

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Metode Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen. Penelitian eksperimen ini dilakukan dengan cara menguji filtrat isolat bakteri endofit dari tanaman kentang terhadap penetasan telur NSK (*G. rostochiensis* (Wollenweber)). Untuk mengetahui penetasan telur NSK (*G. rostochiensis* (Wollenweber)) dilakukan pengamatan dibawah mikroskop. Media yang digunakan untuk pertumbuhan bakteri dalam menghasilkan filtrat adalah media TSB (*Tryptic Soy Broth*).

Penelitian ini terdiri dari dua faktor, faktor pertama adalah jenis filtrat dari isolat bakteri endofit yang terdiri dari 7 taraf perlakuan. Faktor kedua waktu pengamatan yang terdiri dari 6 taraf perlakuan. Dengan demikian dalam penelitian ini terdapat 126 kombinasi perlakuan, yaitu 7×6 satuan percobaan atau unit eksperimen untuk setiap satu rancangan percobaan.

Faktor I adalah jenis isolat bakteri endofit, diantaranya:

AA (I1) = isolat A dari akar tanaman kentang

AH (I2) = isolat H dari akar tanaman kentang

BA (I3) = isolat A dari batang tanaman kentang

BE (I4) = isolat E dari batang tanaman kentang

DA (I5) = isolat A dari daun tanaman kentang

DH (I6) = isolat H dari daun tanaman kentang

K (I7) = kontrol air kran

Faktor II adalah lama perendaman filtrat, diantaranya:

W1 = 3 hari

W4 = 12 hari

W2 = 6 hari

W5 = 15 hari

W3 = 9 hari

W6 = 18 hari

Penentuan ulangan perlakuan menggunakan rumus Hanafiah (1993), yaitu:

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

Keterangan: t = treatment/perlakuan = 126

r = replikasi/ulangan

Dengan demikian berdasarkan rumus tersebut, perlakuan dalam penelitian ini masing-masing dilakukan dalam 3 kali ulangan, sehingga secara keseluruhan menghasilkan 378 kombinasi perlakuan, yaitu 3 x 126 unit percobaan.

Table 3.1 Kombinasi Perlakuan Antara Filtrat Bakteri dan Lama perendaman

Perlakuan	Lama Perendaman (Hari ke-)					
Filtrat	W1	W2	W3	W4	W5	W6
I1	I1W1	I1W2	I1W3	I1W4	I1W5	I1W6
	I1W1	I1W2	I1W3	I1W4	I1W5	I1W6
	I1W1	I1W2	I1W3	I1W4	I1W5	I1W6
I2	I2W1	I2W2	I2W3	I2W4	I2W5	I2W6
	I2W1	I2W2	I2W3	I2W4	I2W5	I2W6
	I2W1	I2W2	I2W3	I2W4	I2W5	I2W6
I3	I3W1	I3W2	I3W3	I3W4	I3W5	I3W6
	I3W1	I3W2	I3W3	I3W4	I3W5	I3W6
	I3W1	I3W2	I3W3	I3W4	I3W5	I3W6
I4	I4W1	I4W2	I4W3	I4W4	I4W5	I4W6
	I4W1	I4W2	I4W3	I4W4	I4W5	I4W6
	I4W1	I4W2	I4W3	I4W4	I4W5	I4W6
I5	I5W1	I5W2	I5W3	I5W4	I5W5	I5W6
	I5W1	I5W2	I5W3	I5W4	I5W5	I5W6
	I5W1	I5W2	I5W3	I5W4	I5W5	I5W6
I6	I6W1	I6W2	I6W3	I6W4	I6W5	I6W6
	I6W1	I6W2	I6W3	I6W4	I6W5	I6W6
	I6W1	I6W2	I6W3	I6W4	I6W5	I6W6
I7	I7W1	I7W2	I7W3	I7W4	I7W5	I7W6
	I7W1	I7W2	I7W3	I7W4	I7W5	I7W6
	I7W1	I7W2	I7W3	I7W4	I7W5	I7W6

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari 2012 sampai dengan Maret 2013 bertempat di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Optik Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.3 Variabel Penelitian

3.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas yang digunakan dalam penelitian ini adalah filtrat bakteri endofit, volume filtrat dan lama perendaman.

3.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat yang digunakan dalam penelitian ini adalah jumlah telur NSK *G. rostochiensis* (Wollenweber) yang menetas.

3.4 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah hot plate, shaker inkubator, spektrofotometer, cuvet, refrigerator, autoklaf, oven, jarum ose, busen, tabung reaksi, rak tabung reaksi, pengaduk kaca, gelas ukur, gelas beker, erlenmeyer, pipet tetes, mikropipet sentrifuge, LAF, mikroskop inverted, 12 Well Cell Culture Cluster, spuit 10 ml, minisart 0,2 μ m, botol flakon 20 ml, pinset, jarum pentul, corong, timbangan analitik, jarum preparat, aluminium foil, plastik wrap, kapas dan tissu.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah media TSA (*Tryptic Soy Agar*), TSB (*Tryptic Soy Broth*), sista NSK (*G. rostochiensis*

(Wollenweber)) dan isolat bakteri endofit isolat -AA, -AH, -BA, -BE, -DA, -DH dan air kran (kontrol), aquades, spirtus, streptomycin sulfat 600 ppm, kristal violet, Lughol's iodine, Safranin Counterstain.

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

Sterilisasi alat dan bahan dengan cara membungkusnya dengan plastik tahan panas, kemudian memasukkannya ke dalam autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 15 psi (*per square inchi*) selama 15 menit.

3.5.2 Penyiapan Media TSA (*Tryptic Soy Agar*) dan TSB (*Tryptic Soy Broth*)

Menyiapkan TSA sebanyak 4 g dan aquadest sebanyak 100 ml. Setelah itu, mendidihkan aquadest dan memasukkan TSA yang telah ditimbang. Setelah larutan homogen dan mendidih, larutan dimasukkan ke dalam 6 tabung reaksi, masing-masing 5 ml dan menutupnya dengan kapas. Kemudian di sterilisasi didalam autoklaf 15 menit. Selesai sterilisasi media segera dimiringkan.

Menyiapkan TSB sebanyak 3 g dan aquadest sebanyak 100 ml. kemudian aquadest dididihkan dan TSA yang telah ditimbang dimasukkan kedalamnya. Setelah larutan homogen dan mendidih, larutan dimasukkan ke dalam 6 tabung reaksi, masing-masing 5 ml dan menutupnya dengan kapas. Kemudian disterilisasi didalam autoklaf 15 menit.

3.5.3 Pembuatan Filtrat Bakteri Endofit

Produksi filtrat bakteri endofit dilakukan dengan cara menumbuhkannya pada medium TSA selama 48 jam pada suhu ruang, kemudian diambil satu sengkeliit menggunakan jarum ose dan dipindahkan ke dalam 100 ml medium TSB, lalu diinkubasi pada suhu 25°C sambil digoyang selama 72 jam dengan

kecepatan 150 rpm. Masing-masing medium disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm dengan suhu 4°C selama 15 menit, lalu disaring kedalam botol steril menggunakan filter Minisart 0,2 µm.

3.5.4 Isolasi Telur NSK (*G. rostochiensis* (Wollenweber))

Sampel tanah dibersihkan, dikeringanginkan, 10 gram tanah dimasukkan dalam gelas beker, diaduk, ditunggu hingga sista mengapung, kemudian disaring. Sista yang tersaring kemudian diambil 5 sista yang berukuran 1 mm dan berwarna coklat keemasan. Untuk mensterilkan, sista tersebut kemudian dicuci menggunakan aquades steril sebanyak lima kali, dicuci dengan etil alkohol 70% selama 5 menit, kemudian dicuci sekali lagi menggunakan aquadest steril satu kali (Pridannikov dkk, 2007).

Kemudian sista direndam didalam aquades pada botol flakon. Disimpan dalam suhu ruang selama satu minggu pada kondisi gelap (Aisyah dkk, 2007). Sista dipecah kemudian diambil telur NSK *G. rostochiensis* (Wollenweber) menggunakan jarum pentul sebanyak 50 telur NSK *G. rostochiensis* (Wollenweber). Lalu dilakukan perlakuan terhadap telur NSK *G. rostochiensis* (Wollenweber) secara *in vitro*.

3.5.5 Pemberian Filtrat Bakteri Endofit

Pemberian filtrat bakteri endofit dengan menggunakan metode Harni dkk. (2010). Telur nematoda yang telah diisolasi kemudian disterilisasi dengan cara direndam di dalam larutan berisi 600 ppm streptomycin sulfat selama 1 jam, kemudian dicuci dengan cara direndam dengan aquadest selama 30 detik. Selanjutnya, 50 telur NSK (*G. rostochiensis* (Wollenweber)) dimasukkan ke

dalam 1 ml filtrat dari bakteri endofit untuk diuji efektifitasnya terhadap telur NSK (*G. rostochiensis* (Wollenweber)). Kemudian diinkubasi pada ruang AC suhu 19°C. Percobaan ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) faktorial dengan 3 kali ulangan, masing-masing perlakuan dilakukan pengamatan menggunakan mikroskop Nikon Eclipse Ti pada hari ke -3, -6, -9, -12, -15 dan -18. Perlakuan yang digunakan adalah isolat -AA, -AH, -BA, -BE, -DA, -DH dan kontrol (air kran).

3.6 Analisis Data

Data hasil penelitian dianalisis menggunakan program SPSS 17.0. Tahapan pertama adalah uji normalitas. Bila normal, maka diuji lanjut menggunakan RAL faktorial. Bila, data tidak normal dilanjutkan menggunakan uji Kruskal Wallis dan Analisis Probit. Bila uji Kruskal Wallis dan Analisis Probit tidak normal, maka diuji lanjut menggunakan analisis deskriptif. Untuk mengetahui interaksi atau hubungan yang terjadi antar variabel yang diuji menggunakan analisis Regresi dari program SPSS 17.0.