

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Percobaan

Penelitian ini merupakan penelitian eksplorasi dan eksperimen yaitu dengan cara mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri endofit dari akar tanaman kentang varietas *Granola Kembang* yang diambil dari Desa Sumberbrantas, Malang. Kemudian dilakukan pengujian isolat bakteri endofit terhadap nematoda *G. rostochiensis*. Rancangan percobaan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) Faktorial atau *Completely Random Design* pola faktorial dengan dua faktor dan 3 kali ulangan. Faktor pertama adalah spesies bakteri endofit yang terdiri dari 4 taraf perlakuan. Faktor kedua adalah waktu pengamatan yang terdiri dari 3 taraf perlakuan. Dengan demikian, dalam penelitian ini terdapat 12 kombinasi perlakuan, yaitu 4 x 3 satuan percobaan atau unit eksperimen untuk setiap satu rancangan percobaan.

Faktor I adalah spesies bakteri endofit (B), diantaranya adalah:

B0 = Tanpa pemberian bakteri

B2 = *Bacillus mycoides*

B1 = *Klebsiella ozaenae*

B3 = *Pseudomonas pseudomallei*

Faktor II adalah waktu pengamatan (W) adalah sebagai berikut:

W1 = 2 hari

W2 = 4 hari

W3 = 6 hari

Penentuan ulangan perlakuan menggunakan rumus Hanafiah (1993)

yaitu:

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

Keterangan : t = treatment / perlakuan = 12

r = replikasi / ulangan

Dengan demikian berdasarkan rumus tersebut, perlakuan dalam penelitian ini masing-masing dilakukan dalam 3 kali ulangan, sehingga secara keseluruhan menghasilkan 66 kombinasi perlakuan, yaitu 3 x 12 unit percobaan.

Tabel 3.1 Kombinasi Perlakuan Antara Spesies Bakteri Endofit dan Waktu Pengamatan

| Spesies Bakteri | Waktu Pengamatan | | |
|-----------------|------------------|------|------|
| | W1 | W2 | W3 |
| B0 | B0W1 | B0W2 | B0W3 |
| B1 | B1W1 | B1W2 | B1W3 |
| B2 | B2W1 | B2W2 | B2W3 |
| B3 | B3W1 | B3W2 | B3W3 |

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juli – September 2009. Bertempat di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim (MALIKI) Malang, Jalan Gajayana 50 Malang.

3.3 Variabel Penelitian

3.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat bakteri endofit yang ditumbuhkan pada medium TSA (*Tryptic Soy Agar*) dengan 3 kali ulangan dan waktu pengamatan.

3.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini merupakan variabel yang dapat diukur yaitu jumlah larva nematoda *G. rostochiensis* yang mati.

3.4 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: cawan petri berdiameter 9 cm , erlenmeyer, beaker glass, blender, pisau, silet, mikropipet, autoklaf, laminar, jarum inokulasi, jarum preparat, obyek glass, mikrokom, mikroskop binokuler, saringan, kertas label, kertas tissue dan plastik wrap.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sista dari nematoda *G. rostochiensis* hasil dari identifikasi yang diambil dari akar tanaman kentang varietas Granola kembang yang terinfeksi oleh nematoda, biakan bakteri endofit yang diisolasi dari akar tanaman kentang varietas Granola Kembang, TSA (*Tryptic Soy Agar*), aquades steril, alkohol 70%, alkohol 96%, HgCl₂ 0,2 %, karbol kristal ungu, lugol, safranin.

3.5 Prosedur Kerja

3.5.1 Isolasi Bakteri Endofit

3.5.1.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

Terlebih dahulu menyeterilkan alat dan bahan yang dipergunakan dalam kerja penelitian ini, untuk alat-alat gelas dan cawan petri setelah dicuci dikeringkan, lalu disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 15 lbs selama 20 menit.

3.5.1.2 Penyiapan Media TSA (*Tryptic Soy Agar*)

Menimbang TSA sebanyak 3 g. Kemudian menambahkan sebanyak 100 ml akuades pada media TSA. Setelah itu memanaskan TSA yang telah ditambahkan dengan akuades hingga mendidih. Kemudian memasukkan ke dalam tabung reaksi (10 buah), masing-masing 10 ml dan menutupnya dengan kapas.

3.5.1.3 Penyiapan Isolasi Bakteri Endofit

Untuk mengisolasi bakteri endofit dari jaringan suatu tanaman dilakukan menurut cara Susilowati (2003) adalah sebagai berikut: Mengisolasi bakteri endofit dari bagian akar tanaman kentang. Kemudian mencuci akar tanaman kentang dengan air mengalir dan membilasnya dengan akuades steril. Setelah itu memotong-motong akar tanaman kentang dengan ukuran 2-3 cm dan mengeringkannya dengan kertas tissue. Kemudian melakukan sterilisasi permukaan dengan cara sebanyak 10 g akar tanaman kentang dishaker selama 30 menit dalam 500 ml Erlenmeyer yang berisi 250 ml akuades steril. Kemudian memindahkan akar tanaman kentang tersebut ke dalam beaker steril. Setelah itu mencuci akar tanaman kentang tersebut 2 kali dengan akuades steril dan mensterilisasi permukaannya dengan HgCl_2 0,2 % selama 30 detik dan dilanjutkan dengan mencuci 6 kali dengan akuades steril, memotong kecil-kecil dan memblender hingga homogen. Kemudian membuat pengenceran serial hingga 10^{-3} .

3.5.1.4 Penyiapan Pemurnian Bakteri Endofit

Penyiapan pemurnian bakteri endofit dilakukan dengan cara sebagai berikut: Memurnikan bakteri endofit yang tumbuh pada medium TSA masing-masing pada medium lempeng agar dan medium TSA miring. Kemudian menginkubasi selama 24-48 jam pada suhu 15°C. Setelah itu melakukan pengamatan terhadap bentuk dan warna koloni pada medium TSA yang dilanjutkan dengan mensubkultur setiap koloni yang berbeda bentuk maupun warnanya pada medium lempeng TSA dan medium TSA miring sampai diperoleh koloni murni.

3.5.1.5 Identifikasi Isolat Bakteri Endofit

Untuk mengidentifikasi isolat bakteri endofit dilakukan dengan cara sebagai berikut: Menumbuhkan biakan murni bakteri endofit pada medium TSA. Kemudian menginkubasi pada suhu 15°C selama 24 jam. Setelah itu melakukan pengamatan koloni secara makroskopis dari morfologi dan pertumbuhan. Kemudian dilanjutkan dengan membuat preparat dari koloni yang tumbuh, kemudian diwarnai dengan pewarnaan Gram (karbol kristal ungu 5 menit, lugol 45-60 menit, alkohol 96% 30 detik, etanol 95% selama 15 detik, safranin 1-2 menit). Bakteri yang diwarnai dengan pewarnaan ini dibedakan dalam dua kelompok yaitu: Golongan bakteri Gram positif, yaitu golongan bakteri yang tetap berwarna violet tua walaupun sudah dicuci dengan alkohol dan golongan bakteri yang tidak tetap berwarna violet berubah warnanya menjadi merah dinamakan bakteri Gram negatif. Bakteri Gram negatif yang kehilangan warna violet tua karena tercuci oleh alkohol akan kelihatan kabur. Inilah yang menjadi sebab

mengapa digunakan cat safranin yang menyebabkan preparat menjadi merah muda (pink). Cat seperti safranin ini yang digunakan untuk memberi warna kontras disebut counterstain (cat lawan). Bakteri golongan Gram positif tetap berwarna violet tua (purple), karena tidak dipengaruhi oleh safranin (Tarigan, 1988: 34-35).

Prosedur pewarnaan Gram menurut Tarigan (1988: 37-38), adalah sebagai berikut: Menyentuhkan ose bamata pada nyala api lampu Bunsen sampai pijar sebanyak 3 atau 4 kali. Mengambil suspensi bakteri sebanyak 1 ose dan digoreskan pada kaca obyek seluas kira-kira 1 cm². Kemudian menunggu sampai kering dan mengfiksasi. Setelah itu meletakkan kaca obyek di atas staining rack dan ditetesi dengan cat kristal violet, dibiarkan selama 1 menit. Kemudian mencuci kristal violet dengan air mengalir dan setelah agak kering menetesikan dengan Ligol iodine solution. Setelah 1 menit, dilanjutkan dengan mencuci lugol iodine solution dengan air mengalir dan menggunakan kertas isap untuk mengambil air yang berlebihan tetapi harus dijaga jangan sampai terlalu kering. Kemudian memberi sedikit demi sedikit etanol 95% untuk menghilangkan warna sehingga kaca obyek kelihatan tidak berwarna. Setelah kira-kira 15 detik mencuci kaca obyek dengan air keran kemudian mengeringkan kaca obyek. Kemudian mengecat dengan safranin (sebagai counterstain). Setelah itu mencuci preparat dengan air keran dan mengeringkannya yang kemudian dilanjutkan dengan memeriksa dengan menggunakan mikroskop dengan menggunakan minyak imersi. Jika sel-sel bakteri berwarna merah, maka bakteri tersebut adalah Gram

negatif, sedangkan bakteri yang berwarna "blu purple" termasuk golongan bakteri Gram positif.

Setelah melakukan pewarnaan Gram maka dilanjutkan dengan melakukan uji konvensional dengan reaksi gula-gula. Kemudian menginkubasi pada suhu 15°C selama 16-24 jam. Kemudian didapatkan keterangan hasil dalam *microbact identification kits*. Setelah itu melakukan pengklasifikasian spesies dari hasil identifikasi *microbact*.

3.5.1.6 Penyiapan Suspensi Bakteri Endofit

Penyiapan suspensi bakteri endofit dilakukan menurut cara Nur (2005: 4) adalah sebagai berikut: Menumbuhkan bakteri endofit di dalam medium TSA. Kemudian menginkubasi selama 24-48 jam pada suhu 35°C. Isolat bakteri yang berumur 48 jam kemudian disuspensikan dengan 10 ml akuades steril. Selanjutnya dilakukan penggojokan dengan vortex mixer selama 1-2 menit. Setelah itu mengambil 1 ml suspensi dari bakteri tersebut dan mempergunakannya dalam pengujian terhadap rata-rata kematian larva nematoda *G. rostochiensis*.

3.5.2 Penyiapan Ekstraksi Sista Nematoda *G. rostochiensis*

Penyiapan ekstraksi sista nematoda *G. rostochiensis* dilakukan menurut cara Departemen Perlindungan Tanaman (2008) adalah sebagai berikut: Mengumpulkan akar tanaman kentang yang terinfeksi oleh nematoda. Menurut Hadisoeganda (2006: 9-11) akar tanaman yang terinfeksi oleh nematoda memiliki ciri-ciri: (1) Mengalami pengurangan terhadap permukaan daun yang berfotosintesis, (2) Percabangan perakaran yang tidak normal, terlihat lebih

gemuk dan membengkak, (3) Umbi yang terbentuk berukuran lebih kecil dan jumlahnya sedikit.

Kemudian melakukan ekstraksi sista dengan cara ekstraksi sederhana, yaitu mengumpulkan sampel akar dan tanah di dalam beaker glass yang kemudian ditambahkan dengan air dalam kondisi air mengalir. Setelah itu menampung sista dengan menggunakan saringan yang dilapisi dengan tissue. Setelah itu mengamati di bawah mikroskop binokuler untuk melakukan identifikasi sista. Sista dengan ciri-ciri berbentuk bulat, sista muda dengan warna khusus yaitu kuning emas dan setelah tua warna sista berubah menjadi kuning tua, coklat muda dan coklat gelap termasuk ke dalam spesies *G. rostochiensis* (Hadisoeganda, 2006: 223).

Kemudian mengumpulkan sista-sista yang menempel pada akar dengan menggunakan jarum preparat dan menggunakannya sebagai inokulum. Setelah itu dilanjutkan dengan memasukkan media TSA sebanyak 10 ml pada cawan petri dan menambahkan 1 ml suspensi bakteri endofit pada cawan petri yang sudah ditambahkan media TSA. Kemudian memberi massa sista nematoda *G. rostochiensis* pada cawan petri sebanyak 3 buah sista pada masing-masing cawan petri yang sudah ditambahkan dengan media TSA. Setelah itu melakukan pengamatan terhadap larva dalam sista nematoda *G. rostochiensis* yang sudah ditambahkan suspensi bakteri endofit.

3.5.3 Pengamatan

Pengamatan dilakukan melalui tahap-tahap berikut: Memindahkan sista dari cawan petri ke obyek glass lalu menambahkan satu tetes akuades diatas sista. Kemudian mencuci sista hingga bersih. Setelah itu memindahkan sista pada obyek

glass baru lalu menambahkan satu tetes akuades. Kemudian memotong bagian leher dari sista. Setelah itu melakukan pengamatan jumlah larva nematoda *G. rostochiensis* yang mati.

Pengamatan dilakukan 2 hari, 4 hari dan 6 hari setelah waktu perlakuan.

3.6 Analisis Data

Untuk mengetahui pengaruh perlakuan dilakukan analisis variansi (ANAVA) ganda. Apabila perlakuan berpengaruh nyata maka dilanjutkan dengan *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) dengan taraf 5 %. Apabila data yang didapatkan tidak homogen, maka dilanjutkan dengan mentransformasikan data dengan menggunakan transformasi akar kuadrat untuk menghomogenkan data. Kemudian dilanjutkan dengan *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) dengan taraf 5 %. Jika F hitung hasil analisis data transformasi lebih besar dari pada F hitung hasil analisis data awal (sebelum ditransformasi), maka hal ini menunjukkan bahwa transformasi data berhasil meningkatkan ketelitian dalam mendeteksi pengaruh perlakuan terhadap hasil percobaan.