

III. BAHAN DAN METODE

3.1. Tempat dan Waktu

Penelitian dilaksanakan di rumah kaca Kebun Percobaan Fakultas Pertanian Universitas Riau Jalan Bina Widya km 12,5 Simpang Baru Panam Pekanbaru. Penelitian ini akan berlangsung selama empat bulan, yaitu mulai bulan Oktober 2008 - Januari 2009.

3.2. Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah benih sawi hijau, protease peptone, isolat *Pseudomonas berfluorescens* yang diperoleh dari koleksi Laboratorium Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Riau dan telah diuji, isolat *Erwinia carotovora* diperoleh dari pengisolasian tanaman yang bergejala, tanah yang telah disterilkan, , pupuk kandang, bahan insektisida (ekstrak daun sirsak), *aluminium foil*, alkohol 70%, medium NA, medium King's B, dan deterjen.

Alat yang digunakan adalah cangkul, *autoclave*, *test tube*, *automatic mixer*, *shaker*, cawan petri, *erlenmeyer*, batang pengaduk, jarum ose, lampu bunsen, timbangan analitik, pinset, *laminar air flow cabinet*, inkubator, mikroskop, gayung, *polybag*, *handsprayer*, meteran, tali, pisau, pisau *cutter*, parang, dan alat tulis.

3.3. Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan secara eksperimen dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 6 perlakuan dan 4 ulangan, sehingga terdapat 24 unit percobaan. Tiap unit percobaan ditanam 3 tanaman sehingga jumlah tanaman seluruhnya adalah 72 tanaman.

Perlakuan tersebut adalah konsentrasi inokulum *Pseudomonas berfluorescens*, yaitu :

Pf0 = tanpa pemberian *Pseudomonas berfluorescens*

Pf1 = pemberian suspensi *Pseudomonas berfluorescens* 10^{-4} cfu/ml/tanaman

Pf2 = pemberian suspensi *Pseudomonas berfluorescens* 10^{-5} cfu/ml/tanaman

Pf3 = pemberian suspensi *Pseudomonas* berfluorescens 10^{-6} cfu/ml/tanaman

Pf4 = pemberian suspensi *Pseudomonas* berfluorescens 10^{-7} cfu/ml/tanaman

Pf5 = pemberian suspensi *Pseudomonas* berfluorescens 10^{-8} cfu/ml/tanaman

Data yang diperoleh dari hasil penelitian dianalisis secara statistik dengan menggunakan *Analysis of Variance* (ANOVA). Pengujian lanjutan dilakukan dengan Metode Polinomial Orthogonal, apabila tidak signifikan pada anova, maka diuji lanjut dengan DNMRT pada taraf 5%.

3.4. Prosedur Penelitian

3.4.1. Persiapan Tempat dan Medium Tanam

Persiapan tempat penelitian diawali dengan membersihkan rumah kaca, kemudian *polybag* disusun dengan rapi dan lurus. Medium yang digunakan adalah tanah yang belum mendapat perlakuan, pada lapisan top soil sampai kedalaman 20 cm yang diambil dari kebun percobaan Fakultas Pertanian Universitas Riau. Tanah tersebut dicampur dengan pupuk kandang dengan perbandingan 2:1. Untuk menghindari kontaminasi oleh mikroorganisme lain, campuran tersebut disterilkan dengan cara tindalisasi. Tindalisasi yaitu mensterilkan tanah tersebut dengan uap selama 50 menit pada suhu 121° C, kemudian didiamkan selama satu hari lalu pada hari kedua dan ketiga tanah tersebut juga diperlakukan dengan kegiatan ini. Setelah tanah dingin, selanjutnya tanah dimasukkan ke dalam *polybag* yang berukuran 35 x 40 cm sebanyak 6 kg/*polybag*.

3.4.2. Pembibitan

Persemaian benih dilakukan dengan memakai *seed bed* yang mediumnya berupa tanah dan pasir halus yang juga telah disterilkan dengan cara tindalisasi. Benih sawi ditaburkan merata dengan jarak yang tidak terlalu rapat, kemudian disiram setiap hari dengan menggunakan *handsprayer* untuk menjaga kelembaban tanah. Setelah bibit berumur 1 minggu di dalam *seed bed*, bibit dipindahkan ke dalam *baby polybag* yang berukuran 10 x 12 cm dengan ukuran tanah sebanyak 2 kg hingga berumur 3 minggu, setelah bibit berumur 3 minggu, bibit siap untuk ditanam di *polybag*.

3.4.3. Inkubasi *Pseudomonas berfluorescens*

Untuk inokulasi *Pseudomonas berfluorescens* ke tanah, disiapkan dalam bentuk suspensi dengan cara mencampurkan biakan murni *Pseudomonas berfluorescens* ke dalam larutan aquades hingga membentuk konsentrasi yang diinginkan, kemudian sebanyak 50 ml dicampurkan ke dalam *polybag* satu minggu sebelum tanaman ditanam. Inkubasi *Pseudomonas berfluorescens* juga dilakukan dengan mencelupkan bibit sawi ke dalam suspensi bakteri *Pseudomonas berfluorescens* sebelum ditanam.

3.4.4. Penanaman

Penanaman dilakukan pada sore hari untuk mengurangi laju transpirasi pada bibit. Sebelum dilakukan penanaman terlebih dahulu bibit dipilih, bibit yang telah berumur 3 minggu dari persemaian dengan 4 helai daun, seragam, sehat, bebas serangan organisme pengganggu tanaman (OPT). Penanaman dilakukan dengan cara membuat lubang tanam seukuran *polybag* bibit, kemudian *polybag* bibit dirobek dengan menggunakan *cutter*. Bibit dimasukkan ke dalam lubang tanam yang telah disiapkan dengan hati-hati dan mengikutkan semua tanah yang ada pada *polybag* bibit, setelah bibit ditanam kemudian disiram.

3.4.5. Inokulasi *Erwinia carotovora*

Isolat *Erwinia carotovora* diperoleh dari isolasi tanaman yang bergejala. Inokulasi *Erwinia carotovora* dilakukan dengan memasukkan suspensi bakteri ini kedalam jaringan tanaman melalui ketiak daun dengan injeksi sebanyak 0,5 ml/tanaman. Bakteri ini diinokulasikan dengan konsentrasi 10^8 cfu/ml (Yaganza *et al.*, 2004). Bakteri ini diinokulasikan setelah tanaman berumur 1 minggu setelah tanam (MST) di *polybag*.

3.4.6. Pemeliharaan

3.4.6.1. Penyiraman

Penyiraman dapat dilakukan dengan menyiram tanaman dengan menggunakan gayung. Setiap *polybag* disiram dengan air sebanyak 400 ml. Kegiatan penyiraman dilakukan dua kali, yaitu pada pagi dan sore hari. Pada siang

hari, dilakukan penyemprotan disekitar tanaman dengan *handsprayer* untuk menjaga kelembaban udara.

3.4.6.2. Penyulaman

Kegiatan penyulaman bertujuan untuk mengganti tanaman yang mati atau yang pertumbuhannya jelek dan terserang OPT. Bibit yang digunakan untuk penyulaman memiliki umur yang sama dan berasal dari pembibitan yang sama. Kegiatan penyulaman ini dilakukan hingga tanaman berumur 2 minggu di dalam *polybag*. Setelah tanaman berumur lebih dari 2 minggu, tidak dilakukan penyulaman lagi.

3.4.6.3. Pengendalian Gulma

Pengendalian gulma di antara *polybag* dan di dalam *polybag* dilakukan secara mekanis, yaitu dengan mencabut langsung gulma yang tumbuh. Kegiatan pengendalian gulma dilakukan apabila ada gulma yang tumbuh disekitar *polybag* maupun di dalam *polybag*.

3.4.6.4. Pengendalian Hama

Pengendalian hama dilakukan secara mekanis, yaitu dengan mengambil satu persatu dan membunuh hama yang menyerang tanaman dan tindakan preventif dilakukan dengan menggunakan insektisida botani (ekstrak daun sirsak dengan konsentrasi 100 gr/l air) dengan frekuensi penyiraman satu kali dalam seminggu dan mulai diberikan pada saat tanaman berumur 1 minggu hingga tanaman berumur 1 minggu sebelum dipanen.

3.4.6.5. Panen

Tanaman sawi umumnya dipanen pada umur 40 HST. Tanaman sudah dapat dipanen apabila daun yang paling bawah sudah mulai menguning. Pemanenan dapat dilakukan dengan pencabutan seluruh tanaman beserta akarnya atau dengan cara memotong bagian pangkal batang yang berada diatas permukaan tanah.

3.5. Pengamatan

Peubah yang diukur meliputi:

3.5.1. Munculnya Gejala Pertama (hari)

Gejala pertama yang umum terdapat pada tanaman sawi adalah pada bagian yang terinfeksi mula-mula terjadi bercak kebasahan, jaringan yang sakit tampak basah, berwarna krem atau kecokelatan, dan tampak agak berbutir-butir halus. Jika cuaca lembab dan suhu udara relatif tinggi, serangan akan meningkat dan bercak-bercak menjadi berwarna krem atau kecokelatan. Pengamatan dilakukan setelah gejala pertama muncul pada setiap perlakuan.

3.5.2. Intensitas Serangan (%)

Penghitungan intensitas serangan dapat dilakukan dengan menggunakan rumus:

$$I = \frac{\sum (n_i x v_i)}{Z x N} \times 100\%$$

Keterangan:

- I** : Intensitas serangan (%)
- n_i** : banyaknya tanaman atau bagian tanaman seperti bagian akar, batang, daun yang diamati dari tiap kategori serangan
- v_i** : nilai skala dari tiap kategori serangan
- Z** : nilai skala dari tiap kategori serangan yang tertinggi
- N** : banyaknya tanaman atau bagian tanaman seperti bagian akar, batang dan daun yang diamati.

Intensitas serangan atau keparahan penyakit ditetapkan melalui skala menurut Bowen *et al.* (1995) sebagai berikut :

- 0 : tidak ada gejala bercak pada daun
- 1 : luas bercak 1/5 (1-20 %) dari daun
- 2 : luas bercak 2/5 (21-40 %) dari daun
- 3 : luas bercak 3/5 (41-60 %) dari daun
- 4 : luas bercak 4/5 (61-80 %) dari daun
- 5 : luas bercak > 80 % hingga seluruh daun

Pengamatan dilakukan mulai saat gejala pertama muncul dan berakhir sampai tanaman dipanen. Kegiatan pengamatan intensitas serangan penyakit ini dilakukan setiap minggu setelah munculnya gejala pertama.

Kriteria ketahanan tanaman menurut ketentuan Kiraly *et al.* (1974) adalah:

Intensitas serangan (%)	Kriteria
0	Imun
0<X<5	Tahan
5<X<10	Agak Tahan
10<X<25	Agak Rentan
25<X<50	Rentan
X>50	Sangat Rentan

Selain itu, untuk mengetahui intensitas serangan secara lebih detail, dilakukan penghitungan persentase penekanan. Persentase penekanan tidak dianalisis secara statistik, tapi hanya di tampilkan secara deskriptif.

$$Z = \frac{Y - X}{Y} \times 100\%$$

Keterangan: Z = Persentase penekanan

Y = Nilai tanpa perlakuan *Pseudomonas berfluorescens* (control)

X = Nilai masing-masing perlakuan

3.5.3. Kolonisasi Bakteri Pada Tanah di Sekitar Perakaran Tanaman Sawi

Pengamatan dilakukan pada saat tanaman berumur 2,3 dan 4 minggu. Caranya dengan mengambil sampel tanah sebanyak 10 gr untuk setiap perlakuan. Tanah sebanyak 10 gr dicampur dengan 9 ml aquades steril kemudian dihomogenkan dengan vortex selama 1 menit, disonikasi selama 1 menit, kemudian divortex ulang selama 1 menit. Selanjutnya dibuat seri pengenceran sampai 10^{-6} . Suspensi sebanyak 1 ml diratakan pada medium *King's B*, diinkubasi selama 1 minggu. Koloni bakteri yang tumbuh dihitung populasinya.

Koloni bakteri yang tumbuh dihitung dengan menggunakan rumus Klement *et al.* (1990), yaitu: $JB = A \times 1/B$

Keterangan:

JB : Jumlah bakteri/ml

A : Jumlah koloni bakteri

B : Faktor pengenceran

3.5.4. Berat Segar Tanaman Sawi Layak Konsumsi (gr)

Setelah tanaman dipanen, tanaman ditimbang untuk memperoleh berat segar dengan tidak mengikutsertakan bagian yang rusak (bagian yang terserang penyakit).

3.5.5. Pengamatan Tambahan

Pengamatan ini tidak dianalisis secara statistik, tapi akan ditampilkan secara deskriptif sebagai pendukung.

3.5.5.1. Suhu Udara Tempat Penelitian (°C)

Suhu udara di tempat penelitian dilakukan dengan meletakkan termometer di sekitar tempat penanaman. Suhu akan diamati setiap harinya pada pagi, siang dan sore hari.

3.5.5.2. Kelembaban Tempat Penelitian(%)

Kelembaban di tempat penelitian diukur dengan menggunakan *psikrometer bola basah-bola kering*. Alat ini terdiri dari dua termometer, yang disebut termometer bola basah dan termometer bola kering. Termometer bola kering adalah thermometer air raksa biasa, sedangkan thermometer bola basah adalah thermometer raksa yang ujung sensornya dibalut dengan kain kasa yang dijaga agar selalu lembab.

Suhu dan kelembaban rumah kaca dihitung dengan menggunakan rumus

$$\frac{2x \text{ pagi} + \text{siang} + \text{sore}}{4}$$