

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juli sampai Oktober 2011, yang bertempat di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah Jarum Ose, Tube-stirrer, Erlenmeyer, Sentrifuge, Tabung reaksi, Rak tabung raksi, LAF, Bunsen, Mikroskop, Kapas, autoklaf, oven, cawan petri, bunsen, kompor gas, pengaduk kaca, pinset, incubator, refrigerator, aluminium foil, plastic wrap, gelas ukur, pipet, botol media, timbangan analitik, kaca benda cekung, jarum preparat.

3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah media TSA(*Tryptic Soy Agar*), TSB (*Tryptic Soy Broth*) aquades steril, sista *G. rostriformis*, dan isolat bakteri endofit AA, AH, BA, BE, DA, DH.

3.3 Kegiatan Penelitian

3.3.1 Pembuatan Filtrat Bakteri Endofit

Koloni bakteri endofit yang telah diinkubasi pada medium TSA selama 24 jam, kemudian diambil satu sengkeliit menggunakan jarum ose dan dipindahkan ke dalam 5 ml medium TSB. Suspensi koloni bakteri dipindahkan ke dalam 9 ml medium TSB sebanyak 1 ml pada 50 ml tabung Erlenmeyer, diinkubasi pada suhu 30°C menggunakan *shaker incubator* 130 rpm selama 48 jam. Setelah proses fermentasi selesai, masing – masing medium disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 20 menit. Filtrat bakteri endofit diambil dan dipergunakan dalam pengujian aktivitas penghambatan terhadap mortalitas nematoda sista kuning (*Globodera rostochiensis*) pada tanaman kentang. Filtrat bakteri disimpan pada suhu 4°C bila tidak langsung diuji toksisitasnya.

3.3.2 Isolasi Sista dari Tanah

Tanah yang sudah terkontaminasi oleh sista *G. rostochiensis* diambil. Ditimbang 10 gram dimasukkan beaker glass, diaduk, didiamkan hingga sista terpisah dari endapan tanah. Sista yang terapung dipermukaan air diambil dengan cara dituangkan secara hati – hati pada corong yang diberi kertas saring diatasnya. Kertas saring diambil dan diletakkan diatas permukaan bidang datar ataupun piring, kemudian sista yang menempel pada kertas saring diambil dan siap digunakan.

3.3.3 Uji Pengaruh Filtrat Bakteri Endofit terhadap Mortalitas Larva II *G.*

rostochiensis

Lima puluh ekor larva II *G. rostochiensis* dimasukkan pada kaca benda cekung dan direndam dengan 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ filtrat bakteri endofit. Pengamatan dilakukan terhadap mortalitas nematoda setelah 24 jam. Percobaan ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) 7 perlakuan dengan 3 ulangan. Perlakuannya adalah isolat bakteri endofit AA, AH, BA, BE, DA, DH, kontrol TSB. Kontrol TSB dilakukan untuk membuktikan bahwa nematoda mati karena filtrat bakteri bukan oleh bahan kimia yang ada pada media. Untuk memastikan apakah nematoda benar-benar mati atau hanya istirahat, nematoda yang telah diperlakukan dipancing dan dimasukkan ke dalam air steril. Apabila nematoda bergerak maka nematoda tersebut masih hidup, sebaliknya apabila tidak bergerak berarti nematoda tersebut mati.

3.3.4 Uji Kosentrasi Filtrat Bakteri Endofit Tertinggi terhadap Mortalitas *G.*

rostochiensis

Lima puluh ekor larva II *G. rostochiensis* diletakkan pada kaca benda cekung dan direndam dengan kosentrasi 150 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 200 $\mu\text{L}/\text{mL}$, dan 250 $\mu\text{L}/\text{mL}$ filtrat bakteri endofit isolat tertinggi hasil uji pengaruh filtrat bakteri endofit terhadap mortalitas larva II yang telah dilakukan. Pengamatan dilakukan terhadap mortalitas nematoda setelah 48 jam. Kontrol TSB dilakukan untuk membuktikan bahwa nematoda mati karena filtrat bakteri bukan oleh bahan kimia yang ada pada media. Untuk memastikan apakah nematoda benar-benar mati atau hanya istirahat, nematoda yang telah diperlakukan dipancing dan dimasukkan ke dalam air steril.

Apabila nematoda bergerak maka nematoda tersebut masih hidup, sebaliknya apabila tidak bergerak berarti nematoda tersebut mati.

3.3.5 Analisis Data

Untuk mengetahui pengaruh perlakuan dilakukan analisis variansi (ANOVA) tunggal. 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.

