

III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian dilakukan di rumah kaca dan Sub Laboratorium Nematologi Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian, Universitas Brawijaya, Malang. Penelitian ini dilakukan mulai bulan Desember 2013 hingga Maret 2014.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah corong bearmen, suntikan, saringan, toples bekas selai, handcounter, cawan petri, gelas ukur, pipet, pinset, tusuk gigi, kertas saring, kertas milimeter block, timbangan analitik, kertas label, alat tulis, mikroskop, polybag ukuran 5 kg, cetok, sekop, selang, wadah persemaian, gunting, plastik penutup (ukuran 3m x 3m), preparat, kompor listrik.

3.2.2 Bahan

Tanah, kompos, formalin 5%, klorox 0.5% (NaOCl), sumber inokulum *Meloidogyne spp.* Benih tanaman tomat, terung, dan cabai.

3.3 Metode Penelitian

Penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap dengan tiga perlakuan dan empat ulangan, setiap perlakuan terdapat 6 tanaman, dikarenakan pengamatan dilakukan 6 kali setiap tujuh hari sekali. Dengan jumlah tanaman keseluruhan 72 tanaman. Perlakuan yang diujikan adalah :

1. *Meloidogyne spp.* diinokulasikan pada tanaman tomat (*Solanum lycopersicum*) (P1).
2. *Meloidogyne spp.* diinokulasikan pada tanaman terung (*Solanum melongena L.*) (P2).
3. *Meloidogyne spp.* diinokulasikan pada tanaman cabai (*Capsicum annum L.*) (P3).

Pengamatan dilakukan dengan metode destruktif mulai minggu ke-1 sampai minggu ke-6 (msi). Setiap minggu dilakukan pengamatan pada 12 tanaman, yaitu pada tanaman tomat, terung, dan cabai yang masing-masing terdapat 4 ulangan.

3.4 Persiapan Penelitian

3.4.1 Persiapan media tanam

Media tanam yang digunakan adalah campuran pasir, tanah, dan kompos dengan perbandingan 2 : 2 : 1. Sebelum digunakan, media tanam tersebut disterilkan dengan menggunakan formalin 5%, jadi campuran dari pasir, tanah, dan kompos tersebut diaduk merata terlebih dahulu kemudian disemprotkan dengan formalin 5% sampai merata, lalu diaduk lagi, kemudian ditutup dengan plastik selama 3 hari. Setelah itu plastik dibuka dan media tanam dikeringanginkan. Setelah itu media tanam dimasukkan ke dalam polibag ukuran 5 kg dan wadah persemaian.

3.4.2 Pembibitan tanaman uji

Benih tanaman tomat, cabai, dan terung disemaikan dalam wadah persemaian yang telah berisi media tanam. Benih yang akan di pakai direndam terlebih dahulu dalam air selama 5-10 menit. Perlakuan ini dimaksudkan untuk memecah masa dormansi biji, sehingga biji cepat berkecambah. Selama pembibitan, perawatan dan pemeliharaan tetap di lakukan agar bibit tumbuh dengan baik. Setelah umur dua minggu bibit dipindahkan ke dalam polibag yang telah berisi media tanam.

3.4.3 Koleksi nematoda puru akar (*Meloidogyne* spp.)

Nematoda diperoleh dengan cara mengekstraksi akar tanaman yang terinfeksi *Meloidogyne* spp. Di daerah Desa Bumiaji, Batu. Ekstraksi nematoda dengan cara membasuh/membilas akar tanaman terlebih dahulu agar bersih dari tanah dan kemudian di potong dengan ukuran 0,5-2 cm. Potongan akar tanaman tomat yang terserang nematoda *Meloidogyne* spp. dimasukkan ke dalam *beaker glass* 600 ml yang telah berisi air yang sudah dicampurkan larutan (NaOCl 0,5%) sampai terendam, kemudian diaduk selama 15 menit atau sampai tercampur rata, setelah diaduk, ekstrak disaring dengan menggunakan saringan 125 mesh dan dilanjutkan dengan menggunakan saringan halus 270 mesh dan sisa akar pada saringan dibilas

dengan air untuk membersihkan sisa-sisa telur yang masih melekat. Selanjutnya suspensi berisi telur nematoda dituang ke dalam gelas ukur 200 ml dan ditambah air secukupnya yang nantinya digunakan sebagai penelitian.



Gambar 2. Akar tanaman tomat yang terinfeksi nematoda puru akar (*Meloidogyne* spp.)

Kemudian diinokulasikan ketanaman tomat pada umur 30 hari setelah pembenihan. Inokulasi untuk tiap perlakuan sebanyak 1000 telur nematoda puru akar *Meloidogyne* sp (Hussey dan Janssen, 2002). Setelah minggu ke-1, sampai minggu ke-6 (msi). Hasil inokulasi nematoda dilakukan dengan metode destruktif dengan cara membongkar tanaman dan diambil akar tanaman tiap perlakuan dan 100 gram tanah kemudian diekstraksi untuk mengetahui populasi nematoda puru akar *Meloidogyne* spp.

3.5 Pelaksanaan Penelitian

3.5.1 Inokulasi telur nematoda puru akar (*Meloidogyne* spp.)

Untuk pelaksanaan penelitian ini tanaman di inokulasikan 1000 telur nematoda di setiap polibag pada umur 4 minggu dengan cara di masukkan ke sekitar area perakaran tanaman. dengan jarak 1 cm dengan menggunakan spoid ukuran 25 ml. Untuk memudahkan proses inokulasi, sebelum diinokulasikan terlebih dahulu tanah di dekat akar dilubangi dengan kedalaman ± 10 cm dan berdiameter 1 cm,

setelah inokulasi lubang ditutup kembali dengan tanah (Barker *et al.*, 1985) Jumlah tanaman yang di inokulasi sebanyak 72 tanaman.

Kemudian dilakukan pengamatan secara destruktif dengan mengambil dan mengekstraksi akar tanaman, kemudian dilakukan pengamatan terhadap jumlah nematoda dalam 100 gram tanah dan jumlah nematoda dalam akar tanaman tiap perlakuan.

3.5.2 Pengamatan

Metode pengamatan yang digunakan adalah metode destruktif, yaitu dengan membongkar tanaman tomat kemudian dilakukan pengamatan terhadap jumlah nematoda dalam 100 gram tanah dan jumlah nematoda dalam 1 gram akar. Perhitungan jumlah populasi nematoda di dalam tanah menggunakan metode *Bearmann tray* dan perhitungan jumlah populasi nematoda pada jaringan akar menggunakan metode Fiksasi (Pewarnaan).

Pengamatan untuk tanah, terlebih dahulu gumpalan tanah dihaluskan, tanah ditebar pada saringan mesh 45 mikron, diayak hingga mendapatkan hasil ukuran tanah lalu hasil tanah tersebut dan di timbang hingga mencapai 100 gram tanah dengan kertas saring dan digenangi selama 24 jam.

Tanah hasil tiap perlakuan, Masing-masing diekstraksi dengan metode corong *Bearmann tray* selama 24 jam. Suspensi hasil ekstraksi diambil dan dikumpulkan sesuai perlakuan dan ulangan, volume suspensi akan dihitung jumlah nematoda didalamnya dijadikan 100 ml. Metode ini menggunakan teori probabilitas/peluang, suspensi tersebut diletakkan pada gelas ukur 250 ml, Kemudian larutan diaduk hingga homogen. Sebagai sub contoh, diambil 10 ml menggunakan micro pipet ukuran 2 ml sebanyak 5 kali hingga sampai terhitung 10 ml.



Gambar 3. Ekstraksi NPA dalam tanah dengan metode *Bearmann tray*

Perhitungan nematoda pada 10 ml larutan dilakukan dibawah mikroskop menggunakan cawan petri bergaris 1x1 cm dan dihitung dengan menggunakan hand counter. Dilakukan pengulangan tiga kali dan setiap pengambilan sub contoh, suspense yang telah dihitung dikembalikan lagi kedalam gelas ukur.

Berdasarkan panduan tersebut, 10 ml suspensi diambil dari beker gelas dengan menggunakan pipet micro 2 mm sebanyak 5 kali hingga sampai terhitung 10 ml dan diletakkan di dalam cawan penghitung, kemudian nematoda dihitung di bawah mikroskop binokuler (perbesaran 100x). Penghitungan diulang 3 kali.

Selanjutnya penghitungan populasi per 100 gram/ml contoh tanah adalah sebagai berikut :

$$P = \frac{P^1 + P^2 + P^3}{n} \times X$$

Keterangan :

P adalah Populasi nematoda dalam suspensi (hasil ekstraksi dari 100 g tanah)

P¹, P², dan P³ adalah Perhitungan setiap 10 ml suspensi dengan 3 kali ulangan

n adalah Banyaknya pengambilan sub sampel (ulangan)

X adalah $\frac{\text{Volume suspensi}}{\text{Volume sub suspensi}}$

$$\text{Contoh : } X = \frac{100 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} = 10 \text{ ml}$$

(Balai Proteksi Tanaman Perkebunan Jawa Timur,1997)

3.5.3 Populasi Nematoda Puru Akar (*Meloidogyne* spp.) pada 1 gram Akar

Populasi nematoda khusus untuk akar, menggunakan metode fiksasi (pewarnaan) bertujuan untuk menghitung jumlah populasi nematoda di dalam jaringan akar.

Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah dengan fiksasi atau pewarnaan jaringan tanaman. Bridge et al. (1995) menyatakan bahwa pewarnaan ini dapat melunakkan jaringan dan secara khusus membantu untuk mendapatkan nematoda puru akar *Meloidogyne* spp. dari jaringan tanaman.

Akar yang terinfeksi terlebih dahulu dicuci dengan hati-hati sampai bersih dari tanah atau gumpalan tanah, akar dikeringkan hingga tidak ada air pada akar sisa dicuci, kemudian akar dipotong tipis 0,5-1 cm sebelum diwarnai. Hasil dari potongan-potongan akar yang terinfeksi kemudian dibungkus kain kasa yang sebelumnya kain kasa sudah diikat oleh benang woll yang digunakan untuk menyelupkan akar kedalam larutan lactofenol yang telah dicampur dengan acid fuksin (*lacto-fuchsin*) dan dipanaskan tidak sampai mendidih, lalu potongan akar yang telah dibungkus dengan kain kasa dicelupkan di larutan lactofenol yang telah diberi acid fuksin selama 5 menit agar cairan lakto-fuksin (*lacto-fuchsin*) meresap kedalam jaringan akar tanaman sehingga nematoda mati, kemudian di rendam dengan gliserin sampai 5 menit agar cairan gliserin meresap kedalam jaringan tanaman dan ditiriskan, potongan akar terinfeksi tersebut ditimbang 1 gram tiap perlakuan. Potongan akar terinfeksi yang sudah ditimbang 1 gram tersebut kemudian diletakan di atas gelas preparat. Preparat tersebut ditutup dengan gelas preparat yang lain, peletakan ini dilakukan dengan hati-hati agar namatoda yang ada di dalam akar tidak hancur atau pecah. Preparat diamati dengan menggunakan perbesaran yang diinginkan dan dihitung jumlah populasi nematoda dalam 1 gram akar tiap perlakuan. Pengamatan ini dilakukan dengan hati-hati dan teliti karena akar tanaman yang berwarna merah yang transparan dan nematoda yang berukuran kecil terkadang sulit untuk diamati.

Perhitungan nematoda pada 1 gram akar dihitung dibawah mikroskop binokuler (perbesaran 100x), preparat yang berisi akar yang telah dipotong dan diwarnai dihitung dengan menggunakan hand counter. Tidak dilakukan pengulangan dikarenakan berat akar masing-masing berbeda.

3.5.4 Jumlah Puru pada Akar (Root Gall)

Pengamatan terhadap adanya puru akar (gall) pada akar tanaman yang disebabkan nematoda puru akar (*Meloidogyne spp*). Metode pelaksanaan penelitian ini adalah dengan metode Sasser *et al* (1984), yaitu dengan cara tanaman uji dalam perlakuan 1, 2, dan 3 (telah diinfeksi nematoda), Pengamatan jumlah puru dilakukan 6 kali, yaitu pada minggu ke-1 sampai minggu ke-6 setelah inokulasi (msi), dan masing-masing minggu diulang sebanyak 3 kali ulangan dalam per 1 gram akar.

3.6 Variabel Pengamatan

Variabel yang diamati meliputi jumlah populasi nematoda puru akar (*Meloidogyne spp.*) pada akar tanaman uji, jumlah nematoda pada 100 gr tanah, dan jumlah puru pada akar tanaman uji

Data yang diperoleh dianalisis dengan analisis sidik ragam (anova) dan apabila berbeda nyata dilanjutkan dengan uji BNT dengan taraf kepercayaan 5%.