

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan waktu pelaksanaan

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari 2023 sampai bulan Juni 2023 bertempat di Laboratorium Mikrobiologi dan di Rumah Kaca (*Green House*) Fakultas Pertanian Universitas Siliwangi Kampus Mugarsari Kota Tasikmalaya dengan tipe curah hujan C dan ketinggian tempat 367 meter diatas permukaan laut.

3.2 Alat dan bahan

Alat yang digunakan pada penelitian ini diantaranya cawan petri, gelas ukur, timbangan analitik, tabung reaksi, jarum ose, pipet, mikropipet, *tube* mikropipet, erlenmeyer, gelas objek, autoklaf, *magnetic stirrer*, *plastic wrap*, alumunium foil, kertas stensil, *hot plate*, *shaker*, *spreader*, *Laminar Air Flow Cabinet* (L AFC), mikroskop, haemositometer, bunsen, inkubator, kompor gas, *polybag* ukuran 15 cm x 15 cm, *water purifier* dan *luxmeter*.

Adapun bahan – bahan yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya 28 bakteri endofit koleksi laboratorium mikrobiologi Fakultas Pertanian Universitas Siliwangi dari tanaman ginseng jawa (*Talinum paniculatum* Gaertn.) yang telah diisolasi dari akar ginseng jawa, isolat patogen *Phytium* sp., media *Potato Dextrose Agar* (PDA), media *Potato Dextrose Broth* (PDB), media *Nutrient Agar* (NA), media *Nutrient Broth* (NB), alkohol 70%, aquadest steril, alkohol 70%, alkohol 96%, tanah steril, pasir, pupuk kompos, pupuk anorganik urea, SP36, KCl, POC dan biji ginseng jawa.

3.3 Metode penelitian

Penelitian ini menggunakan metode deskriptif (uji antagonis) dan eksperimental (*in-planta*). Metode penelitian yang digunakan untuk uji *in-vitro* bakteri endofit adalah metode deskriptif dengan menggunakan isolat endofit yang dipilih dari koleksi hasil eksplorasi penelitian Manik., (2022) dari akar tanaman ginseng jawa sebagai bahan uji antagonis terhadap patogen busuk akar.

Sementara itu dilakukan penelitian metode eksperimen secara *in-planta* dengan menguji *strain* inokulum bakteri endofit ginseng jawa terpilih terhadap pertumbuhan tanaman ginseng jawa. Adapun rancangan penelitian yang digunakan yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial dengan 2 faktor, faktor pertama yaitu waktu aplikasi (w) terdiri dari 4 taraf, dan faktor kedua yaitu penggunaan jenis bakteri endofit (d) terdiri dari 3 taraf, sehingga terdapat 12 kombinasi perlakuan dan 3 ulangan. Jumlah plot sebanyak 36 ditambah 3 sebagai *checkplot*. dalam satu plot terdiri dari 6 tanaman, sehingga jumlah tanaman yang digunakan sebanyak 234 tanaman.

Faktor pertama adalah waktu aplikasi mikroba endofit (w):

w_0 = 2 MST

w_1 = 4 MST

w_2 = 6 MST

w_3 = 8 MST

Faktor kedua adalah jenis isolat hasil *screening* bakteri endofit (d):

d_1 = Jenis bakteri endofit GJ-3

d_2 = Jenis bakteri endofit GJ-12

d_3 = Jenis bakteri endofit GJ-3 dan GJ-12

Tabel 1. Kombinasi perlakuan faktor pertama dan faktor kedua

Waktu aplikasi (w)	Bakteri endofit (d)		
	d_1	d_2	d_3
w_0	w_0d_1	w_0d_2	w_0d_3
w_1	w_1d_1	w_1d_2	w_1d_3
w_2	w_2d_1	w_2d_2	w_2d_3
w_3	w_3d_1	w_3d_2	w_3d_3

Data hasil pengamatan dari masing-masing perlakuan diolah secara statistik dengan menggunakan daftar sidik ragam, seperti tabel berikut:

Tabel 2. Analisis Sidik Ragam

Sumber keragaman	Db	JK	KT	F hit.	F 0,05
Perlakuan	11	$\frac{\sum T^2}{r} - FK$	JK_p/db_p	KT_p/KT_g	2,26
Waktu (w)	3	$\frac{\sum w^2}{rd} - FK$	JK_w/db_w	KT_w/KT_g	3,05
Endofit (d)	2	$\frac{\sum d^2}{rw} - FK$	JK_d/db_d	KT_d/KT_g	3,44
Interaksi w x d	6	$JK_w - JK_d$	Jk_{wd}/db_{wd}		2,55
Galat	22	$JK_{total} - JK_{perlakuan}$	JKG/dbG		
Total	35	$\sum x. . . ij^2 - FK$			

Sumber: Gomez dan Gomez (2015)

Kaidah pengambilan keputusan berdasarkan pada nilai F_{hitung} dapat dilihat pada Tabel berikut:

Tabel 3. Kaidah pengambilan keputusan

Hasil analisa	Kesimpulan analisa	Keterangan
$F_{hit} \leq F_{0,05}$	Berbeda tidak nyata	Tidak ada pengaruh
$F_{hit} > F_{0,05}$	Berbeda nyata	Ada pengaruh

Jika terjadi perbedaan antar perlakuan atau berpengaruh nyata, maka dilakukan uji lanjut dengan uji jarak berganda Duncan pada taraf nyata 5% dengan rumus sebagai berikut:

$$LSR = S_x \times SSR$$

Apabila terdapat interaksi, untuk membedakan pengaruh faktor mikroba endofit (d) pada setiap waktu aplikasi (w) dan sebaliknya untuk membedakan taraf waktu aplikasi (w) pada setiap perlakuan mikroba endofit (d), S_x diperoleh dengan rumus:

$$S_x = \sqrt{\frac{KT \text{ Galat}}{r}}$$

Apabila tidak terdapat interaksi:

1. Untuk membedakan pengaruh faktor waktu aplikasi (w) pada seluruh perlakuan faktor mikroba endofit (d), S_x dihitung dengan rumus:

$$S_w = \sqrt{\frac{KT \text{ Galat}}{r \times d}}$$

2. Untuk membedakan pengaruh faktor mikroba endofit (d) pada seluruh taraf faktor waktu aplikasi (w), S_x dihitung dengan rumus:

$$S_d = \sqrt{\frac{KT \text{ Galat}}{r \times w}}$$

Keterangan :

LSR = *Least Significant Range*

SSR = *Significant Stuenalized Range*

P = *Range (Perlakuan)*

S_x = Galat Baku Rata-Rata (*Standard Error*)

KTG = *Kuadrat Tengah Galat*

r = Jumlah ulangan pada tiap nilai tengah perlakuan yang dibandingkan

w = Db perlakuan waktu aplikasi

d = Db perlakuan endofit

3.4 Pelaksanaan penelitian

3.4.1 Uji deskriptif

a. Sterilisasi alat laboratorium

Alat-alat laboratorium yang akan digunakan, dilakukan sterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C dengan tekanan 1 atm selama 20-30 menit. Sebelum dimasukkan kedalam autoklaf alat yang terbuat dari kaca dibungkus menggunakan kertas dan plastik.

b. Pembuatan media

Medium yang digunakan untuk memperbanyak isolat mikroba yaitu media cair dan media padat. Untuk media padat digunakan *Nutrient Agar* (NA) dan *potato dextrose agar* (PDA), sedangkan untuk media cair menggunakan *Nutrient Broth* (NB) dan *potato dextrose broth* (PDB).

c. Penyiapan dan peremajaan isolat bakteri dan fungi endofit

Penyiapan dan peremajaan bakteri dan fungi endofit dilakukan dengan cara menyiapkan sebanyak 28 isolat mikroba endofit koleksi hasil penelitian sebelumnya yang tersedia di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Pertanian Universitas Siliwangi. Mikroba endofit diperbanyak dengan cara menanam kembali pada media *Natrium agar* (NA) dan *Potato Dextrose Agar* (PDA). Kemudian hasil peremajaan disimpan dalam rak inkubasi selama 7 hari sampai mikroba memenuhi cawan petri dengan suhu ruangan, setiap hari dilakukan pengamatan terhadap bentuk dan koloni pada masing masing media. Setelah memenuhi cawan petri, mikroba endofit siap untuk di uji antagonis dengan patogen penyebab busuk akar *Pythium* sp. Hasil uji antagonis akan menunjukkan mikroba endofit terbaik yang akan dipilih.

d. *Screening* mikroba endofit dengan patogen *Pythium* sp.

Screening dilakukan dengan cara uji antagonis secara *in vitro* bertujuan untuk memilih isolat mikroba endofit yang memiliki kemampuan terbaik dalam menghambat pertumbuhan *Pythium* sp. Pengujian antagonis mikroba endofit terhadap *Pythium* sp. dilakukan dengan menggoreskan pada dua sisi media PDA dengan jarak 1 cm dari tepi cawan petri. Selanjutnya, isolat mikroba endofit dan *Pythium* sp. yang sudah berumur 7 hari dengan diameter 5 mm diletakan di bagian tengah cawan petri, kemudian diinkubasi dalam suhu kamar dan diamati zona penghambatannya disekitar *Pythium* sp. dan endofit mulai 3 hari setelah inokulasi hingga 7 hari. (Ikram dkk., 2022). Masing-masing diukur dan dicatat secara berurutan sampai memenuhi cawan petri. Persentase penghambatan dihitung menggunakan rumus sebagai berikut (Royse dan Ries, 1977):

$$I = \left(\frac{R1 - R2}{R1} \right) \times 100$$

Keterangan:

- I = presentase hambatan (%)
- R1 = Jari-jari mikroba endofit
- R2 = Jari-jari fungi patogen

3.4.2 Uji eksperimen

a. Penyediaan benih ginseng jawa

Benih ginseng jawa diperoleh dari tanaman ginseng jawa yang berada di *Green house* Fakultas Pertanian Universitas Siliwangi Kampus Mugarsari. Benih yang diambil adalah benih dari buah yang telah masak dan mengering.

b. Penyiapan suspensi isolat mikroba endofit

Berdasarkan hasil uji antagonisme secara *in vitro* diambil 2 isolat bakteri endofit terpilih. Penyiapan suspensi mikroba endofit disesuaikan dengan jenis isolat yang terpilih. Jika yang terpilih isolat bakteri endofit dilakukan dengan menumbuhkan bakteri dalam media cair *Nutrient Broth* (NB). Selanjutnya, koloni bakteri disuspensikan dengan menambahkan 9 mL akuades steril, kemudian diaduk, dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Konsentrasi suspensi bakteri endofit yang digunakan yaitu 10^9 - 10^{10} cfu/ml (Irawati, 2017).

Jika yang terpilih isolat fungi endofit dilakukan dengan menumbuhkan fungi dalam media *Potato Dextrose Broth* (PDB) selama 1 sampai 2 minggu, kemudian fungi endofit dipanen dan disuspensikan dalam air steril hingga kerapatan populasi sebesar 10^6 cfu/ml (Irawati, 2017).

c. Perlakuan benih

Benih dari biji ginseng jawa yang akan digunakan disterilisasi terlebih dahulu menggunakan alkohol 70% selama 2 menit, kemudian bilas dengan air steril sebanyak 3 kali lalu tiriskan. Benih direndam dengan akuades selama 24 jam, banyak benih yang digunakan sebanyak 234 biji.

d. Penyiapan lahan

Lahan yang digunakan untuk menumbuhkan ginseng jawa dengan 12 perlakuan dan 3 ulangan dalam *polybag* berukuran 15 cm x 15 cm dengan diberi jarak 20 cm x 20 cm pada *Green house* yang telah disediakan di Fakultas Pertanian Universitas Siliwangi.

e. Penyiapan suspensi patogen fungi *Pythium* sp.

Fungi *Pythium* sp. diperbanyak pada media *Potato Dextrose Agar* (PDA) dan diinkubasi hingga memenuhi cawan petri pada suhu ruangan selama 7 hari sampai memenuhi cawan petri. Selanjutnya, isolat jamur *Pythium* sp., dimasukan secara

aseptis ke dalam erlenmeyer yang telah berisi *Potato Dextrose Broth* (PDB) dan digojog menggunakan *shaker* dengan kecepatan 150 rpm selama 24 jam pada suhu kamar. Setelah itu dilakukan pengukuran kepadatan inokulum menggunakan haemositometer. Kepadatan populasi suspensi konidium yang dibutuhkan 10^6 . Menurut Slade dkk. (1987), kepadatan konidium dihitung dengan rumus: $C = \{t/(n \times 0,25)\} \times 10^6$ konidium mL^{-1} , dengan C = kepadatan konidium per mL, t = jumlah total konidium dalam kotak sampel yang diamati, n = jumlah kotak sampel, dan $0,25$ = faktor koreksi penggunaan kotak sampel skala kecil pada penggunaan haemositometer.

f. Pembuatan media tanam dan penanaman

Tanah yang digunakan disterilisasi menggunakan autoklaf. Media tanam diisi dengan tanah, pupuk kompos, dan pasir dengan perbandingan 1:1:1. *Polybag* yang digunakan berukuran 15 cm x 15 cm. Penanaman dilakukan dengan cara melubangi tanah yang ada didalam *polybag* kedalaman 2-3 cm dan ditanam 2 benih ginseng jawa. Jarak setiap *polybag* 20 cm, dalam percobaan ini terdapat 36 plot ditambah 3 plot percobaan dengan 6 tanaman pada setiap plot.

g. Aplikasi suspensi isolat mikroba endofit

Setelah dilakukan perendaman menggunakan akuades steril pada biji ginseng jawa sebelum ditanam, endofit diberikan sesuai perlakuan masing-masing dengan kepadatan populasi 10^9 - 10^{10} satuan per koloni ml^{-1} (CFU/mL). Frekuensi pemberian mikroba endofit adalah 4 kali dengan selang waktu 2 minggu dimulai dari tanaman berumur 2, 4, 6 dan 8 MST. Cara pemberian suspensi mikroba endofit yaitu disemprotkan ke tanah perakaran sebanyak 30 ml (Gusmaini dkk., 2013).

h. Aplikasi suspensi isolat patogen

Fungi patogen *Pythium* sp. dengan kepadatan populasi konidium 10^6 diaplikasikan pada umur 9 MST, dengan cara disemprot di permukaan bawah tanaman. Dosis yang digunakan adalah 30 ml per-*polybag*. Aplikasi dilakukan pada pagi hari pukul 06.00-09.00 (Hamka dkk., 2021).

i. Pemeliharaan dan pengamatan

1. Pemupukan

Pemupukan pertama dilakukan menggunakan pupuk organik kompos yang dicampurkan dengan media tanam, kemudian pada umur 4 MST ditambahkan pupuk anorganik Urea sebanyak 0,1 gram per-*polybag*, SP36 dengan dosis 0,12 gram per-*polybag*, KCl 0,12 gram per-*polybag*, kemudian setelah tanaman berumur 6 MST ditambahkan POC dengan dosis 20mL disiramkan pada tanaman.

2. Penyiraman

Penyiraman dilakukan jika dibutuhkan, pada pagi hari pukul 06.00-09.00, sedangkan sore hari pukul 16.00-17.30 dengan konsentrasi penyiraman 100%.

3. Penyiangan

Penyiangan dilakukan secara manual dengan cara mencabut gulma yang tumbuh pada plot penelitian dengan hati-hati.

4. Pengendalian hama

Pengendalian hama disesuaikan dengan jenis yang menyerang tanaman agar tidak mengurangi kualitas tanaman atau mengganggu penelitian yang sedang berjalan.

3.5 Parameter pengamatan

3.5.1 Pengamatan penunjang

Parameter penunjang adalah pengamatan data yang diperoleh dari hasil penelitian yang tidak dianalisis secara statistik. Pengamatan penunjang ini bertujuan untuk mengetahui faktor-faktor eksternal yang mungkin berpengaruh selama penelitian berlangsung. Pengamatan ini terdiri dari temperatur, kelembaban udara, intensitas cahaya, dan organisme pengganggu tanaman (gulma dan hama).

3.5.2 Pengamatan utama

Pengamatan utama adalah pengamatan yang dilakukan pada setiap variabel dan data yang dihasilkan dianalisis secara statistik untuk mengetahui pengaruh dari setiap perlakuan yang diteliti.

a. Indeks pertumbuhan tanaman

Indeks pertumbuhan tanaman dapat digunakan sebagai indikator kuantitatif laju pertumbuhan tanaman dan untuk membandingkan ukuran tanaman yang ditanam di bawah perlakuan yang berbeda. Pengukuran indeks pertumbuhan tanaman ini dilakukan sebanyak 3 kali pada tanaman berusia 6 MST, 8 MST, dan 10 MST. Tinggi tanaman diukur dari pangkal batang hingga ujung daun tertinggi. Lebar tanaman diukur dari kedua arah timur-barat (sejajar dengan baris tanaman) dan utara-selatan (tegak lurus dengan barisan tanaman). Pada pengukuran lebar tanaman jarak antara dua daun diukur. Indeks pertumbuhan tanaman diukur dengan rumus sebagai berikut (Irmak dkk., 2004)

$$IP = (T+(Ltb+Lus)/2)/2$$

Keterangan:

IP = Indeks pertumbuhan

T = Tinggi tanaman (cm)

Ltb = Lebar tanaman dari arah timur ke barat (cm)

Lus = Lebar tanaman dari arah utara ke selatan (cm)

b. Bobot akar (g)

Tanaman sampel yang dicabut berjumlah satu tanaman dari satu plot kemudian dibersihkan dari tanah dan kotoran-kotoran lainnya yang melekat, kemudian akar tanaman dipisahkan dari batang dan daunnya dengan cara dipotong menggunakan pisau. Bobot akar segar dan bobot akar kering tanaman ditimbang menggunakan timbangan analitik dan catat hasilnya. Pengeringan akar menggunakan oven dengan suhu 105°C selama 24 jam. Pengamatan bobot akar dilakukan sebanyak 2 kali pada minggu ke 6 dan 11.

c. Laju asimilasi bersih (g/cm²/2mg)

Laju asimilasi bersih adalah laju pertambahan berat kering per satuan luas daun persatuan waktu.

$$LAB = \frac{W_2 - W_1}{t_2 - t_1} \times \frac{\ln A_2 - \ln A_1}{A_2 - A_1}$$

Keterangan:

W_1 = Bobot kering tanaman pada t_1

W_2 = Bobot kering tanaman pada t_2

t_1 = Waktu pengamatan awal

t_2 = Waktu pengamatan akhir

A_1 = Luas daun pada awal pengamatan

A_2 = Luas daun pada akhir pengamatan

d. Insidensi penyakit

Penentuan insidensi penyakit dapat dilakukan dengan melakukan pengamatan berdasarkan gejala penyakit penting dilakukan dengan pengamatan tetap. Pengamatan tetap sebanyak 2 kali setelah infeksi patogen *Pythium* sp. yaitu pada 10 MST dan 11 MST. Teknik pengamatan tetap yaitu tiap rumpun diamati sebanyak 3 tanaman. Jumlah keseluruhan sampel yang diamati sebanyak 108 dari 216 tanaman. Data pengamatan yang diperoleh selanjutnya akan ditabulasi dan dihitung dengan rumus perhitungan insidensi penyakit dengan menggunakan rumus oleh Yudiarti, 2007:

$$I = \frac{a}{b} \times 100\%$$

Keterangan:

I = Insidensi penyakit

a = Jumlah tanaman terserang

b = Jumlah tanaman yang diamati

e. Tingkat keparahan

Keparahan penyakit diamati perumpun tanaman. Rumus perhitungan keparahan penyakit dapat menggunakan rumus dari Beaker (1985) sebagai berikut:

$$KP = \frac{\sum (n \times v)}{Z \times N} \times 100\%$$

Keterangan:

KP = Keparahan penyakit (%)

n = Jumlah akar terserang dengan kategori tertentu

v = Nilai skala setiap kategori serangan

N = Jumlah tanaman yang di amati

Z = Nilai skala tertinggi

Kategori kerusakan ditentukan dengan skala sebagai berikut:

0 = Tidak ada gejala serangan; 1 = akar bergejala 1-25%; 2 = akar bergejala 25-50%; 3 akar bergejala 50-75%; 4 = akar bergejala 75-100%.

Kategori dalam kelas intensitas serangan penyakit akibat patogen *Pythium* sp. sebagai berikut:

Tabel 4. Kategori Intensitas Serangan Penyakit

Skor	Intensitas Serangan	Kategori serangan
0	0%	Tidak ada (sehat)
1	1-25%	Ringan
2	25-50%	Sedang
3	50-75%	Berat
4	75-100%	Sangat berat

(Beaker, 1985)