

BAB IV

METODOLOGI PENELITIAN

A. TEMPAT DAN WAKTU

Penelitian dilakukan di laboratorium Mikrobiogenetika Jurusan Biologi FMIPA Undip pada bulan April – Juni 1999 dan laboratorium Lapangan Dinas Perkebunan Jawa Tengah pada bulan April – Agustus 1999.

B. BAHAN DAN ALAT

Bahan : Massa telur *Meloidogyne sp.*, isolat *P. lilacinus* (isolat Temanggung, isolat Klaten dan isolat Pasuruan), PDA (Potato Dekstrosa Agar) , jagung giling, alkohol 70%, laktofenol, akuades, larutan gula BJ 1,8, larutan garam fisiologis, kaolin, media tanam (campuran tanah dan humus dengan perbandingan 1 : 1), benih tembakau varietas F₁ TV₃₉ x G umur 40 hari dengan tinggi 2 cm.

Alat : Mikroskop cahaya, mikroskop binokuler, autoklaf, LAF (Laminair Air Flow), inkubator, alat sentrifuge, blender, erlenmeyer, cawan petri, gelas piala, tabung reaksi, neraca , ose, lampu spiritus, polibag ukuran 25x30 cm, pinset, jarum preparat, cawan penghitung nematoda, haemocytometer, pipet hisap.

temperatur 30° C, dapat dilakukan perbanyakkan pada medium biji jagung.

2. Perbanyakkan Isolat *P. lilacinus* Pada media jagung

- Biji jagung giling sebanyak 500 gr direndam dalam air mendidih selama 12 jam, kemudian disaring dengan saringan sehingga air terpisah dari biji jagung. Selanjutnya biji jagung sebanyak 50 gram dimasukkan ke dalam erlenmeyer 100 ml dan disterilkan dengan autoklaf(121°C, 2 atm) selama 15 menit. Setelah dingin dilakukan inokulasi *P. lilacinus* (Mulyadi, 1989).
- Inokulasi *P. lilacinus* ke dalam media jagung dalam bentuk suspensi konidia. Suspensi dibuat dengan menambahkan 5 ml larutan garam fisiologis ke dalam biakan miring *P. lilacinus*, kemudian permukaan koloninya digores-gores dengan ose hingga seluruh konidia terlepas dan terbentuk suspensi konidia. Suspensi yang diperoleh ditambahkan pada 95 ml larutan garam fisiologis. Suspensi sebanyak 10 ml diinokulasikan kedalam media jagung kemudian diinkubasi pada temperatur 30° C selama 14 hari (Jatala, 1989).

3. Penghitungan kerapatan spora inokulum *P. lilacinus*

- Biakan *P. lilacinus* pada media jagung yang telah berumur 14 hari diambil sebanyak 5 g, 10 g, 15 g, dan masing- masing dimasukkan ke dalam erlenmeyer 100 ml, dan ditambahkan 100 ml larutan garam fisiologis, sambil dikocok dan diaduk hingga seluruh konidia terlepas dan membentuk suspensi konidia.

- Diambil lima mililiter suspensi konidia dengan pipet hisap dan diletakkan di atas haemocytometer, kemudian dilakukan penghitungan konidia di bawah mikroskop. Rumus perhitungan untuk menentukan kerapatan konidia/ml menurut Lay & Hastowo, (1992) adalah sebagai berikut :

$$P = E \times 50 \times 1000 \times F$$

dengan P : kerapatan konidia/ml

E : jumlah konidia terhitung

F: faktor pengenceran

4. Penyiapan inokulum telur *Meloidogyne sp.*

- Menurut Mulyadi (1989), kultur *Meloidogyne sp.* dapat diperoleh dengan menanam tanaman yang bergejala terserang nematoda puru akar pada media tanah steril. Empat puluh lima hari setelah tanam, tanaman dicabut dan dilakukan ekstraksi dengan metode sentrifuge (lampiran 1) sehingga diperoleh suspensi massa telur.

5. Uji efektivitas *P. lilacinus* di rumah kaca

- Persiapan media tanam. Media tanam berupa campuran tanah berpasir dan humus dengan perbandingan 1 : 1, kemudian disterilkan pada autoklaf (121° C, 2 atm) selama ± 2 jam. Media tanam dimasukkan ke dalam polibag ukuran 25x30 cm sebanyak 3 kg. Dilaksanakan pada minggu pertama bulan Juni 1999.

- Penanaman bibit tembakau. Bibit tembakau varietas F₁ TV₃₉XG umur 40 hari dengan tinggi rata-rata 2 cm ditanam pada media tanam. Dilaksanakan pada tanggal 19 Juni 1999.
- Inokulasi massa telur dan media jagung yang ditumbuhi *P. lilacinus*. Massa telur hasil ekstraksi diinokulasikan sebanyak seribu butir telur tiap polybag, bersamaan dengan itu dilakukan inokulasi inokulum *P. lilacinus*. Isolat *P. lilacinus* yang digunakan ada tiga jenis yaitu : Isolat-Temanggung (I₁), isolat Klaten (I₂), isolat Pasuruan (I₃).
- Kemudian ada empat dosis inokulum yang digunakan yaitu :
 - D₀ : 0 g inokulum/3 kg media tanah (0% w/w) kerapatan 0 konidia/ml
 - D₁ : 5 g inokulum/3 kg media tanah (0,16% w/w) dengan kerapatan 1. 10⁸ konidia/ml
 - D₂ :10 g inokulum/3 kg media tanah (0,33% w/w) dengan kerapatan 3. 10⁸ konidia/ml
 - D₃ :15 g inokulum/3 kg media tanah (0,50% w/w) dengan kerapatan 5. 10⁸ konidia/ml
 Dilaksanakan pada tanggal 22 juni 1999.
- Pemeliharaan tanaman. Meliputi penyiraman, pengendalian hama dan gulma secara mekanis dilaksanakan sejak penanaman bibit sampai akhir percobaan.
- Pengamatan. Setelah 45 hari setelah inokulasi *P. lilacinus* dan telur *Meloidogyne sp.* tanaman dicabut dan dilakukan pengamatan.

D. PARAMETER

Parameter yang diamati dalam uji patogenitas *P. lilacinus* sebagai agen pengendali hayati *Meloidogyne sp* di rumah kaca menurut Mulyadi (1989) adalah sebagai berikut :

1. Tingkat kerusakan akar

Tingkat kerusakan akar ditentukan dengan metode Zeck (lampiran 2). Metode ini berdasarkan keadaan puru pada akar, yang dinyatakan dengan indeks puru akar (1-10) dan prosentasi total akar yang berpuru. Data yang diperoleh adalah indeks puru akar tanaman.

2. Populasi larva *Meloidogyne sp.*

Populasi larva *Meloidogyne sp.* ditentukan setelah dilakukan ekstraksi (metode sentrifuge). Larva dalam suspensi hasil ekstraksi dihitung dengan cawan hitung nematoda di bawah mikroskop binokuler perbesaran 100 X. Data yang diperoleh adalah populasi larva *Meloidogyne sp.* / tanaman.

3. Populasi telur *Meloidogyne sp.*

Suspensi hasil ekstraksi juga mengandung telur *Meloidogyne sp.* Penghitungan telur menggunakan haemocytometer. Data yang diperoleh adalah polulasi telur *Meloidogyne sp.*/ tanaman.

E. ANALISIS DATA

Percobaan disusun dalam rancangan acak lengkap (RAL) faktorial dengan 3 ulangan tiap perlakuan. Analisis data menggunakan Anova dan untuk mengetahui beda nyata antar perlakuan dilakukan uji beda nyata jujur (BNJ) dengan taraf kesalahan 5%.