

III. BAHAN DAN METODE

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini merupakan bagian dari penelitian jangka panjang *Studi Rehabilitasi Tanah* yang merupakan kerjasama peneliti antara Universitas Lampung, *Yokohama National University* (YNU) Jepang, dan PT.Gunung Madu Plantations, yang telah dimulai sejak tahun 2010 di lahan perkebunan PT.Gunung Madu Plantations (GMP). Pengambilan sampel tanah dilaksanakan pada periode tebu *ratoon-II* umur 9 bulan, nematoda diekstraksi dan diidentifikasi di Laboratorium Bioteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung dari bulan Mei 2013 sampai dengan November 2013.

3.2 Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan adalah sampel tanah, aquades, larutan Golden X (campuran aquades, formalin, *glycerin*) larutan gula, dan air. Sedangkan alat yang digunakan dalam penelitian adalah bor tanah, sekop, nampan, gelas ukur, botol suspensi nematoda, botol semprot, ember, kertas label, saringan 1 mm, 53 μ m, 38 μ m, mikroskop *stereo binokuler* dan *compound*, kaca preparat, *coverglass*, cawan Petri, botol 250 ml, pengait nematoda, pipet tetes, *hand counter*, botol aquades, *centrifuge* dan *stopwatch*.

3.3 Metode Penelitian

Plot penelitian yang digunakan merupakan plot penelitian jangka panjang yang telah dibuat pada tahun 2010. Penelitian ini menggunakan lahan pertanaman tebu seluas 2 ha. Lahan dibagi menjadi 5 kelompok dan tiap kelompok dibagi menjadi 4 petak dengan ukuran tiap petak 25 m x 40 m. Pada setiap kelompok terdapat empat petak dan diberi simbol A, B, C, dan D, pada petak A dan B diberi perlakuan olah tanah intensif (T_1) sedangkan petak C dan D diberi perlakuan tanpa olah tanah (T_0).

Perlakuan dalam penelitian ini disusun dalam Rancangan Percobaan Petak Terbagi (*split plot experimental design*) dengan lima kelompok sebagai ulangan. Petak utama adalah sistem olah tanah dan anak petak pemulsaan. Sistem olah tanah terdiri dari dua perlakuan yaitu olah tanah intensif (T_1) dan tanpa olah tanah (T_0), sedangkan perlakuan pemberian mulsa terdiri dari dua perlakuan yaitu tanpa mulsa (M_0) dan pemberian mulsa bagas (M_1 = mulsa 80 ton ha⁻¹). Pemberian mulsa dilakukan secara acak, pada petak olah tanah intensif maupun petak tanpa olah tanah. Kombinasi perlakuan disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Kombinasi perlakuan petak utama (PU) dan anak petak (AP)

Anak Petak (AP)	Petak Utama (PU)	
	Tanpa Olah tanah (T_0)	Olah Tanah Intensif (T_1)
Tanpa Mulsa (M_0)	T_0M_0	T_1M_0
Dengan Mulsa (M_1)	T_0M_1	T_1M_1

Keterangan : T_0M_0 = Tanpa olah tanah dan tanpa pemberian mulsa bagas; T_1M_0 = Olah tanah intensif dan tanpa pemberian mulsa bagas; T_0M_1 = tanpa olah tanah dan pemberian mulsa bagas 80 ton ha⁻¹; T_1M_1 = Olah tanah intensif dan pemberian mulsa bagas 80 ton ha⁻¹.

3.4 Pelaksanaan Penelitian

3.4.1 Pengolahan Lahan

Penelitian ini menggunakan lahan pertanaman tebu yang telah dipersiapkan untuk dijadikan lahan penelitian jangka panjang yang dimulai pada bulan Juni 2010 sampai 10 tahun ke depan. Penelitian untuk penulisan skripsi ini merupakan hasil pengamatan pada pertanaman tebu musim *ratoon-II*. Pola tanam yang diterapkan adalah pola tanam yang sudah biasa dilakukan di PT Gunung Madu Plantations, dengan menggunakan tebu varietas RGM 00-838.

Penyiapan lahan pada fase *plant cane* dimulai dengan membagi lahan menjadi 20 petak perlakuan dengan ukuran tiap petaknya 25 m x 40 m. Setelah itu lahan dipersiapkan sesuai dengan perlakuan, yaitu pada petak tanpa olah tanah (T_0) dan perlakuan mulsa dan tanpa mulsa. Pada petak T_0 tanah tidak diolah sama sekali, gulma yang tumbuh dikendalikan secara manual kemudian sisa gulma dikembalikan ke lahan sebagai mulsa. Sedangkan pada petak olah tanah intensif (T_1) baik pada perlakuan mulsa dan tanpa mulsa, tanah diolah sesuai dengan sistem pengolahan tanah yang diterapkan di PT GMP yaitu sebanyak 3 kali pengolahan menggunakan traktor. Pengendalian gulma dilakukan dengan cara kimiawi, yaitu aplikasi herbisida.

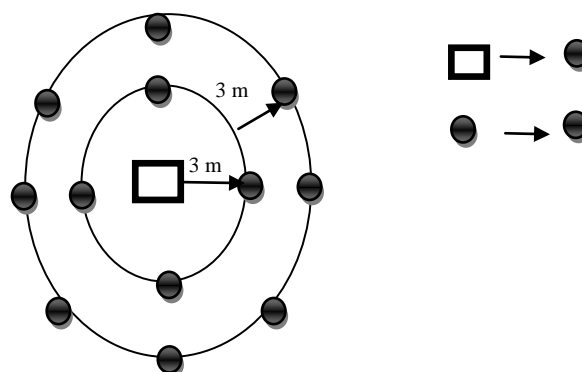
Pada setiap plot perlakuan diberikan pupuk sebanyak 2 kali, pertama sebagian pupuk dasar yang diaplikasi sehari sebelum dilakukan penanaman. Pupuk yang diaplikasikan berupa pupuk kimiawi berupa Urea, TSP (*Triple Super Phosphate*), MOP (*Murriate of Potash*) dengan dosis (300 : 200 : 300) yang dikombinasikan dengan bagas, blotong, abu ketel (BBA)

dengan perbandingan 3 : 5 : 1 sebanyak 80 ton/ha. Pada perlakuan olah tanah intensif (T_1) BBA diberikan pada saat pengolahan tanah (BBA *Mix*) sedangkan pada tanpa olah tanah (TOT) BBA yang diberikan dengan cara dihamparkan sebagai mulsa.



Setelah tanaman keprasan atau *ratoon I* dipanen, pangkal batang tebu disisakan dan tunasnya dipelihara sebagai tanaman *ratoon II*. Penyiapan lahan yang dilakukan pada fase *ratoon II* yaitu dengan membersihkan sampah sisa panen yang kemudian diberikan perlakuan yang sama seperti pada fase *plane cane* dan *ratoon I*.

3.4.2 Pengambilan Sampel Tanah

Pengambilan sampel tanah dilakukan pada bulan April 2013 yaitu pada saat tebu berumur 9 bulan, *ratoon-II* mulai tumbuh pada bulan Agustus 2012. Dari setiap petak percobaan sampel tanah diambil pada 12 titik sub sampel dengan menggunakan bor tanah. Sampel tanah diambil sampai kedalaman 20 cm dan kemudian dicampur sebagai sampel komposit. Masing-masing sampel dimasukkan ke dalam kantung plastik dan diberi label. Sampel tanah diambil secara melingkar dengan *monolith* sebagai pusatnya, empat titik berjarak 3 m dari pusat dan delapan titik berjarak 3 m dari titik pertama, seperti pada Gambar 2 (Susilo dan Karyanto, 2005). Posisi Monolith berada di petak tengah percobaan.



Gambar 1. Tata letak pengambilan contoh tanah

Keterangan :  = titik pusat (*monolith*)
 = titik pengambilan contoh tanah

3.4.3 Metode Ekstraksi Nematoda

Ekstraksi nematoda dari tanah menggunakan metode penyaringan dan sentrifugasi dengan larutan gula (Gafur dan Swibawa, 2004). Larutan gula disiapkan dengan cara melarutkan 500 gram gula dalam air sehingga volume larutan menjadi 1000 ml.

Sebanyak 300 cc tanah yaitu kurang lebih setara dengan 300 gram tanah dimasukkan ke dalam ember, kemudian ditambahkan air sebanyak 2 liter, diremas-remas sambil diaduk kemudian didiamkan selama 3 menit. Suspensi didekantasi menggunakan saringan dengan ukuran lubang 1 mm dan suspensi tanah ditampung dalam ember lain, sisa saringan tanah di dalam ember pertama dibuang. Suspensi tanah pada ember kedua didekantasi lagi dengan saringan dengan ukuran lubang 53 μm dan supernatannya ditampung dalam ember ketiga. Suspensi tanah pada ember ketiga didekantasi dengan saringan dengan ukuran lubang 38 μm .

Suspensi tanah yang ada pada saringan dikumpulkan ke dalam tabung *centrifuge* dan disentrifugasi pada kecepatan 3500 rpm selama 5 menit. Setelah itu, supernatan dibuang dan endapannya ditambahkan larutan gula dan diaduk hingga merata kemudian di *centrifuge* kembali dengan kecepatan 1500 rpm selama 2 menit. Setelah itu, supernatan yang merupakan suspensi nematoda ditampung menggunakan saringan dengan ukuran lubangnya

3,8 μm , kemudian dibilas dengan air untuk membersihkan larutan gula. Suspensi nematoda kemudian dimasukkan ke dalam botol suspensi.

3.4.4 Fiksasi

Fiksasi merupakan metode yang dilakukan untuk mengawetkan nematoda dengan cara menambahkan larutan fiksasi (larutan Golden X) ke dalam suspensi nematoda yang terlebih dahulu dimatikan dengan cara memanaskan botol suspensi sehingga suspensi mencapai suhu 50°-70°C. Setelah dingin suspensi dijadikan 3 ml, lalu ke dalam botol tersebut ditambahkan larutan Golden X (formalin 1,15 ml, glycerin 0,28 ml, aquades 8,6 ml) agar suspensi menjadi 10 ml, sehingga nematoda berada pada formalin 3%.

3.4.5 Perhitungan Populasi dan Identifikasi Nematoda

Kelimpahan seluruh nematoda dihitung dengan cara mengambil suspensi sampai sebanyak 3 ml, kemudian dituang ke cawan petri bergaris, perhitungan dilakukan berulang sampai seluruh suspensi habis. Nematoda dihitung di bawah mikroskop bedah *stereo binokuler* pada perbesaran 40 kali.

Identifikasi nematoda dilakukan terhadap 100 nematoda yang diambil secara acak untuk setiap sampel. Satu persatu nematoda dikait dan diamati di bawah mikroskop bedah *stereo binokuler*, sekitar 10-15 nematoda diletakkan pada kaca preparat, diberi setetes larutan Golden X kemudian ditutup dengan *coverglass*. Nematoda diamati dan diidentifikasi

berdasarkan ciri morfologinya di bawah mikroskop compound dengan perbesaran 100-400 kali. Nematoda diidentifikasi sampai pada tingkat genus dengan bantuan buku Mai and Lyon (1975) dan Goodey (1963).

Nematoda kemudian dikelompokkan menjadi nematoda hidup bebas dan nematoda parasit tumbuhan berdasarkan struktur stomanya. Nematoda hidup bebas tidak memiliki stilet sedangkan nematoda parasit tumbuhan memiliki stilet. Berdasarkan nama genus kelompok nematoda juga dapat diketahui.

3.4.6 Analisis Data

Peubah yang diamati yaitu kelimpahan dan dominansi nematoda. Kelimpahan meliputi kelimpahan seluruh nematoda yang meliputi nematoda hidup bebas dan nematoda parasit tumbuhan. Kelimpahan absolut genus nematoda dihitung dari kelimpahan relatif genus dikalikan kelimpahan seluruh nematoda. Dominansi genus diukur dengan nilai Prominence PV (*Prominence Value*) sebagai sebagai berikut :

$$PV = di \sqrt{fi},$$

Dimana PV = *Prominence Value*; di = Kerapatan; fi (frekuensi) = jumlah sampel yang mengandung jenis *i*/ jumlah seluruh sampel.

Kelimpahan absolut tiga genus nematoda parasit tumbuhan yang paling dominan dianalisis ragam dengan Uji F ($\alpha=0,05$), pemisahan nilai tengah dilakukan dengan uji BNT pada taraf nyata 5%.