

III. METODOLOGI

3.1 Tempat dan waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Bakteriologi, Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya dan *green House*, terletak dilokasi Desa Tambaksari, Kecamatan Pakisaji, Kabupaten Malang. Waktu pelaksanaan dilakukan pada bulan Februari 2014 sampai dengan bulan Juli 2014.

3.2 Alat dan bahan

Alat yang digunakan meliputi : Cawan petri diameter 9 cm, botol youC1000 250 ml, jarum ose, *beaker glass*, erlemayer, spatula, *laminar air flow cabinet*, autoclave, botol selai 250 ml, pinset, scapel, tabung reaksi 10 ml, Tube evenfov 1,5 ml, thips, stick L, bunsen, Thermo-higrometer, gembor 1 ltr, timba, polybag ukuran 5 kg, penggaris 30 cm, *handcounter*. Bahan yang digunakan meliputi : bakteri *R. solanacearum*, aquades, alkohol 70%, alkohol 95% , spiritus, kapas putih 250 gr, plastik wrapping, aluminium foil, media buatan (Natrium Agar, Tetra Zolium Clorida), tanaman tomat berumur 20 hst, air, tanah endemik dan Non Endemik.

No	Perlakuan	Lokasi	Keterangan	Ketinggian tempat
1	A0	Karang plosor	Endemik	-
2	A1	Nganjuk	Non endemik	>400 mdpl
3	A2	Pakisaji	Non endemik	400 – 600 mdpl
4	A3	Joyogrand	Non endemik	600 – 800 mdpl
5	A4	Gunung sari	Non endemik	800 – 1000 mdpl
6	A5	Sidomulyo	Non endemik	1000 – 1200 mdpl
7	A6	Junggo	Non endemik	1200 – 1400 mpdl
8	A7	Junggo	Non endemik	>1400 mpdl

3.3 Metode penelitian

3.3.1 Survei Lapang

Survei lapang bertujuan untuk mengetahui sejarah lahan dan keadaan yang terjadi dilokasi pengambilan sampel tanah. Lokasi pengambilan sampel tanah terdapat delapan lokasi yang meliputi : ketinggian tempat yang berbeda, keadaan lokasi sampel (intensitas penyakit akibat layu bakteri dan kesehatan tanaman). Sejarah lahan didapatkan dengan melakukan wawancara pada korespondensi atau

petani pemilik lahan pada lokasi pengambilan sampel tanah. Wawancara terhadap korespondensi atau petani meliputi : Sejarah terbentuknya lahan, kenampakan kesehatan tanaman, pupuk yang digunakan serta dosisnya, pestisida yang digunakan beserta dosisnya, pergiliran tanaman yang digunakan, varietas yang digunakan, benih yang didapatkan, cara pembibitan yang dilakukan sebelum penanaman dilahan, proses pengairan untuk lahan, proses pengolahan lahan, proses penyiangan gulma pada sekitar tanaman, proses perawatan pada tanaman, dan produktivitas tanaman yang dimiliki korespondensi. Hasil wawancara terhadap petani pemilik lahan dari delapan lokasi yang berbeda terlampir pada (Lampiran 1).

3.3.2 Percobaan di greenhouse

Percobaan dilakukan di greenhouse dengan menggunakan tanah yang berbeda dari lapangan, dan melakukan analisa faktor abiotik berupa sifat kimia tanah yaitu unsur nitrogen, fosfor, kalium, C-organik dan keasaman tanah (pH). Setelah itu dilanjutkan dengan pengujian pengaruh sifat kimia tanah terhadap daya hambat perkembangan penyakit layu yang disebabkan oleh *R. solanacearum* dengan menerapkan penanaman tomat pada polybag.

Rancangan percobaan yang dilakukan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL), dengan delapan perlakuan dan diulang empat kali. Adapun tabel untuk perlakuan tanah yang diambil dari delapan lokasi sampel berbeda adalah sebagai berikut :

No	Perlakuan	Ketinggian tempat	Lokasi	Keterangan
1	A0	-	Karang plosu	Endemik
2	A1	>400 mdpl	Nganjuk	Non endemik
3	A2	400 – 600 mdpl	Pakisaji	Non endemik
4	A3	600 – 800 mdpl	Joyogrand	Non endemik
5	A4	800 – 1000 mdpl	Gunung sari	Non endemik
6	A5	1000 – 1200 mdpl	Sidomulyo	Non endemik
7	A6	1200 – 1400 mpdl	Junggo	Non endemik
8	A7	>1400 mpdl	Junggo	Non endemik

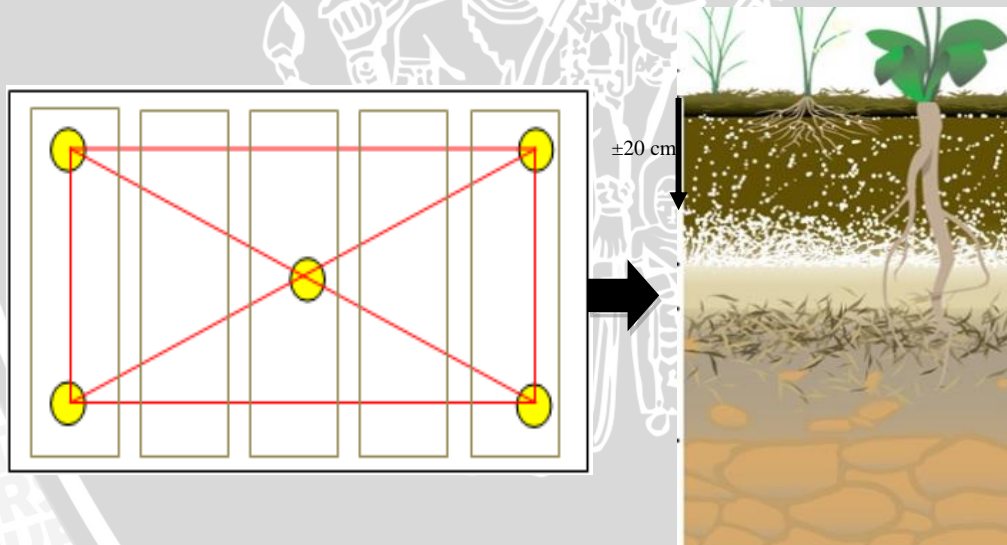
3.4 Pelaksanaan Penelitian

3.4.1 Analisis sifat kimia tanah

a. Pengambilan sampel tanah

Analisis kimia tanah, maka digunakan teknik diagonal sampling pada pengambilan sampel tanah. Dengan mengambil secara diagonal sampel tanah pada lahan tersebut. Kedalaman untuk pengambilan sampel tanah yaitu antara 10–20 cm. kemudian setiap sampel tanah dijadikan menjadi satu menjadi tanah komposit. Setelah itu dilakukan pengeringan dengan angin atau kering angin, dan dilakukan analisis kandungan unsur kimia dalam tanah tersebut, terutama unsur N, P, K, C-organik dan pH tanah.

Contoh tanah seperti ini dapat dikatakan sebagai contoh tanah terganggu yang digunakan untuk menganalisis sifat kimia tanah. Kondisi tanah terganggu tidak sama dengan keadaan dilapangan, karena sudah terganggu sejak dalam pengambilan contoh, contoh tanah ini dapat dikemas menggunakan kantong plastik sebagai sampel komposit (Suganda *et al.*,2000).



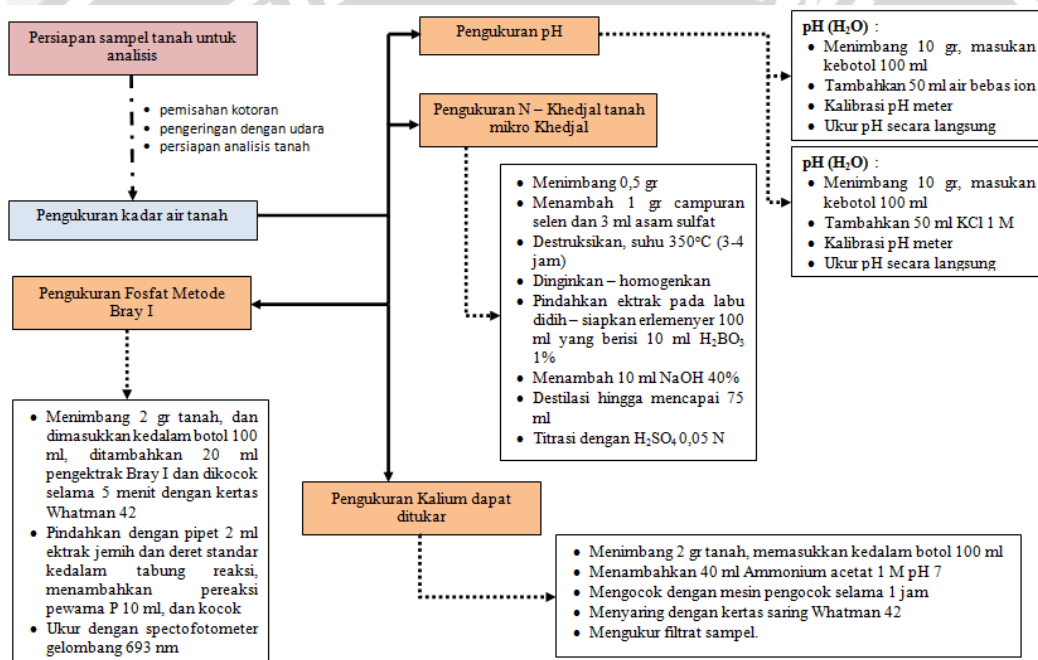
Gambar4. Pengambilan sampel tanah secara diagonal sampling dan kedalaman pengambilan sampel tanah

Keterangan :

● : titik pengambilan sampel

b. Analisis sifat kimia tanah

Analisis uji faktor abiotik tanah berupa analisis kimia tanah dilakukan di Laboratorium Pengujian Balai Penelitian Tanaman Kacang–Kacangan dan Umbi–Umbian, Malang. Dengan melakukan analisis kandungan kimia tanah pada lahan yang berbeda yaitu endemik dan non endemik, analisis dilakukan untuk mengetahui kandungan unsur nitrogen, fosfor, kalium, C-organik dan keasaman tanah (pH). Petunjuk untuk menetapkan kandungan kimia pada tanah berupa kandungan N, P, K, C-organik dan keasaman tanah. Sesuai dengan petunjuk kerja pada Laboratorium Pengujian tanah Balai Penelitian Tanaman Kacang–Kacangan dan Umbi–Umbian, Malang. Prosedur petunjuk teknis kerja analisis lab uji tanah terdapat pada Lampiran 7.



Gambar 5. Prosedur analisis kimia tanah di lab. Uji tanah BALITKABI, Malang

3.4.2 Pengujian sifat kimia tanah terhadap penyakit layu bakteri

a. Sterilisasi alat dan bahan

Alat yang digunakan untuk penelitian dicuci hingga bersih dengan menggunakan sabun kemudian dikeringkan. Setelah alat kering, seperti cawan petri terlebih dahulu dilakukan pembungkusan dengan kertas agar pada saat dilakukan *autoclave* tidak terjadi benturan langsung antar cawan, kemudian dimasukkan kedalam *autoclave* sampai dengan suhu 121°C. Selain cawan petri terdapat alat lain seperti thips untuk mikropipet, tube evendof 1,5 ml dan kertas whatman dilakukan sterilisasi dengan membungkusnya menggunakan plastik

polipropilen yang tahan panas. Untuk bahan yang digunakan dalam penelitian seperti aquades steril dimasukkan kedalam botol media atau erlemayer dan ditutup dengan aluminium foil pada bagian mulut botol dan dimasukkan kedalam autoclaf untuk dilakukan sterilisasi.

b. Penyediaan isolat bakteri

Isolat bakteri didapatkan dari hasil koleksi Laboratorium Bakteriologi, Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya. Isolat diperbanyak sesuai yang diperlukan untuk proses uji coba di *green house*. Perbanyak isolat dapat menggunakan media padat seperti Natrium agar terlebih dahulu untuk meremajakan kembali isolat bakteri, setelah itu dipindahkan kedalam media cair dengan bahan aquades dan natrium yang telah dicampur dan disterilkan. Pemandahan bakteri di media cair bertujuan untuk mempercepat perbanyak bakteri yang diperoleh.

c. Persiapan media tanam

Media tanam yang diperlukan berupa tanah yang terdapat pada delapan lokasi yang berbeda dilapangan. Tanah yang didapatkan dari delapan lokasi yang berbeda dilapangan dipindahkan kedalam polybag dengan ukuran 22 x 30 cm, setelah itu dilakukan penanaman tanaman tomat yang telah berumur 14 hss (hari setelah semai).

d. Penanaman tanaman tomat

Menyiapkan media untuk penanaman tomat pada polybag volume 5 kg, dan dengan batas pengisian tanah 5 cm dari permukaan polybag. Bibit tanaman tomat yang telah siap untuk ditanam, dipindahkan kedalam polybag yang telah diisi media tanah. Dalam satu perlakuan satu ulangan terdapat 2 tanaman tomat, maka total keseluruhan tanaman terdapat 64 tanaman. Pada umur 21 hst (hari setelah tanam) tanaman tomat dilakukan pengajiran yang terbuat dari bambu yang dibelah-belah dengan ukuran lebar antar 2-3 cm, dan panjang 1,75 m. Ajir ditancapkan kedalam tanah sedalam ± 20 cm, berjarak antara 10–15 cm dari tanaman, kemudian tanaman diikat pada ajir yang telah ditancapkan dengan menggunakan tali rafia agar tanaman tidak roboh dan tanaman dapat tumbuh keatas.

e. Inokulasi bakteri

Kerapatan populasi *R. solanacearum* untuk inokulasi adalah 10^8 cfu/ml yang diukur dengan menggunakan *spectofotometer* pada OD₆₀₀ (Kiba *et al.*, 2007). Inokulasi bakteri *R. solanacearum* dengan cara menuangkan 80 ml suspensi bakteri kedalam tanah dengan ketentuan telah dihitung kerapatan bakteri sampai 10^8 cfu/ml. Waktu inokulasi bakteri ke tanaman pada saat tanaman berumur 14 hst, aplikasi bakteri dilakukan pagi hari.

f. Pemeliharaan tanaman tomat

Pemeliharaan tanaman dilakukan dengan melakukan penyiraman tanaman 1-2 kali setiap hari. Penyiraman dapat dilakukan pada waktu pagi hari atau pada waktu sore hari. Selain itu juga melakukan penyiangan gulma pada polybag, penyiangan dilakukan dengan cara mekanis yaitu mencabut tumbuhan liar yang tumbuh pada polybag pada waktu umur tanaman 1-2 minggu.

3.5 Parameter pengamatan

3.5.1 Pengamatan penyakit

Intesitas tanaman sakit ialah persentase tanaman yang terinfeksi penyakit pada suatu area secara kuantitatif yang dapat dihitung. Tanaman terinfeksi penyakit setelah umur tanaman 26 hst, dan diamati setiap tiga hari sekali setelah tanaman terserang. Pengamatan intensitas penyakit dilakukan sampai akhir pencabutan tanaman tomat pada percobaan. Selain itu, intensitas penyakit bersifat sistemik dimana pengamatan tidak dapat diketahui skala penyakit yang menyerang tanaman. Persentase tanaman berpenyakit dapat dihitung dengan menggunakan rumus berikut (Abadi,2003) :

$$IP = \frac{a}{b} \times 100\%$$

Keterangan :

IP : Intensitas Serangan Penyakit (%)

a : Jumlah tanaman yang terserang penyakit

b : Jumlah tanaman yang diamati

3.5.2 Tinggi tanaman

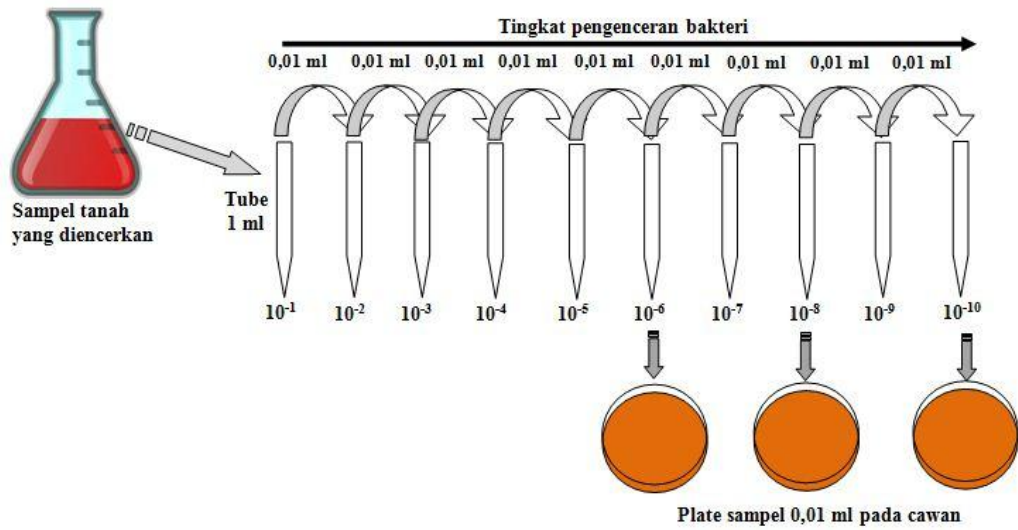
Pertumbuhan tanaman merupakan faktor penting dalam penentuan kesehatan tanaman, salah satunya ialah pengamatan tinggi tanaman dilakukan untuk mengetahui skala pertumbuhan tanaman, agar dapat diketahui bahwa tanaman tersebut sehat. Pengamatan tinggi tanaman dilakukan dengan interval mingguan. Pengukuran tinggi tanaman dilakukan dari pangkal batang bagian batang sampai pucuk tunas tanaman tomat.

3.5.3 Berat tanaman

Pengamatan berat basah setelah panen dengan cara menimbang secara langsung tanaman dengan menggunakan timbangan analitik dan berat kering tanaman digunakan untuk mengetahui c-organik yang terkandung didalam tanaman. Sebelum menimbang berat kering tanaman dilakukan pengovenan terlebih dahulu dengan suhu 80°C, kemudian menimbang berat kering tanaman dengan menggunakan timbangan analitik.

3.5.4 Populasi bakteri

Populasi bakteri umum diamati melalui teknik pengenceran berseri dengan menggunakan medium agar berupa TTC (*tetrazolium clorida*) atau NA (*Natrium agar*). Melakukan isolasi dari tanah yang telah terinfestasi patogen bakteri pada setiap perlakuan perbandingan tanah. Dengan cara setiap sampel perlakuan diambil sebanyak 1 gram dan kemudian menambahkan aquades steril 10 ml, mengaduk atau mengocok hingga tanah dan aquades tercampur. Setelah itu melakukan pengenceran dari 10^{-1} – 10^{-10} berseri dengan mengambil 100 μ l larutan tanah dengan menggunakan micropipet kemudian memberikan aquades steril pada *tube evendof* hingga mencapai 1 ml. Dari hasil pengenceran dilakukan plating di dalam LAFC pada media TTC atau NA dengan menggunakan 10^{-6} , 10^{-8} , 10^{-10} dan diulang sebanyak tiga kali. Kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam dan dihitung koloni bakteri yang muncul.



Gambar 5. Skema pengenceran bertingkat untuk menghitung populasi bakteri

3.6 Analisis data

Data yang diperoleh diuji dengan menggunakan uji F dengan taraf kesalahan 5% dan apabila dama pengujian sidik ragam diperoleh pengaruh berbeda nyata, maka dilakukan pengujian lanjutan dengan menggunakan uji beda nyata jujur (BNJ) dengan taraf kesalahan 5%.