB-ABS3, UB-ABS4, dan UB-ABS5, 2 isolat *Pseudomonas* sp. UB-PF2 dan UB-PF5, (Lampiran 16.) serta Fungisida berbahan aktif Dimetomorf 50%. Masing-masing perlakuan diulang 3 kali. Rancangan perlakuan uji sporulasi dan perkecambahan jamur patogen *Peronosclerospora maydis* dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel.1 Rancangan perlakuan uji sporulasi dan perkecambahan jamur patogen *Peronosclerospora maydis*

Perlakuan	Isolat <i>Bacillus</i> sp. (cfu/ml)	Isolat <i>Pseudomonas</i> sp. (cfu/ml)	Dimetomorf 50 % (5gr/L (ml))
P1	10 ⁹ (UB-ABS1)	0	0
P2	10 ⁹ (UB-ABS2)	0	0
P3	10 ⁹ (UB-ABS3)	0	0
P4	10 ⁹ (UB-ABS4)	0	0
P5	10 ⁹ (UB-ABS5)	0	0
P6	0	10 ⁹ (UB-PF2)	0
P7	0	10 ⁹ (UB-PF5)	0
P8	0	0	300
P9	0	0	0

(Kontrol)

Keterangan : Kontrol (P9) aplikasi menggunakan aquades steril.

3.3.2 Uji Penekanan Serangan Penyakit Bulai dengan Bakteri Antagonis

Penelitian menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) dengan 10 perlakuan (kontrol, 5 isolat *Bacillus* sp. UB-ABS1, UB-ABS2, UB-ABS3, UB-ABS4, dan UB-ABS5, 2 isolat *Pseudomonas* sp. UB-PF2 dan UB-PF5, serta Fungisida berbahan aktif Dimetomorf 50%. Masing-masing perlakuan diulang 3 kali. Rancangan uji penekanan serangan penyakit bulai dengan bakteri antagonis dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Perlakuan uji penekanan serangan penyakit bulai dengan bakteri *Bacillus* sp. dan *Pseudomonas* sp.

Perlakuan	<i>P. maydis</i> (Spora/ml)	Isolat <i>Bacillus</i> sp. (cfu/ml)	Isolat <i>Pseudomonas</i> sp. (cfu/ml)	Dimetomorf 50% (5gr/L (ml))
POA (Kontrol)	0	0	0	0
POB (Kontrol)	10 ³	0	0	0
P1	10 ³	10 ⁹ (UB-ABS1)	0	0
P2	10 ³	10 ⁹ (UB-ABS2)	0	0
P3	10 ³	10 ⁹ (UB-ABS3)	0	0
P4	10 ³	10 ⁹ (UB-ABS4)	0	0
P5	10 ³	10 ⁹ (UB-ABS5)	0	0
P6	10 ³	0	10 ⁹ (UB-PF2)	0
P7	10 ³	0	10 ⁹ (UB-PF5)	0
P8	10 ³	0	0	300

Keterangan: Kontrol (POA) tanaman tidak diinokulasi patogen *P. maydis* dan tidak diberi perlakuan bakteri antagonis; Kontrol (POB) tanaman diinokulasi patogen *P. maydis* tidak diberi perlakuan bakteri antagonis.

3.4 Pelaksanaan Penelitian

3.4.1 Uji Penghambatan Sporulasi dan Perkecambahan Jamur *Peronosclerospora maydis* Menggunakan Bakteri Antagonis *Bacillus* sp. dan *Pseudomonas* sp.

1. Perbanyak Bakteri *Bacillus* sp. dan *Pseudomonas* sp.

Isolat bakteri berasal dari koleksi Laboratorium Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya, Malang. Isolat-isolat (*Bacillus* sp. dan *Pseudomonas* sp.) tersebut ditumbuhkan kembali pada media NA dan diinkubasi pada suhu ruang selama 2 x 24 jam (Lampiran 16.).

2. Purifikasi Bakteri

Koloni biakan 48 jam diremajakan kembali dengan cara mengambil satu koloni tunggal menggunakan jarum ose steril kemudian digores pada permukaan media NA (isolat *Bacillus* sp.) dan media King's B (*Pseudomonas* sp.). Kemudian diinkubasi selama 48 jam.

3. Perlakuan Penghambatan Sporulasi dan Perkecambahan Jamur *P. maydis*.

Daun yang terinfeksi bulai diisolasi dengan memotong pangkal daun pada sore hari. Kemudian daun di cuci dan di bersihkan dengan spon secara perlahan di bawah air mengalir pada bagian permukaan dan bawah daun. Daun disemprot dengan masing-masing perlakuan secara merata keseluruhan permukaan daun. Kemudian daun diletakan pada wadah yang berisi tisu dan larutan gula 10%, dan diinkubasi selama 6-12 jam pada kondisi gelap dan lembab.

4. Pengamatan Sporulasi dan Perkecambahan Jamur Patogen *P. maydis*

Setelah diinkubasi selama 12 jam, spora yang muncul pada bagian daun di isolasi menggunakan *cork borer* diameter 1 cm. Untuk mempermudah pengamatan, cakram daun tersebut disuspensikan dengan cara di masukan kedalam tabung yang sudah berisi aquadest steril (sejumlah 1 ml), kemudian dikocok menggunakan *vortex mixer* selama 10 detik agar spora terlepas dari cakram daun, kemudian diambil 50 μ l, diteteskan di atas gelas objek (preparat) dan diwarnai dengan *lactofenol blue*. Jumlah spora keseluruhan dan jumlah spora yang berkecambah dihitung dengan pengamatan dibawah mikroskop. Masing-

masing perlakuan diulang sebanyak 3 kali ulangan. Pelaksanaan tahap ini dapat dilihat pada Gambar Lampiran 19 dan 20.

5. Parameter Pengamatan

Parameter pengamatan persentase spora *P.maydis* yang berkecambah dihitung dengan rumus sebagai berikut:

Persentase spora yang berkecambah dihitung dengan menggunakan rumus :

$$\% \text{ perkecambahan spora } P. \text{ maydis} = \frac{\text{Spora yang berkecambah}}{\text{Total Spora yang diamati}} \times 100\%$$

3.4.2 Uji Penghambatan Penyakit Bulai dengan Bakteri Antagonis *Bacillus* sp. dan *Pseudomonas* sp.

1. Perbanyakkan Bakteri *Bacillus* sp. dan *Pseudomonas* sp.

Isolat bakteri berasal dari koleksi Laboratorium Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya, Malang. Isolat-isolat (*Bacillus* sp. dan *Pseudomonas* sp.) tersebut ditumbuhkan kembali pada media NA dan diinkubasi pada suhu ruang selama 2 x 24 jam.

2. Purifikasi Bakteri

Koloni biakan 48 jam diremajakan kembali dengan cara mengambil 1 koloni tunggal menggunakan jarum ose steril kemudian digoreskan pada permukaan media NA (isolat *Bacillus* sp.) dan media King's B (*Pseudomonas* sp.) dan dinkubasi selama 48 jam.

3. Persiapan Benih dan Media Tanam

Benih jagung varietas P21 di cuci dengan air bersih dari pestisida dan disiapkan pada wadah yang steril. Media tanam yang digunakan disterilisasi terlebih dahulu menggunakan larutan formalin 4% dan dikeringanginkan. Benih jagung ditanam pada media tanah steril, 1 polybag berisi 5 benih jagung.

4. Persiapan Suspensi Spora Bulai

Spora *P. maydis* di koleksi dari daun tanaman jagung yang sakit pada pukul 03:00 dini hari. Spora tersebut disesuaikan pada konsentrasi 10^3 spora/ml dalam larutan gula 5%. Tahap pelaksanaan dapat dilihat pada Gambar Lampiran 18 dan Lampiran 19.

5. Perlakuan Bakteri Antagonis *Bacillus* sp. dan *Pseudomonas* sp.

Suspensi bakteri antagonis (*Bacillus* sp. dan *Pseudomonas* sp.) yang telah disesuaikan pada konsentrasi 10^9 cfu/ml disebarkan dengan cara disemprot pada

seluruh permukaan daun tanaman jagung yang berumur 9 hari setelah tanam sebanyak 10 ml per tanaman (Gambar Lampiran 17).

6. Inokulasi *Peronosclerospora maydis*

Sehari setelah tanaman jagung disemprot dengan menggunakan bakteri antagonis (10 HST), tanaman diinokulasikan dengan patogen *P. maydis* secara merata sebanyak 5 ml per tanaman pada pukul 03.00 dini hari.

7. Parameter Pengamatan

Parameter Pengamatan yang dilakukan meliputi pertumbuhan jagung:

- a) Tinggi tanaman: Tinggi tanaman diukur dari pangkal batang sampai titik tumbuh. Satuan pengukuran dalam centimeter (cm).
- b) Diameter batang: Diameter batang diukur pada pertengahan batang yang diukur dari permukaan tanah.
- c) Jumlah daun: Jumlah daun diperoleh dengan menghitung jumlah daun yang telah membuka sempurna. Satuan pengukuran dalam helai.
- d) Persentase penyakit: persentase penyakit tanaman yang terserang bulai dihitung dengan rumus seperti yang dikemukakan Wang (1998) :

$$P = a/b \times 100\%$$

Keterangan :

P : Persentase penyakit

a : Jumlah tanaman yang terinfeksi bulai

b : Jumlah tanaman yang diamati

Pengamatan dilakukan mulai 7, 14, 21 dan 28 hari setelah inokulasi jamur patogen *P.maydis* pada tanaman jagung.

3.5 Analisis Data

Data pengamatan dianalisis dengan menggunakan analisis ragam ANOVA pada taraf 5%. Bila hasil pengujian terdapat perbedaan yang nyata maka dilanjutkan dengan uji Duncan pada taraf 5%.