

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental. Rancangan yang digunakan dalam penelitian ini adalah rancangan acak lengkap (RAL) tunggal, dengan 7 perlakuan dan 3 kali ulangan.

3.2. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember 2011 sampai dengan April 2012, di Laboratorium Mikrobiologi dan Greenhouse Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang dan Laboratorium Nematologi Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan (HPT) Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya Malang.

3.3. Alat dan Bahan

3.3.1. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah laminar air flow (LAF), autoklaf, oven, cawan petri, jarum ose, bunsen, kompor gas, pengaduk kaca, pinset, incubator, aluminium voil, gelas ukur, tabung reaksi, beaker glass, pipet volume, erlenmeyer, penggaris, botol media, timbangan analitik dan polibag.

3.3.2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah media TSA (*Tryptic Soy Agar*), TSB (*Tryptic Soy Broth*), aquades steril, bibit atau umbi tanaman kentang (*Solanum tuberosum L*), tanah, sista dan nematoda *Globodera*

rostochiensis, isolat bakteri endofit (Isolat AA, AH, BA, BE, DA, DH) tanaman kentang yang diperoleh dari lahan pertanian kentang Desa Sumber Brantas Batu Malang.

3.4. Variabel Penelitian

Variabel bebas : Kultur filtrat bakteri endofit dan nematoda *Globodera rostochiensis*.

Variabel terikat : Populasi sista *Globodera rostochiensis* di dalam tanah, tinggi tanaman dan berat kering akar tanaman kentang.

3.5. Prosedur Penelitian

3.5.1. Sterilisasi Alat dan Bahan

Sterilisasi alat dan bahan dengan cara membungkus alat-alat dengan aluminium foil, kemudian memasukkannya ke dalam autoklaf pada suhu 121° C dengan tekanan 15 psi (*per square inchi*) selama 15 menit.

3.5.2. Penyiapan dan Peremajaan Isolat Bakteri Endofit

Penyiapan dan pemurnian bakteri endofit dilakukan dengan cara sebagai berikut:

1. Meremajakan isolat bakteri endofit yang tumbuh pada medium TSA miring.
2. Menginkubasi selama 24 jam pada suhu 35° C.
3. Melakukan pengamatan terhadap bentuk dan warna koloni pada medium TSA sampai diperoleh koloni murni.

4. Kemudian memperbanyak bakteri endofit yang telah diperoleh untuk perlakuan.

3.5.3. Isolasi Sista *Globodera rostochiensis*

Metode pengambilan sampel dan isolasi sista *G. rostochiensis* berdasarkan metode Ditlin (2008). Cara pengambilan sampel adalah sebagai berikut:

1. Sampel tanah (sista, larva stadium dua dan jantan) di daerah perakaran lebih kurang 500 ml/0,5 kg.
2. Sampel akar (stadium belum dewasa, stadium dewasa dan sista): Tanaman dicabut hati-hati agar tidak banyak akar yang putus, kemudian dipotong di pangkal batang. Kalau diduga ada “nematoda berwarna kuning keemasan” menempel pada akar, diberi tanda khusus.
3. Bahan yang telah diperoleh lalu diberi label.

3.5.4. Isolasi Nematoda:

Cara isolasi sista *Globodera rostochiensis* berdasarkan metode Ditlin (2008) adalah sebagai berikut:

1. Sampel tanah:

Sampel tanah dibersihkan, dikering anginkan, 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 ke dua dituang pelan-pelan ke dalam kertas tisu yang dibentangkan pada saringan ke tiga (diameter mata saringan 1 mm) dan ditaruh diatas gelas piala. Partikel

tanah di atas tissu diletakkan di atas piring. Sista pada tanah diambil/dihitung dengan bantuan alat pembesar.

2. Sampel akar

Sampel akar dicuci hati-hati, lalu dikering anginkan dan diamati di bawah alat pembesar. Nematoda betina atau sista yang menempel diambil dengan jarum preparat dan dikumpulkan.

3.5.5. Pelaksanaan Percobaan

1. Pembuatan Kultur Filtrat Bakteri Endofit

Bakteri endofit yang digunakan ditumbuhkan pada media Tryptic Soy Agar (TSA) selama 24 jam pada suhu kamar. Koloni tunggal dari bakteri dipindahkan ke dalam 100 ml media Tryptic Soy Broth (TSB) kemudian diinkubasi pada suhu 25° C menggunakan *shaker incubator* selama 48 jam dengan kecepatan 150 rpm. Kemudian kultur bakteri disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 15 menit. Filtrat bakteri endofit diambil dan dipergunakan dalam pengujian.

2. Pemilihan Benih atau Bibit Kentang

Bibit atau umbi yang digunakan dalam penelitian ini adalah umbi tanaman kentang bersertifikat yang rentan terhadap serangan nematoda sista kuning (*Globodera rostochiensis*). Bibit atau umbi tanaman kentang yang digunakan dengan berat antara 100-120 gram dengan 3-5 mata tunas, kemudian dicuci hingga bersih kemudian dibilas dengan air steril.

3. Penanaman Bibit Kentang

Penanaman bibit kentang dilakukan sebagai berikut:

1. Bibit umbi kentang ditanam dalam pot yang berisi tanah steril (tanah:pasir, 2 : 1) sebanyak 2 kg/polibag, dimasukkan dalam polibag berukuran 15 x 35 cm.
2. Lubang tanam dibuat dengan kedalaman 8-10 cm. Bibit dimasukkan ke lubang tanam, ditimbun dengan tanah dan tekan tanah di sekitar umbi.
3. Tiap polibag tanaman kentang terdiri dari 1 tanaman, sehingga polibag yang memiliki tanaman lebih dari 1 akan dicabut. 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.
4. Bibit kentang varietas Granola yang telah bertunas disemai selama 5 hari ditanam pada polibag.

4. Perlakuan Filtrat Bakteri Endofit

Tanah disekitar batang tanaman kentang disiram dengan filtrat bakteri endofit, masing-masing 10 ml per polibag.

5. Inokulasi Nematoda *Globodera rostochiensis*

Inokulasi nematoda *Globodera rostochiensis* dilakukan 2 minggu setelah perlakuan ditanam, dengan cara 100 ekor larva II diinokulasikan dengan cara menuangkan suspensi nematoda di sekitar batang tanaman (Harni, 2006).

6. Pemeliharaan

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. Tanaman kentang sangat peka terhadap kekurangan air. Pengairan harus dilakukan secara rutin tetapi tidak berlebihan. Pemberian air yang cukup membantu menstabilkan kelembaban tanah. Pemberian air selang waktu 7 hari sekali secara rutin sudah cukup untuk tanaman kentang. Pengairan dilakukan dengan cara disiram sampai areal lembab.

3.5.6. Pengamatan Jumlah Sista *Globodera rostochiensis* dalam 100 gram Tanah

Penghitungan jumlah sista *Globodera rostochiensis* dalam 100 gram tanah dilakukan pada 7 minggu setelah penanaman kentang. Pengambilan sista dilakukan dengan metode flotasi (*Fenwick*) mula-mula diambil tanah 100 gram kemudian ditambahkan air lalu diaduk dan didiamkan selama 5 menit agar tanah bisa mengendap dan yang tersisa hanya bahan-bahan organik dan sista yang mengapung di tepi *beaker glass*, kemudian ditambahkan air sampai melimpah (air yang melimpah terdiri dari bahan organik dan sista), kemudian ditampung dan diambil sista yang ada pada baki dengan kuas kecil (Rahayu, 2003).

3.5.7. Pengamatan Terhadap Tinggi Tanaman Kentang.

Tanaman kentang dicabut dari dalam tanah, kemudian diletakkan diatas lantai bersih dan diukur panjang tanaman mulai dari ujung hingga pangkal dengan menggunakan mistar.

3.5.8. Pengamatan Terhadap Berat Akar Tanaman Kentang

Akar tanaman kentang yang telah dicabut dari tanah dan dibersihkan, kemudian ditimbang berat akar dengan menggunakan timbangan analitik.

3.6. Analisa Data

Analisis penelitian ini melalui Uji Anova One Way. Apabila $F_{hitung} > F_{tabel}$ 5%, maka H_0 ditolak. Apabila terjadi perbedaan yang nyata, maka dilanjutkan dengan uji BNT dengan taraf signifikansi 5%.