

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### 3.1 Rancangan Penelitian

Jenis percobaan pada penelitian ini adalah penelitian eksperimental, dengan menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAL), yang dilakukan dengan 9 perlakuan yaitu :

T<sub>0+</sub> = kontrol positif, kontrol yang diinokulasikan nematoda sista kuning (*G. rostochiensis*)

T<sub>0-</sub> = kontrol negative, kontrol yang tidak diinokulasikan nematoda sista kuning (*G. rostochiensis*)

T<sub>1</sub> = *B. mycooides* + *K. Ozaenae*

T<sub>2</sub> = *B. mycooides* + *Ps. Pseudomallei*

T<sub>3</sub> = *Ps. pseudomallei* + *Klebsiella ozaenae*

T<sub>4</sub> = *Klebsiella ozaenae*

T<sub>5</sub> = *B. Mycooides*

T<sub>6</sub> = *Ps. Pseudomallei*

T<sub>7</sub> = *B. mycooides* + *K. ozaenae* + *Ps. Pseudomallei*

Penentuan ulangan perlakuan menggunakan rumus Hanafiah (1993)

yaitu :

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

Keterangan : t = treatment / perlakuan : 5  
r = replikasi / ulangan

Dari rumus tersebut didapatkan hasil penentuan ulangan 4 atau lebih dari 4. Jadi ulangan dari masing- masing perlakuan kami lakukan 4 kali

### **3.2 Waktu Dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juni sampai dengan September 2010, di Laboratorium Mikrobiologi UIN MALIKI Malang dan greenhouse di Desa Sumberbrantas Batu Malang. Tanaman kentang ditanam dalam polibag dan dirawat di greenhouse.

### **3.3 Alat Dan Bahan**

#### **3.3.1 Alat- alat**

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah laminar flow cabinet, autoklaf, oven, cawan petri, jarum ose, bunsen, kompor gas, pengaduk kaca, pinset, incubator, aluminium foil, gelas ukur, tabung reaksi, pipet volume, erlenmeyer, botol media, incubator, timbangan analitik dan polibag, selang plastic, aerator, spektrofotometer.

#### **3.3.2 Bahan- Bahan**

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat bakteri endofit (*Bacillus mycoides*, *Pseudomonas pseudomallei*, dan *Klebsiella ozaenae*) yang diperoleh dari laboratorium mikrobiologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang; bibit atau umbi tanaman kentang (*Solanum tuberosum*) varietas *Granuolla holland* yang diperoleh dari desa Sumberbrantas Kab. Malang-Jawa Timur, tanah dan KMnO<sub>4</sub>, limbah tahu, molase, aquades steril

### **3.4 Prosedur Penelitian**

#### **3.4.1 Pembuatan Pupuk Hayati**

##### **3.4.1.1 Sterilisasi Alat Dan Bahan**

Sterilisasi alat dan bahan dilakukan dengan cara membungkus alat-alat dengan kertas HVS bekas yang baliknya masih kosong untuk cawan petri sedangkan untuk alat-alat yang lain dibungkus dengan plastic tahan panas, kemudian memasukkannya ke dalam autoklaf pada suhu 121° C dengan tekanan 15 psi (*per square inchi*) selama 15 menit.

##### **3.4.1.2 Peremajaan Isolat Bakteri endofit**

Penyiapan dan pemurnian bakteri endofit dilakukan dengan cara sebagai berikut:

1. Meremajakan isolat bakteri endofit yang tumbuh pada medium TSA masing-masing pada medium lempeng agar dan medium TSA miring.
2. Menginkubasi selama satu hari pada suhu 35° C.
3. Kemudian memfermentasi bakteri endofit yang telah diperoleh untuk perlakuan.

##### **3.4.1.3 Pembuatan Formula Pembawa (Carrier)**

Formula pembawa untuk mikroba endofit ini adalah larutan molase 1% dari 20 ml limbah tahu. Sebelum digunakan formula ini di sterilkan dengan dimasukkan ke dalam autoklaf pada suhu 121° C dengan tekanan 15 psi (*per square inchi*) selama 15 menit.

#### **3.4.1.4 Pemiakan Mikroba Endofit dan penentuan Fase Stasioner Pertumbuhan masing- masing bakteri endofit**

Pemiakan mikroba endofit dilakukan dengan cara hasil peremajaan isolate disuspensi ke dalam 5 ml air steril dengan kerapatan  $10^6$  cfu/ ml (Ratih, 2007). Suspensi ini kemudian dicampurkan ke dalam formula pembawa. Dengan fermentor sederhana formula yang telah diinokulasi mikroba endofit diinkubasikan selama  $\pm 7$  hari dan biakan sudah dapat digunakan (Purwantisari, 2009). Untuk menentukan fase stasioner pertumbuhan, setiap 24 jam sekali dilakukan penghitungan kepadatan bakteri dengan menggunakan spektrofotometer.

#### **3.4.2 Aplikasi pupuk hayati**

##### **3.4.2.1 Persiapan Media Tanam**

Media taman yang digunakan adalah tanah steril yang ditempatkan pada polybag 15 x 35 cm. Penyeterilan tanah dilakukan dengan menggunakan autoklaf pada suhu  $121^{\circ}$  C dengan tekanan 15 psi (*per square inchi*) selama 15 menit lalu dimasukkan ke dalam polybag sebanyak 2 kg.

##### **3.4.2.2 Pemilihan benih**

Bibit atau umbi tanaman kentang yang digunakan adalah bibit kentang granuola dengan berat antara 100 -120 gram dengan 3 -5 mata tunas, kemudian dicuci hingga bersih kemudian dibilas dengan air steril.

### 3.4.2.3 Inokulasi Pupuk Hayati

Masing-masing benih tanaman kentang direndam dalam perlakuan pupuk hayati pada konsentrasi  $10^8$  cfu/ml.

### 3.4.2.4 Penanaman Benih

1. Bibit umbi kentang ditanam dalam pot yang telah distrerilkan dengan perbandingan tanah dan pasir 2 : 1 sebanyak 2 kg/ polibag, dimasukkan dalam polibag berukuran 15 x 35 cm.
2. Bibit dimasukkan ke lubang tanam, ditimbun dengan tanah dan tekan tanah di sekitar umbi. Lubang tanam dibuat dengan kedalaman 8-10 cm.
3. Tiap polibag tanaman kentang terdiri dari 1 tanaman. Untuk mengganti tanaman yang kurang baik, maka dilakukan penyulaman. Penyulaman dapat dilakukan setelah tanaman berumur 10 hari. Bibit sulaman merupakan bibit cadangan yang telah disiapkan bersamaan dengan bibit produksi. Penyulaman dilakukan dengan cara mencabut tanaman yang mati/kurang baik tumbuhnya dan ganti dengan tanaman baru pada lubang yang sama. Tanaman kentang yang ditanam tidak diberi perlakuan pupuk.

### 3.4.2.5 Isolasi Nematoda Sista Kuning (*G. rostochiensis*)

Isolasi nematoda yaitu dengan mengambil sampel tanah yang di atasnya tumbuh tanaman kentang yang terjangkit Nematoda Sista Kuning (*G. rostochiensis*) tanah tersebut kemudian dibersihkan, dikeringanginkan, diambil 20 ml atau 20 g tanah dimasukkan dalam gelas piala, diaduk,

kemudian disaring (diameter mata saringan 1 mm) di atas gelas piala. Hasil saringan dalam gelas piala disaring pada saringan ke dua berikutnya (diameter mata saringan 500 mikron). Hasil saringan dalam saringan ke dua dituang pelan-pelan ke dalam kertas "tisu" yang dibentangkan pada saringan ke tiga (diameter mata saringan 1 mm) dan ditaruh di atas gelas piala. Partikel tanah di atas tisu diletakkan di atas piring. Sista pada tanah diambil / dihitung dengan bantuan alat pembesar (Ditlin, 2008).

#### **3.4.2.6 Inokulasi Nematode Sista Kuning (*G. rostochiensis*)**

Nematoda *G. rostochiensis* yang telah diisolasi dari akar tanaman kentang diinokulasikan 2 minggu setelah perlakuan penanaman, dengan cara:

1. Diinokulasikan di sekeliling tanaman pada kedalaman 1 cm.
2. Diinokulasikan sista nematoda *G. rostochiensis* sebanyak adalah 3 sista/polibag (Harni, 2006).

#### **3.4.2.7 Pemeliharaan Tanaman Kentang**

Pemeliharaan tanaman kentang dilakukan sebagai berikut:

1. Penyiangan dilakukan minimal dua kali selama masa penanaman. Penyiangan harus dilakukan pada fase kritis yaitu vegetatif awal dan pembentukan umbi.
2. Penyiraman air dilakukan 7 hari sekali secara rutin. Pengairan dilakukan dengan cara disiram sampai areal lembab.

### 2.5.6 Pengamatan

Pengamatan dilakukan setelah tanaman kentang berumur 45 hari (fase vegetatif) yaitu dengan menghitung Populasi sista *G. rostochiensis* yang menempel pada akar tanaman kentang, mengukur tinggi tanaman, berat basah tanaman, berat kering tanaman, panjang akar dan berat kering akar.

### 2.5.7 Analisis data

Pengaruh perlakuan dari uji aplikasi pupuk hayati berbahan baku bakteri endofit ini dianalisis dengan menggunakan One-way Anova yang apabila hasilnya terdapat perbedaan yang nyata, yaitu signifikansi kurang dari 0.05, maka dilakukan uji lanjut BNT 5%.