III. METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan September – Desember 2011 di Laboratorium Penyakit Tumbuhan dan Unit Pelaksanaan Teknis (UPT) Fakultas Pertanian Universitas Riau Pekanbaru.

3.2. Alat dan Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah benih padi varietas Sunting, varietas Coku Unggul, varietas IR42 , tanah sawah disekitar perakaran tanaman padi yang sehat diantara tanaman-tanaman yang sakit berasal dari desa Pulau Rambai kecamatan Kampar Timur, isolat *Bacillus* sp dari rizosfer tanaman Sawi (koleksi Balai Proteksi Tanaman Pangan dan Hortikultura Pekanbaru), isolat *Bacillus* sp dari rizosfer kelapa sawit, isolat *Bacillus* sp dari lahan gambut Giam Siak Kecil (koleksi Laboratorium Penyakit Tanaman Fakultar Peranian Universitas Riau), medium *Nutrient Agar* (NA), aquades steril, Na-Hipokhlorit 10%, air, alkohol 70 %, dan *polynet*.

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah mikroskop binokuler, cawan petri berdiameter 9 cm, *erlenmeyer* 250 ml, gelas ukur 500 ml, gelas piala, termometer, tabung reaksi, *micro pipet* 2 ml, *automatic mixer*, *orbital rotary shaker*, kaca objek, kaca penutup, inkubator, oven, *laminar air flow cabinet*, kompor gas, kulkas, *autoclave*, timbangan analitik, *vortex*, jarum ose, kertas saring, kertas *whatman*, kertas milimeter, kertas tisu, selotip, *aluminium foil*, pisau, lampu bunsen, korek api, label, alat tulis, kantong plastik, cangkul, ember hitam diameter 50 cm dan tinggi 75 cm, parang, dan Buku Panduan Identifikasi : "*Manual Identifikasi Bakteri Tanaman*" oleh Hamzah dkk (1993), "*Mikrobiologi*" oleh Pelczar (1986), dan "*Bakteri Patogenik Tumbuhan*" oleh Habazar dan Rivai (2003).

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/

3.3. Metode Penelitian

Penelitian dilakukan secara eksperimen dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) Faktorial yang terdiri dari 2 faktor:

Faktor pertama adalah isolat *Bacillus* sp (Bs) yang terdiri dari 5 taraf, yaitu:

Bs_0 = Tanpa pemberian *Bacillus* sp

Bs_1 = *Bacillus* sp asal rizosfer tanaman padi

Bs_2 = *Bacillus* sp dari tanaman kelapa sawit

Bs_3 = *Bacillus* sp dari tanaman sawi

Bs_4 = *Bacillus* sp dari tanah gambut Giam Siak Kecil

Faktor ke dua yaitu varietas padi (V) yang terdiri dari 3 taraf yaitu:

V1 = Varietas Sunting

V2 = Varietas Anak Daro

V2 = Varietas IR42

Dari kedua faktor tersebut di peroleh 15 kombinasi perlakuan yang masing perlakuan terdiri dari 4 ulangan, sehingga di peroleh 60 unit percobaan. Setiap unit ulangan terdiri dari 2 plot tanaman sehingga diperoleh jumlah keseluruhan adalah 120 bibit yang ditanam dalam ember.

Data yang diperoleh dianalisis secara statistik dengan menggunakan sidik ragam dan dilanjutkan dengan uji *Duncan's Multiple Range Test* (DNMRT) dengan beda pengaruh utama pada taraf 5%. Model linier yang digunakan adalah:

$$Yijk = \mu + \alpha i - \beta j - (\alpha\beta)ij - \varepsilon ijk$$

Dimana: Yijk = Hasil pengamatan pada perlakuan isolat *Bacillus* sp taraf ke-i dan varietas taraf ke-j pada ulangan ke-k

μ = Nilai tengah perlakuan

αi = Pengaruh isolat *Bacillus* sp pada taraf ke-i

βj = Pengaruh varietas pada taraf ke-j

$(\alpha\beta)ij$ = Interaksi isolat *Bacillus* sp dan varietas padi pada taraf ke-i dan ke-j

εijk = Standar error dari faktor isolat *Bacillus* sp taraf ke-i dan faktor varietas padi taraf ke-j pada ulangan ke-k

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/

3. 4. Pelaksanan Penelitian

3.4.1. Di Lapangan

3.4.1.1. Pengambilan Sampel Tanah untuk Isolasi *Bacillus* sp dari Rizosfer Tanaman Padi

Pengambilan sampel tanah dilakukan dari sekitar perakaran tanaman Padi yang sehat, diantara tanaman-tanaman Padi yang terserang *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* pada lahan persawahan desa Pulau Rambai kecamatan Kampar Timur. Pengambilan sampel tersebut menggunakan metode *purposive sampling,* dengan cara menentukan 5 titik pengambilan sampel yang diduga terdapat bakteri *Bacillus* sp. Sampel tanah diambil pada kedalaman 5-10 cm pada setiap titik sebanyak 1 kg dengan menggunakan sekop kecil dan dimasukkan ke dalam kantong plastik yang tertutup. Selanjutnya tanah sampel tersebut dibawa ke laboratorium untuk proses isolasi.

3.4.1.2. Pengambilan Sampel Daun yang Terserang Penyakit Hawar Daun Bakteri

Pengambilan sampel dilakukan dengan mengambil bagian daun yang bergejala hawar daun bakteri, yang diambil pada saat tanaman berumur 1-2 minggu setelah tanam. Daun yang diduga terserang hawar daun bakteri dimasukkan kedalam kantong plastik dan dibawa ke laboratorium penyakit tumbuhan untuk proses isolasi.

3.4.1.3. Persiapan Tempat Penelitian

Areal yang digunakan adalah lahan yang berlokasi di UPT Fakultas Pertanian. Kemudian dilakukan pengukuran luas tempat, yaitu seluas (5 x 5) m yang akan digunakan untuk meletakkan medium tanam dengan jarak antar ember (25 x 25) cm. Lahan yang sudah diukur dibersihkan dengan menggunakan cangkul dari vegetasi gulma dan sisa-sisa tanaman lainnya.

3.4.1.4. Persiapan Medium Tanam Setelah Persemaian

Medium tanam yang digunakan adalah tanah persawahan yang berasal dari desa Pulau Rambai kecamatan Kampar Timur. Teknik pengambilan tanah yaitu

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/

tanah diambil dengan kedalaman 0 – 40 cm, dengan kelembaban yang tetap terjaga kemudian diaduk rata. Kemudian tanah tersebut disterilisasikan dengan cara Tyndalisasi yaitu memanaskan tanah dengan menggunakan dandang pada suhu ±100 ^{0}C selama 1 jam dan dilakukan 3 hari berturut-turut dengan waktu istirahat 12 jam. Kemudian tanah tersebut dimasukkan ke dalam ember berdiameter 50 cm dan tinggi 75 cm sebanyak 3 kg.

3.4.1.5. Persemaian

Benih direndam selama 24 jam agar gabah dapat menyerap air yang cukup untuk proses perkecambahan, benih yang mengapung tidak digunakan untuk persemaian. Setelah direndam, benih padi disemaikan pada sebuah wadah (seedbed) yang berisi tanah lumpur yang diairi secara berangsur sampai ketinggian air mencapai 3-5 cm dari permukaan tanah. Tanah yang digunakan untuk persemaian sama dengan tanah yang akan digunakan pada penelitian ini. Persemaian dilakukan selama 20 hari dengan menjaga keadaan tanah agar selalu dalam keadaan lembab.

3.4.1.6. Penanaman dan Pemupukan

Penanaman dilakukan dengan menanam bibit sebanyak 5 bibit/pot. Setelah tumbuh dan berumur 3 minggu setelah tanam (MST) dengan meninggalkan 2 tanaman / pot yang dipelihara hingga panen.

Pupuk dasar diberikan dalam bentuk Urea, TSP, KCl, dan masing-masing dengan dosis 3,5 g, 1,5 g 1,5 g per ember. Pupuk TSP dan KCl diberikan pada saat tanam, sedangkan Urea diberikan 3 tahap (1/3 saat tanam, 1/3 umur 4 MST, dan 1/3 umur 7 MST). Pemupukan dilakukan secara sebar rata pada permukaan tanah.

3.4.1.7. Pemeliharaan

Pemeliharaan yang dilakukan meliputi:

a. Pengaturan tinggi genangan air: pada kondisi tergenang pemberian air dilakukan dengan membiarkan kondisi macak-macak selama 2 minggu setelah tanam, kemudian digenangi dengan tinggi air genangan adalah 5

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/

cm dari muka tanah hingga 2 minggu menjelang panen. Sedangkan untuk kondisi tidak tergenang air tetap dipertahankan 5 cm dari dasar pot.

b. Pemberantasan gulma: Penyiangan gulma dilakukan apabila tampak adanya gulma yang mengganggu dengan mencabut gulma tersebut dan membenamkannya kedalam tanah.
c. Pengendalian hama yang dilakukan secara mekanis dengan mengambil hama dan membuangnya dari bibit yang terserang.
d. Sementara itu, pengendalian penyakit tidak dilakukan karena diharapkan dapat dikendalikan oleh bakteri *Bacillus* sp yang diberikan.

3.4.1.8. Pemberian Suspensi *Bacillus* sp

Suspensi bakteri yang akan digunakan diberi tambahan berupa iner carier sebagai perekat, dengan tujuan agar suspensi bakteri dapat menempel pada daun tanaman dan tidak tercuci ketika terkena air. Pelaksanaannya dilakukan dengan cara menyemprotkan suspensi bakteri sebanyak 25 ml/bibit pada saat bibit berumur 1 minggu setelah tanam.

3.4.1.9. Inokulasi Bibit Padi dengan Bakteri *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae*

Satu minggu setelah penyemprotan suspensi bakteri *Bacillus* sp, dilakukan penyemprotan suspensi bakteri *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* sebanyak 25 ml/ ember (Sumardiyono *et al*, 2001).

3.4.2. Di Laboratorium

3.4.2.1. Isolasi *Bacillus* sp dari Rizosfer Tanaman Padi

Tanah yang telah didapat dari perakaran tanaman padi diambil masing-masing sebanyak 10 gram dan disuspensikan ke dalam 90 ml aquades steril. Hasil dari suspensi tanah ini disebut *starter*. Empat buah tabung reaksi diisi masing-masing dengan 9 ml aquades steril, masing-masing tabung reaksi ditambahkan dengan 1 ml dari hasil *starter* dengan menggunakan *micro pipet* 2 ml. Tabung reaksi kemudian dikocok sampai homogen dengan menggunakan *automatic mixer* selama 5 menit.

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/

Setiap suspensi bakteri *Bacillus* sp yang berada dalam tabung reaksi diencerkan mulai dari pengenceran 10^{-1} sampai tingkat pengenceran 10^{-6}, karena koloni bakteri pada tingkat pengenceran 10^{-6} tidak terlalu padat sehingga akan memudahkan dalam proses karakterisasi. Suspensi bakteri *Bacillus* sp dengan tingkat pengenceran 10^{-6} dimasukkan sebanyak 1 ml ke dalam cawan petri yang telah berisi medium NA (Bahan dan Cara Pembuatan Medium dapat dilihat pada Lampiran 2), kemudian diinkubasi selama 3 x 24 jam pada suhu kamar dalam inkubator.

Bacillus sp selanjutnya dimurnikan kembali pada medium NA dan diinkubasi selama 3 x 24 jam pada suhu kamar. Isolat *Bacillus* sp yang telah murni selanjutnya disimpan dalam tabung reaksi dalam bentuk agar miring yang berisi medium NA sebagai stock.

3.4.2.2. Uji HR *Bacillus* sp pada Bagian Rizosfer Padi

Penelitian ini merupakan penelitian yang dilakukan di laboratorim melalui pengenceran bakteri *Bacillus* sp yang diperoleh dari perakaran padi hingga pengenceran 10^{-6} dan di biakkan pada medium NA. Hasilnya ditampilkan dalam bentuk gambar.

3.4.2.3. Penyiapan Sumber Inokulum Bakteri *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae*

Isolat bakteri *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* (Xoo) yang digunakan diisolasi dari bagian daun tanaman padi yang terserang Xoo. Bagian daun yang terserang di potong dengan ukuran 1 x 1 cm (setengah bagian yang sakit, setengah bagian yang sehat), lalu dimurnikan dengan menggunakan NA hipoklorit 10%, dan ditumbuhkan dalam medium NA dalam cawan petri dengan menggunakan pinset yang telah steril dan diinkubasi pada suhu kamar.

3.4.2.3. Persiapan Suspensi *Bacillus* sp

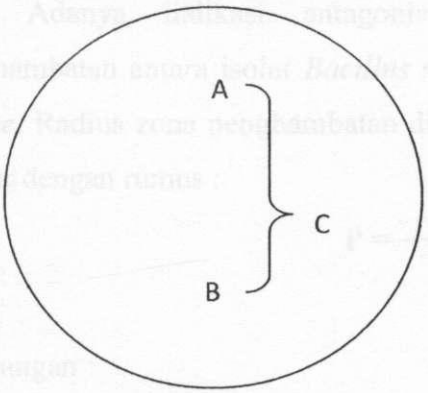
Isolat *Bacillus sp* yang telah disolasi dari tanah sawah, diperbanyak pada medium NA (nutrient agar) kemudian disuspensikan dalam aquades steril. Sedangkan, isolat *Bacillus* sp dari rizosfer tanaman Sawi (koleksi Balai Proteksi Tanaman Pangan dan Hortikultura Pekanbaru), isolat *Bacillus* sp dari rizosfer

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/

tanaman kelapa sawit dan isolat *Bacillus* sp dari Lahan Gambut Giam Siak Kecil (koleksi Laboratorium Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Riau) direisolasi pada medium NA dan selanjutnya disuspensikan dalam aquades steril. Dan

3.4.2.4. Uji Indikasi Antagonis Beberapa Isolat *Bacillus* sp terhadap *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* Secara *in Vitro*

Pengujian antagonisme *Bacillus* sp terhadap *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* dilakukan dengan menggunakan metode standar kultur ganda. Pada bagian tengah dari medium NA dalam cawan petri berdiameter 9 cm diinokulasi kultur jamur *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* berdiameter 5 mm. Kemudian isolat *Bacillus* sp digores pada sisi lain dari medium tersebut dengan jarak 3 cm dari kultur jamur (pada Gambar 1). Kultur ini diinkubasi pada suhu 28 ^{0}C selama 3-5 hari dan diamati perkembangannya.



Keterangan:

A: Isolat *Bacillus* Sp

B: Isolat *X. oryzae* pv *oryzae*

C: Jarak antara isolat 3 cm

3.5. Parameter Pengamatan

3.5.1. Di Laboratorium

3.5.1.1. Pengamatan Karakteristik Makroskopis dan Mikroskopis *Bacillus* sp

Pengamatan sifat morfologi koloni dilakukan pada medium NA secara visual terhadap isolat meliputi :

3.5.1.1.1. Warna Koloni

Pengamatan warna koloni pada medium NA dilakukan setelah 3 x 24 jam setelah inkubasi apakah berwarna putih krem atau kecoklatan.

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/

3.5.1.1.2. Bentuk Koloni

Pengamatan bentuk koloni pada medium NA dilakukan setelah 3 x 24 jam setelah inkubasi apakah berbentuk bulat, tepi rata, cembung mengkilat dan berlendir.

3.5.1.1.3. Populasi *Bacillus* sp (CFU/ml)

Perhitungan populasi dilakukan dengan cara Plate Count (Hitung Cawan), dengan syarat koloni yang telah ditentukan. Cara menghitung sel relatif/CFU's per ml adalah: (Pradhika, 2009)

CFU's/ml = Jumlah koloni X Faktor Pengenceran

3.5.2.4. Uji Indikasi Antagonis Beberapa Isolat *Bacillus* sp terhadap *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* Secara *in Vitro*

Adanya indikasi antagonis ditandai dengan terbentuknya zona penghambatan antara isolat *Bacillus* sp dengan bakteri *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae*. Radius zona penghambatan diukur dalam mm. Persentase penghambatan diukur dengan rumus :

$$P = \frac{r1 - r2}{r1} \times 100\%$$

Keterangan :

P = Presentase Penghambat (%)

r1= Jari-jari propagul bakteri *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* tanpa *Bacillus* sp

r2= Jari-jari propagul bakteri *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* dengan perlakuan isolat bakteri *Bacillus* sp

3.6. Di Lapangan

3.6.1. Munculnya Gejala Awal (hari)

Pengamatan munculnya gejala awal dilakukan pada saat pertama kalinya muncul gejala pada daun yaitu berupa : daun berwarna hijau pucat (klorosis) atau kekuningan yang dimulai dari bagian pinggir daun. Untuk memastikan gejala tersebut disebabkan oleh jamur *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* diisolasi patogen

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/

dengan metode penanaman jaringan pada media NA di dalam cawan petri, koloni yang tumbuh pada medium NA tersebut diamati dengan miskroskop.

3.6.2. Intensitas Penyakit (%)

Pengamatan dilakukan satu minggu sekali mulai dari minggu pertama setelah inokulasi *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* sampai akhir penelitian. Pengamatan ini dilakukan dengan cara melihat intensitas serangan penyakit. Rumus yang digunakan untuk menghitung intensitas serangan (IP) adalah sebagai berikut:

$$IP = \frac{\sum_{i=0}^{i}(nivi)}{ZxN} x100\%$$

Keterangan : IP = Intensitas penyakit

ni = Jumlah daun dengan skor ke-i

vi = Nilai skala penyakit dari *i* =0,1,2, sampai skort tertinggi

Z = Skor tertinggi

N = Jumlah daun yang diamati

Untuk mengamati intensitas serangan *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* di persawahan digunakan skor menurut (CIBA-GEIGY, 1975) dan Sulistyo (2005), sebagai berikut :

SKALA	*PERESENTASI*
0	0
1	> 25%
2	>26-50%
3	>51-75%
4	> 75%

3.6.3. Pertambahan Tinggi Tanaman (cm)

Pengukuran pertambahan tinggi bibit dimulai dari pangkal batang sampai daun tertinggi. Hasil pengukuran tersebut dikurangkan dengan tinggi kecambah awal. Untuk memudahkan pengukuran dibuat ajir 2 cm dari leher akar. Pengukuran dilakukan pada saat bibit berumur 2 minggu setelah tanam, dengan

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/

interval 1 minggu sekali. Pengukuran pertambahan tinggi bibit dilakukan sampai akhir penelitian.

3.6.4. Berat Gabah Kering per Ember (gram)

Perhitungan gabah kering giling dihitung dengan menimbang seluruh gabah yang dihasilkan tiap tanaman. Gabah terlebih dahulu dipisahkan dari tangkainya . Kemudian dijemur hingga kering, penimbangan dilakukan apabila biji padi ditekan sekamnya sudah bisa terlepas.

3.5.6 Berat Berangkasan Kering

Berat berangkasan kering didapat dengan cara mengambil bagian tanaman mulai dari pangkal batang sampai dengan pangkal malai dari tanaman padi, kemudian dikeringkan dengan menggunakan oven selama 2 x 24 jam dengan suhu 70°C.

3.6.6. Pengamatan Pendukung

3.6.6.1 Pengukuran Suhu Tanah dalam Ember

Pengukuran suhu tanah dalam ember dilakukan dengan menancapkan bagian ujung termometer kedalam tanah sedalam 10 cm. Termometer dibiarkan selama 10 menit kemudian diamati suhunya. Pengukuran suhu tanah dilakukan setiap hari, yaitu pagi pukul 07.00 WIB, siang pukul 12.00 WIB, dan sore pukul 17.00 WIB. Hasil pengukuran ditambahkan dan dicari suhu rata-rata hariannya (*Tr)* dengan rumus :

$$Tr = \frac{2xpagi + siang + sore}{4}$$

3.6.6.2. Pengukuran Suhu dalam Naungan (^{0}C)

Pengukuran suhu di dalam naungan dilakukan dengan cara menggantungkan termometer di bagian tengah naungan. Pengukuran suhu ruang naungan dilakukan setiap hari, yaitu pagi pukul 07.00 WIB, siang pukul 12.00 WIB, dan sore hari pukul 17.00 WIB. Kemudian diamati suhunya dan dicari suhu rata-rata hariannya dengan rumus :

$$Tr = \frac{2xpagi + siang + sore}{4}$$

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/

3.6.6.3. Pengukuran Kelembaban (%)

Pengukuran kelembaban di dalam naungan dilakukan setiap hari pada pagi pukul 07.00 WIB, siang pukul 12.00 WIB, dengan cara pengamatan suhu pada termometer bola kering dan termometer bola basa. Data termometer bola kering di kurangi dengan termometer bola basah dan dicari angka selisihnya. Selanjutnya selisih dilihat pada tabel kelembaban (RH) yang merupakan angka kelembaban.

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/