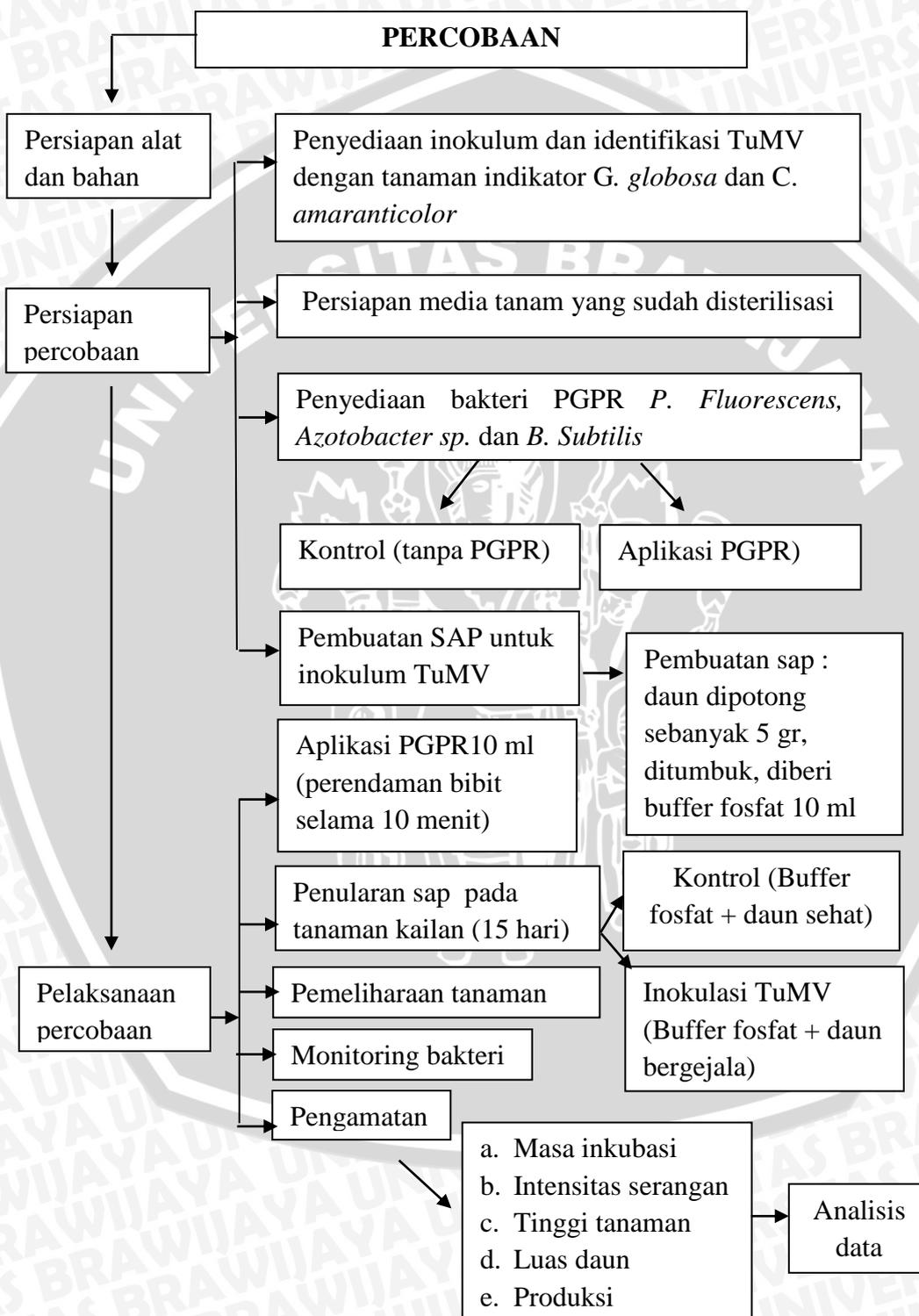


III. BAHAN DAN METODE

Kerangka Operasional Percobaan



Gambar 1. Kerangka operasional

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Rumah Kasa (*Screen House*) Desa Karang Widoro, Kecamatan Dau, Kabupaten Malang dan Laboratorium Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya Malang. Penelitian dilaksanakan pada bulan Mei 2016 sampai dengan Agustus 2016.

3.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam pelaksanaan penelitian ini adalah polybag 3 kg, meteran, label, gunting, plastik, cetok, timbangan analitik, gelas ukur (vol. 100 ml), tabung reaksi, LAFC (*Laminar Air Flow Cabinet*), autoclave, micropipet, jarum ose, mortar dan penumbuk, cawan petri, bunsen, kertas kasa, dan kamera

Bahan yang digunakan yaitu inokulum TuMV yang berasal dari lapang yaitu tanaman sawi yang terserang TuMV. Benih kailan yang digunakan adalah benih kailan varietas Winsa. Tanaman indikator yang digunakan adalah *G. globosa* dan *C. amaranticolor*. Tanah yang sudah disterilisasi dengan formalin 5%, karborundum 600 mesh, aquadest steril, dan buffer fosfat 0,01 M pH 7, pestisida, pupuk kompos, media NA, media Ashby, media King's B, *P. fluorescens*, *Azotobacter* sp. dan *Bacillus subtilis* yang berasal dari Laboratorium Hama dan Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya, Malang.

3.3 Metode Penelitian

Dalam penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) 8 perlakuan dan 3 kali ulangan. Tata letak denah dilakukan pengacakan menggunakan tabel bilangan acak (Lampiran 2). Perlakuan tersebut meliputi :

P₀₊ : Kontrol positif (tanpa pemberian PGPR, tanpa inokulasi TuMV)

P₀₋ : Kontrol negatif (tanpa pemberian PGPR, dengan inokulasi TuMV)

P₁ : Aplikasi PGPR *P. fluorescens*

P₂ : Aplikasi PGPR *Azotobacter* sp.

P₃ : Aplikasi PGPR *B. subtilis*

P₄ : Aplikasi PGPR *P. fluorescens* dan PGPR *Azotobacter* sp.

P₅ : Aplikasi PGPR *P. fluorescens* dan PGPR *B. subtilis*

P₆ : Aplikasi PGPR *Azotobacter* sp. dan PGPR *B. subtilis*

3.4 Persiapan Penelitian

1. Penyediaan Inokulum dan Identifikasi TuMV

Inokulum TuMV yang digunakan berasal dari lapang Desa Tumpang, Kecamatan Tumpang, Kabupaten Malang yaitu pada daun tanaman sawi yang menunjukkan gejala terinfeksi TuMV yaitu memiliki gejala mosaik ringan, daun berwarna hijau kekuningan. Inokulum yang didapat kemudian dilakukan identifikasi sebelum digunakan untuk penelitian. Identifikasi TuMV menggunakan tanaman indikator. Inokulum virus TuMV berupa sap yang diinokulasikan secara mekanis pada tanaman indikator yaitu, *Gomphrena globosa* dan *Chenopodium amaranticolor*. Pada tanaman indikator *G. globosa* mengalami malformasi yaitu daun menggulung ke dalam, dan pigmen hijau (klorofil) berbaur dengan pigmen kuning (Diyansah, 2012). Tanaman indikator *C. amaranticolor* yang terserang TuMV akan menunjukkan gejala lokal klorotik lesion (bercak kuning hingga kemerahan berbentuk spot) dan tidak sistemik (Plant Virus Online, 2016). Apabila gejala tersebut telah muncul pada kedua tanaman indikator, maka penelitian dilanjutkan dengan memperbanyak inokulum TuMV pada tanaman sawi sebelum diinokulasikan pada tanaman kailan.

2. Persiapan Media Tanam

Media tanam yang digunakan yaitu campuran tanah dan kompos. Terlebih dahulu tanah disterilkan dengan menggunakan formalin 5%. Formalin diaplikasikan pada tanah dengan cara disemprotkan pada permukaan tanah yang akan dimasukkan pada polibag kemudian diaduk hingga merata. Selama 7 hari tanah ditutup dengan plastik. Tanah yang telah disterilisasi selama 7 hari dibuka plastik penutupnya, kemudian tanah dikering anginkan selama 2-3 hari. Persiapan media tanaman dilakukan dengan melakukan pengisian tanah pada polibag berukuran 3 kg. Media tanam yang digunakan berupa campuran tanah dan pupuk kompos dengan perbandingan 1:1.

3. Penyediaan Bakteri PGPR

Bakteri PGPR yang digunakan untuk penelitian merupakan PGPR yang berasal dari Laboratorium Bakteriologi Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya Malang. Bakteri PGPR tersebut terdiri dari *P. fluorescens*,

Azotobacter sp. dan *B. subtilis*. Bakteri yang digunakan mempunyai kerapatan 10^8 cfu/ml.

4. Pembuatan SAP untuk Inokulum TuMV

Penularan virus TuMV dalam penelitian ini menggunakan cara mekanis. Inokulum TuMV untuk percobaan disiapkan dalam bentuk sap (cairan perasan). Daun tanaman sawi yang menunjukkan gejala sakit karena infeksi TuMV dicuci untuk menghilangkan kotoran yang ada pada daun, kemudian daun yang telah dicuci disterilkan menggunakan alkohol 70% (termasuk alat, meja, dan tangan), kemudian bagian daun dipotong menggunakan gunting, daun yang telah dipotong diambil sebanyak 5 gram kemudian ditambahkan buffer fosfat 0,01 M dengan pH 7 sebanyak 10 ml dan daun ditumbuk menggunakan mortar. Sap diperoleh dengan cara melakukan penyaringan menggunakan kain kasa.

3.5 Pelaksanaan Penelitian

1. Pengaplikasian PGPR

Pengaplikasian PGPR dilakukan pada akar tanaman kailan dengan cara direndam. Tanaman kailan sebelum dipindahkan ke polybag direndam akarnya menggunakan PGPR sebanyak 10 ml selama 10 menit. Sebanyak 24 benih tanaman kailan varietas Winsa akan digunakan penelitian. Tanaman kailan yang tidak diberikan perlakuan (kontrol), sebanyak 6 tanaman tidak mendapatkan perlakuan perendaman PGPR. Untuk tanaman kailan yang mendapatkan perlakuan maka tanaman yang akan dipindahkan ke polybag direndam terlebih dahulu menggunakan PGPR pada akarnya. Untuk aplikasi PGPR pada tanaman sebanyak 10 ml.

2. Penularan SAP pada Tanaman Uji

Penularan sap dapat dilakukan pada daun muda yang berumur kurang lebih 2 minggu setelah tanam dengan kriteria daun muda telah membuka sempurna. Sap yang telah siap kemudian diinokulasikan secara mekanis pada daun tanaman uji. Pada permukaan daun tanaman sehat yang akan diinokulasi terlebih dahulu ditaburi dengan karborundum 600 mesh dengan menggunakan ibu jari secara

perlahan, kemudian sap dioleskan dengan jari telunjuk secara perlahan dan searah pada permukaan daun. Setelah itu daun kailan yang telah diinokulasi dibiarkan beberapa menit dan dilakukan pembilasan dengan meneteskan aquades pada daun yang diuji.

3. Pemeliharaan Tanaman

Pemeliharaan tanaman meliputi penyiraman, pemberian pupuk, sanitasi gulma, serta pengendalian OPT (Organisme Pengganggu Tanaman). Penyiraman dilakukan setiap hari pada pagi dan sore hari. Hal ini disesuaikan dengan kebutuhan tanaman sehingga tidak mengalami kekeringan dan layu.

4. Monitoring Pertumbuhan PGPR pada Perakaran

Monitoring pertumbuhan bakteri pada PGPR dilakukan pada perakaran tanaman kailan saat tanaman sudah dipanen yaitu pada umur 35 hari. Monitoring bertujuan untuk mengetahui pertumbuhan bakteri pada daerah perakaran dalam tanah setelah diaplikasikan apakah bakteri tersebut masih hidup di dalam perakaran tanaman. Dengan dilakukannya monitoring pada perakaran tanaman kailan ini akan mengetahui bahwa PGPR berperan penting terhadap serangan TuMV, pertumbuhan, dan produksi tanaman kailan.

Media yang digunakan pada penelitian ini adalah King's B, Ashby, dan Nutrien Agar (NA). Media King's B digunakan untuk media pertumbuhan bakteri *P. fluorescens*, media Ashby digunakan untuk media pertumbuhan bakteri *Azotobacter* sp. dan media NA digunakan untuk media pertumbuhan bakteri *B. subtilis*. Isolat bakteri kombinasi ditumbuhkan pada media selektif masing-masing.

Pengamatan bakteri yang berada di perakaran tanaman dapat dilakukan dengan metode isolasi bakteri secara aseptik. Tanah setiap perlakuan dimasukkan sebanyak 5 gram ke dalam tabung erlenmeyer yang dicampur dengan 50 ml akuades steril, lalu di lanjutkan pengenceran 10^{-1} hingga tingkat pengenceran 10^{-9} . Setelah itu pengenceran terakhir diambil 1 ml untuk dicampur dengan media yang berbeda setiap perlakuan.

Terdapat 6 sampel tanah yang akan diisolasi, antara lain sampel tanah perlakuan *P. fluorescens*, *Azotobacter* sp., *B. subtilis*., dan kombinasi *P.*

fluorescens dan *Azotobacter* sp., kombinasi *P. fluorescens* dan *B. subtilis*, serta kombinasi *Azotobacter* sp. dan *B. subtilis*.

Teknik pencampuran menggunakan metode cawan sebar (*Spread Plate*). Pada teknik ini memerlukan media agar yang telah padat. Setelah suspensi bakteri disebar pada media maka selanjutnya diratakan menggunakan batang L. Semua cawan petri diinkubasi pada suhu ruang selama 1-2 hari.

3.6 Variabel Pengamatan

1. Masa inkubasi

Masa inkubasi merupakan periode waktu mulai inokulasi pada gejala pertama kali terlihat pada tanaman yang diinokulasi. Pengamatan masa inkubasi dilakukan setelah inokulasi sampai tanaman muncul gejala pertama pada semua perlakuan. Deskripsi dari pengamatan gejala dilakukan pada bentuk gejala dan letak munculnya gejala yang pertama kali ditemukan. Gejala yang muncul pertama kali yaitu pada daun yang diinokulasi.

2. Intensitas serangan

Intensitas serangan virus merupakan perhitungan besarnya tingkat serangan yang merusak pada tanaman. Pengamatan intensitas serangan dilakukan setiap hari setelah pengamatan sampai masa panen tanaman kailan. Untuk perhitungan intensitas serangan TuMV menggunakan metode skoring, perhitungan intensitas serangan menggunakan rumus (Abadi, 2003) yang dimodifikasi yaitu :

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

Keterangan:

I : Intensitas Serangan

n : Jumlah daun dalam tiap kategori

v : Nilai skala tiap kategori serangan

Z : Nilai skala dari kategori serangan tertinggi

N : Jumlah daun yang diamati

Tabel 1. Penilaian skor daun tanaman sakit berdasarkan gejala mosaik dan malforasi dihitung dengan menggunakan skoring (Abadi, 2003)

Nilai Skala	Kategori Serangan
0	Daun sehat
1	Luas mosaik pada daun < 25%
2	Luas mosaik pada daun $\geq 25\% < 50\%$ disertai melepuh
3	Luas mosaik pada daun $\geq 50\%$ disertai melepuh
4	Malformasi, daun melepuh dan kerdil

3. Tinggi tanaman

Pengukuran tinggi tanaman dilakukan menggunakan mistar dengan satuan centimeter (cm). Pengamatan tinggi tanaman dilakukan dengan cara mengukur tinggi tanaman mulai pangkal batang hingga titik tumbuh tanaman kailan. Pengamatan tinggi tanaman dilakukan setiap seminggu sekali.

4. Luas daun

Pengukuran luas diperoleh dengan menggunakan *Leaf Area Meter* (LAM). Daun tanaman kailan dipotong dengan menggunakan gunting, pemotongan daun tanpa menggunakan batang tanaman sehingga hanya dilakukan pemotongan daunnya saja. Pengamatan luas daun dapat dilakukan saat panen. Cara menggunakan alat pengukur luas daun yaitu memasukkan daun yang sudah dipisahkan dari bagian batang ke dalam alat yang terdapat sensor untuk mengukur luas daun tersebut. Kemudian muncul angka luas daun yang tertera pada layar alat dengan ukuran satuan centimeter persegi (cm²).

5. Produksi tanaman

Pengamatan produksi tanaman dihitung dari hasil tanaman kailan yang telah dipanen dan dipotong bagian akarnya pada setiap perlakuan. Perhitungan produksi tanaman ini yaitu dengan cara menimbang bobot tanaman kailan yang sudah dibersihkan dari sisa tanah dan kotoran yang masih menempel pada bagian tanaman kailan. Pengukuran produksi tanaman ini dilakukan menggunakan timbangan analitik dengan satuan gram (g). Data pengamatan produksi tanaman merupakan rata-rata produksi tanaman (gram).

3.7 Analisa Data

Data hasil penelitian yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan aplikasi DSAASTAT ver. 1.101. Kemudian data yang diketahui menunjukkan

perbedaan secara signifikan, dilakukan uji perbandingan perlakuan menggunakan uji lanjut BNT dengan taraf kesalahan 5%.

