

III. METODE PENELITIAN

3.1. Tempat dan Waktu

Penelitian dilaksanakan di kebun percobaan Blok 83607 stasiun Departemen Riset dan Pengembangan PT. Nusantara Tropical Farm. Lokasi terletak pada koordinat $5^{\circ} 03' 52''$ LS dan $105^{\circ} 41' 08''$ BT di Desa Raja Basa Lama, Kecamatan Labuhan Ratu, Kabupaten Lampung Timur. Ketinggian tempat ± 50 m di atas permukaan laut dan jenis tanah ialah Ultisol. Blok percobaan merupakan tempat khusus seluas 4 ha untuk melakukan percobaan yang berhubungan dengan pengendalian layu fusarium. Penelitian berlangsung dari Oktober 2013 sampai dengan September 2014.

3.2. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan adalah alat pengolah tanah berupa *Moldboard* yang ditarik dengan traktor *Jhon Deere 6930* untuk membalikkan tanah olah, *Cronevator* yang ditarik dengan traktor *Jhon Deere 6100B* untuk menghaluskan butiran tanah dan *Ridger* yang ditarik dengan traktor *Newholland TS90* untuk membuat parit antara dua baris tanaman. Aplikasi perlakuan menggunakan drum plastik 200 l, ember, literan, gelas ukur, takaran aplikasi agensi hayati, meteran, kertas dan alat tulis. Budidaya pisang menggunakan alat meteran dari bambu, cangkul, sabit pemotong anakan dan daun, ember dan takaran pupuk, *Knapsack sprayer semiautomatic*,

alat suntik jantung pisang, alat pengukur curah hujan, instalasi irigasi dan mesin pompa air.

Bahan yang digunakan adalah bibit pisang Cavendish klon CJ30 sebanyak 1.920 batang yang berasal dari perbanyakan secara kultur jaringan. Inokulum agensia hayati yang diproduksi di LIPI Cibinong. Pupuk kandang sapi yang sudah terdekomposisi sebanyak 20 kg/lubang tanam. Pembungkus tandan pisang, insektisida berbahan aktif *chlorpirifos*, herbisida berbahan aktif *paraquat dichlorida*, pupuk untuk areal pertanaman berupa Urea, TSP, KCl, Kieserite/Mg sulfat, Zn sulfat, Boron, Gypsum/Ca sulfat dan Dolomite. Pupuk untuk pembibitan berupa Hiponek, NPK 15:15:15, Urea dan KCl, serta Bayfolan.

3.3. Metode Penelitian

Percobaan disusun secara faktorial dalam rancangan acak kelompok. Faktor pertama adalah tiga cara aplikasi agensia hayati: investasi agensia hayati di pembibitan (C1), investasi agensia hayati di lahan tanam (C2) dan investasi agensia hayati di pembibitan dan lahan tanam (C3). Faktor kedua adalah empat jenis perlakuan agensia hayati: tanpa agensia hayati (A0), *B. subtilis* 140-B(A1), *S. angustmyceticus*. L.3.1-DW (A2) dan *B.subtilis* 140-B + *S. angustmyceticus* L.3.1-D.W (A3). Berdasar kedua faktor tersebut didapat 12 kombinasi perlakuan. Setiap perlakuan diulang sebanyak delapan kali, sehingga diperoleh 96 satuan percobaan (denah terlampir). Satu unit percobaan di lahan terdiri atas 20 tanaman uji, selama percobaan berlangsung jumlah tanaman per unit percobaan dapat berkurang karena adanya tanaman *offtype*, terinfeksi *R. solanacearum*, *Erwinia* sp., *Heart rot disease* atau virus.

3.4. Pelaksanaan Penelitian

3.4.1. Penyiapan agensia hayati

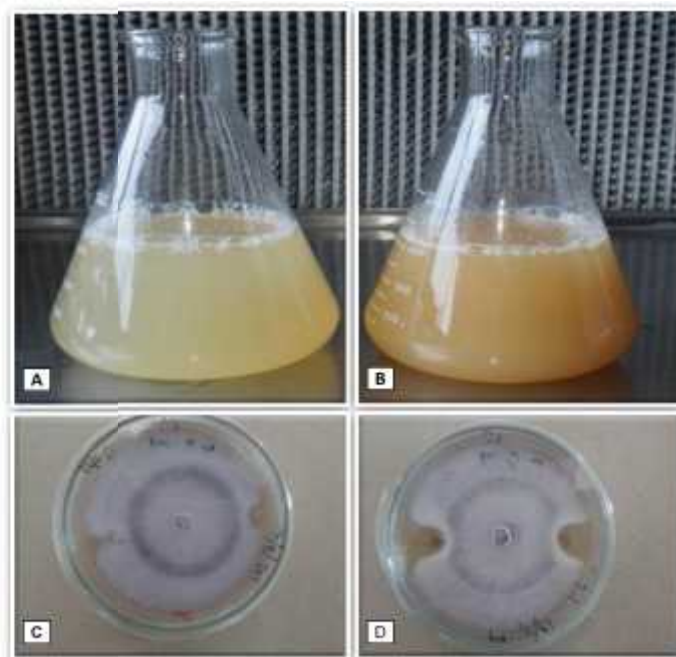
Mikroorganisme yang dimanfaatkan dalam penelitian ini adalah *B. subtilis* 140-B dan *S. angustmyceticus* L.3.1-DW dengan kerapatan populasi masing-masing mikroorganisme sebanyak 10^9 CFU/ml (Gambar 1 (a,b)). Gambar 1 (c dan d) menunjukkan hasil uji antagonisme *B. subtilis* dan *S. angustmyceticus* terhadap Foc. Suspensi *B. subtilis* 140-B dan *S. angustmyceticus* L.3.1-DW dibuat secara terpisah. Agensia hayati dibuat di Laboratorium Mikrobiologi Puslit Biologi LIPI Cibinong Bogor Jawa Barat.

Metode perbanyakan agensia hayati yang dilakukan di LIPI adalah sebagai berikut:

- a. Isolat bakteri agensia hayati *B. subtilis* 140-B diinokulasi ke dalam 1 l media *nutrient broth* (NB) yang terdiri dari 5 g pepton dan 3 g *beef extract* dalam 1 l akuades. Kemudian diinkubasi dalam *rotary shaker* selama 24 jam, dan digunakan sebagai starter untuk perbanyakan di fermentor. Untuk isolat bakteri *S. angustmyceticus* L.3.1 diinokulasi dalam 1 l media ISP2, yang terdiri atas 4 g *yeast extract*, 10 g *malt extract* dan 4 g *dextrose* dalam 1 l akuades.
- b. Untuk isolat *B. subtilis*, 140-B disiapkan media NB 20 l di dalam fermentor, yang terdiri dari 100 g pepton dan 60 g *beef extract*. Isolat *S. angustmyceticus*, L.3.1 disiapkan 80 g *yeast extract*, 200 g *malt extract* dan

80 g *dextrose* dalam 20 l akuades di fermentor. Kemudian disterilisasi pada suhu 121⁰C selama 10 menit.

- c. Setelah proses sterilisasi selesai, ditunggu sampai suhu media turun menjadi 30⁰C, selanjutnya kultur bakteri starter dimasukkan ke dalam fermentor dan ditumbuhkan selama 24 jam pada pH 6,5-7,0.
- d. Setelah 24 jam, kultur bakteri dipanen dari fermentor, dengan mengalirkan uap panas dari alat pemanas ke saluran keluar cairan dari bejana fermentor selama \pm 5 menit.
- e. Kultur bakteri dimasukkan dalam jerigen yang sudah disterilisasi dengan alkohol dan sinar UV dan disimpan dalam lemari pendingin pada suhu 4-7⁰C.
- f. Hasil perhitungan mikroba dari kultur yang dipanen dari fermentor dengan metoda hitungan cawan (*plate count*) berkisar dari 10⁸-10⁹ CFU/ml.



Gambar 1. Suspensi agensia hayati dan Foc *in vitro*. (A). *B. Subtilis* 140B, (B). *S. angustmyceticus* L.3.1.DW, (C). *In vitro B. subtilis* 140B vs Foc, (D). *S. angustmyceticus* L.3.1.DW vs Foc.

Umur formula agensia hayati adalah 1-2 bulan sebelum digunakan dan ditempatkan di Laboratorium Riset dan Pengembangan NTF pada ruangan berpendingin udara. Perlakuan penggabungan kedua agensia hayati, pencampuran dilakukan di dalam drum pada saat aplikasi dengan perbandingan yang sama.

3.4.2. Penyiapan media pembibitan

Bahan baku media pembibitan adalah pupuk kandang sapi, serbuk gergaji kayu, sekam padi, dan rontokan sabut kelapa dengan perbandingan 25:40:15:20. Untuk mempercepat proses dekomposisi, dalam 1 m³ campuran bahan organik ditambahkan Urea 1 kg, KCl 0,75 kg dan Dolomite 5 kg. Proses dekomposisi media pembibitan dilakukan secara anaerob dengan cara ditutup plastik mulsa hitam. Media dibuka kemudian diaduk seminggu sekali selama dua bulan. Media pembibitan yang sudah didekomposisi disaring untuk mendapatkan keseragaman butiran. Volume polybag untuk media pembibitan sebanyak 0,0215 m³ atau seberat 2,5 kg.

3.4.3. Pemilihan bibit pisang di pembibitan

Bibit pisang diseleksi dari hasil perbanyakan secara kultur jaringan yang sudah diaklimatisasi selama 3-4 minggu dalam sungkup plastik di pembibitan. Kriteria bibit yang dipilih yaitu bibit yang paling besar dengan jumlah daun tiga helai dengan ukuran yang relatif seragam, secara visual sehat dan vigor. Jumlah bibit yang dibutuhkan dilebihkan sebanyak dua kali lipat untuk mengantisipasi adanya *offtype*, ketidakseragaman bibit pada saat siap tanam, gejala CMV (*Cucumber Mosaic Virus*) dan BSV (*Banana Streak Virus*) selama perawatan di pembibitan.

3.4.4. Perawatan bibit di pembibitan

Bibit yang sudah diaklimatisasi kemudian dirawat menggunakan atap *shading net* dengan intensitas cahaya 50% selama 3 minggu. Lalu dilanjutkan pada intensitas cahaya 75% selama 1 minggu dan terakhir bibit dirawat tanpa *shading net* selama 2 minggu sebelum di tanam di kebun percobaan. Penanda perlakuan menggunakan plastik berwarna (*ribbon color*) yang berukuran 3 x 3 cm dan dilekatkan pada polybag. Pupuk yang digunakan pertumbuhan bibit adalah NPK 15:15:15 diaplikasikan sebanyak 2 g/polybag pada umur 0, 2 dan 4 minggu. Pupuk cair berupa campuran Urea 5 g + KCl 3,75 g/l air diaplikasikan sebanyak 50 ml larutan/polybag pada umur bibit 0-8 minggu dengan frekuensi tiga kali seminggu. Pupuk daun yang digunakan adalah Bayfolan pada konsentrasi 2 ml/l air diaplikasikan dengan dosis 20 ml larutan/bibit dengan frekuensi seminggu dua kali. Pupuk hayati yang diaplikasikan berkonsentrasi 1,25 ml/l air sebanyak 100 ml larutan/polybag pada umur bibit lima dan delapan minggu. Bibit disiram setiap hari apabila tidak turun hujan. Bibit yang memperlihatkan gejala *offtype*, CMV atau BSV dieradikasi, aktifitas ini dilakukan setiap minggu hingga bibit siap tanam. Rumput yang tumbuh di dalam polybag dikendalikan dengan cara dicabut secara manual.

3.4.5. Penyiapan lahan tanam

Lahan percobaan diolah pada kedalaman ± 40 cm dengan urutan aktifitas sebagai berikut: (1) tanah dibalik dengan menggunakan *molboard* yang ditarik dengan traktor *Jhon Deere 6930* berkekuatan 170 HP, (2) butiran tanah dihaluskan menggunakan *cronavator* yang ditarik dengan traktor *Newholland TS90*

berkekuatan 90 HP dilakukan dua minggu kemudian, (3) ajir bambu ditancapkan sebagai penanda jalur traktor pembuat parit antar dua baris tanaman, (4) parit dibuat antara dua baris tanaman dengan menggunakan *ridger* yang ditarik dengan traktor *Jhon Deere* 6100B berkekuatan 90 HP, (5) tali dan bambu ajir dipasang pada jarak tanam, (6) pembuatan lubang tanam dengan menggunakan cangkul dengan volume lubang tanam $0,18 \text{ m}^3$ dengan perbandingan ukuran panjang x lebar x dalam adalah $60 \times 60 \times 50 \text{ cm}$. Pupuk kandang sapi yang sudah terdekomposisi sebanyak $20 \text{ kg/lubang tanam}$ ($\pm 0,072 \text{ m}^3$), sehingga kandungan bahan organik di dalam lubang tanam $\pm 40\%$. Pupuk kandang sapi diaduk dengan lapisan atas tanah secara bertahap, sehingga dihasilkan campuran yang lebih merata.

3.4.6. Penanaman di lahan percobaan

Tanaman ditanam dalam jarak tanam $2 \times 3 \text{ m}$. Penentuan jarak tanam menggunakan bantuan tali yang dibentangkan sepanjang areal penanaman. Satu unit percobaan terdiri atas 20 tanaman yang disusun dalam satu baris tanaman. Seleksi bibit terakhir dilakukan pada saat sebelum penanaman dengan mengamati bibit yang kurang seragam, *offtype*, gejala CMV dan BSV.

Pupuk fosfat diaplikasikan dengan cara diaduk rata dengan media tanam hingga kedalaman 20 cm pada tujuh hari sebelum tanam. Pupuk nitrogen dan kalium diaplikasikan sehari setelah tanam. Pupuk-pupuk tersebut ditebar secara merata pada radius 5 cm melingkar batang, kemudian ditutup dengan tanah.

3.4.7. Aplikasi perlakuan

Perlakuan agensia hayati pada tiga kondisi yang berbeda tersusun atas kombinasi sebagai berikut: *B. subtilis* 140-B di pembibitan (C1A1), *S. angustmyceticus* L. 3.1-DW di pembibitan (C1A2), *B. subtilis* 140-B + *S. angustmyceticus* L. 3.1-DW di pembibitan (C1A3), tanpa agensia hayati di pembibitan (C1A0), *B. subtilis* 140-B di lahan (C2A1), *S. angustmyceticus* L. 3.1-DW di lahan (C2A2), *B. subtilis* 140-B + *S. angustmyceticus* L. 3.1-DW di lahan (C2A3), tanpa agensia hayati di lahan (C2A0), *B. subtilis* 140-B di pembibitan+lahan (C3A1), *S. angustmyceticus* L. 3.1-DW di pembibitan+lahan (C3A2), *B. subtilis* 140-B + *S. angustmyceticus* L. 3.1-DW (C3A3), tanpa agensia hayati di pembibitan+lahan (C3A0).

Dosis investasi agensia hayati tunggal di pembibitan sebanyak 2,5 ml/100 ml air/polybag, sedangkan di lahan sebanyak 0,25 ml/2 l air/tanaman. Perlakuan kombinasi agensia hayati di pembibitan masing-masing sebanyak 2,5 ml dan dicampurkan dengan 100 ml air/polybag, sedangkan di lahan sebanyak 2,5 ml dan dicampurkan dengan 2 l air/tanaman. Aplikasi perlakuan di pembibitan dilakukan sebanyak 2 kali yaitu pada umur bibit 4 dan 7 minggu. Aplikasi di lahan dilakukan satu minggu sebelum tanam lalu diaplikasikan rutin satu minggu sekali selama empat bulan.

3.4.8. Jadwal pemupukan tanaman

Pupuk hayati diaplikasikan dua minggu sekali pada dosis 2,5 ml/2 l air dari mulai tanam hingga tanaman berumur empat bulan. Aplikasi pupuk hayati dilakukan

berselang 3 hari setelah aplikasi perlakuan agensia hayati. Pupuk anorganik pada penelitian ini diaplikasikan sesuai dengan standar perusahaan.

Tabel 1. Jadwal pemupukan tanaman pisang Cavendish CJ30

Waktu Aplikasi (Bulan)	Urea	TSP	KCl	Kiesrite	ZnSO4	Gypsum	Borak
	45% N	46% P2O5	60% K2O	27% MgO, 23% S	22% Zn, 12% S	22% CaO, 12% S	11% B
(gram/tanaman)							
-1	50	65	50				
0	Tanam						
1	50		50		35		
2	100	43	100			300	
3	100		100	320			
4	100		125				2
5	75		150			300	
6	75		125	320	35		
7	50		100				
8			50				
Total	600	108	900	640	70	600	2
Total Aplikasi	8	2	9	2	2	2	1

3.5. Pengamatan

Pengamatan yang diuji secara statistik dan tidak diuji secara statistik dilakukan terhadap variabel berikut.

3.5.1. Pengamatan bahan organik kotoran sapi

Kandungan hara lengkap, C/N ratio dan pH, sampel dianalisis di Laboratorium Tanah GGPC. Analisis tanah lengkap, hara makro dan mikro yang dilakukan sebelum tanam dan setelah penelitian berakhir, analisis dilakukan di GGPC.

Pengukuran pH tanah sebulan sekali dari awal hingga akhir penelitian, analisis

dilakukan di laboratorium NTF. Analisis C/N ratio, pH dan hara terhadap media pembibitan.

3.5.2. Pengamatan terhadap tanaman bergejala layu fusarium

Keterjadian layu fusarium dan kecepatan perkembangan gejala serangan dari satu daun ke daun selanjutnya diamati seminggu sekali dimulai dari adanya tanaman yang bergejala hingga umur berbuah. Pengamatan pertumbuhan tanaman, yaitu tinggi tanaman, lingkaran batang dan kecepatan produksi daun. Analisis serapan hara pada tanaman berumur 2 bulan, 5 bulan dan keluar jantung.

3.5.3. Pengamatan terhadap tanaman tanpa gejala layu fusarium

Pertumbuhan tanaman sehat diamati pada perubahan tinggi tanaman, lingkaran batang dan kecepatan keluarnya daun. Pengamatan kecepatan waktu keluar jantung dan jumlah sisir pisang. Analisis serapan hara pada tanaman berumur 2, 5 bulan dan saat keluar jantung. Tingkat keterjadian penyakit layu fusarium ditentukan dengan rumus:

$$\text{Keterjadian Penyakit} = \frac{\text{layu fusarium}}{\text{tanaman pisang yang diamati}} \times 100\%$$

3.5.4. Penghitungan populasi Foc

A. Isolat *F. oxysporum f. sp. cubense* dan kondisi pertumbuhan. Penghitungan populasi Foc dilakukan di Laboratorium Biologi LIPI. Isolat *F. oxysporum f. sp. cubense* tropical race 4 yang digunakan dalam penelitian ini diambil dari setiap petak percobaan. Kultur spora tunggal dari isolat fungi ditumbuhkan pada tabung erlenmeyer 100 ml berisi media *Potato Dextrose Broth* (Difco). Setelah inkubasi

1 minggu, konidia fungi dikuantifikasi dengan cara mengambil suspensi spora 0,25 µl dan meneteskannya pada gelas Haemocytometer dan dihitung di bawah mikroskop. Jika jumlah spora mencapai 10^7 , seri pengenceran spora dibuat dari 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , and 10^1 . Seri pengenceran spora ini kemudian ditransfer ke dalam mikrotubes 1,5 ml untuk isolasi DNA.

B. Ekstraksi DNA. Sampel tanah dari eksperimen lapangan disimpan dalam suhu -20°C . sebelum diekstraksi, tanah dicuci dahulu menggunakan *buffer* PBS (8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na_2HPO_4 , 0,24 g KH_2PO_4 , pH 7,4). DNA tanah total diekstraksi menggunakan *PowerSoil DNA Isolation Kits (MoBio laboratories Inc., Carlsbad, USA)* mengikuti protokol dari produsen. Konsentrasi dan kualitas dari DNA ditentukan menggunakan spektrofotometer.

C. Kuantifikasi *F. oxysporum* f sp. *Cubense*. Kuantifikasi Foc menggunakan Real Time OCR dilakukan dengan kuantifikasi absolut (metode kurva standar). Pasangan primer yang digunakan dalam penelitian ini berdasarkan fragment DNA 242bp dari fusarium yang merupakan fragment spesifik untuk Foc TR4 menurut Lin *et al.* (2009). Pasangan primer tersebut adalah FocSc-1/FocSc-2(5' - CAGGGGATGTATGAGGAGGCTAGGCTA / 5' - GTGACAGCGTCGTCTAGTTCCTTGGAG). Kuantifikasi dari Foc TR4 didasarkan pada *plotting* kurva standar yang dibuat dengan cara menganalisa pasangan primer dengan *template* DNA dari seri pengenceran suspensi isolat Foc tropical race 4 pada mesin Real Time PCR. Real Time PCR dilakukan pada mesin CFX ConnectTM Real-Time PCR Detection System (BioRad, USA). Kurva standar didapatkan dengan mengeplot jumlah sel spora terhadap nilai Ct

(*threshold cycle*) yang dihasilkan pada mesin CFX Connect. Pengujian dengan Real Time PCR terdiri dari 20 µl campuran reaksi yang berisi cetakan DNA yang berasal dari sampel tanah, 10 mM pasangan primer, dan 1 kali SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (BioRad, USA). Parameter untuk real time PCR adalah sebagai berikut 95°C selama 5 menit (*denaturation and hot start activation*), 40 siklus pada 95°C selama 10 detik dan 60°C selama 30 detik. Setelah real-time PCR lalu penempatan pada kurva (65°C - 99°C). Semua reaksi dilakukan dengan 3 ulangan. Jumlah sel dari sampel yang diuji dikuantifikasi dengan membandingkan nilai Ct yang didapat dengan kurva standar.

3.6. Analisis Data

Data yang dikumpulkan sebelum dianalisis ragam harus memenuhi asumsi kehomogenan ragam yang dianalisis menggunakan uji Bartlett. Jika hasil analisis ragam terdapat perlakuan yang signifikan maka pengujian dilanjutkan dengan uji Beda Nilai Jujur (BNJ) pada taraf 5%. Seluruh perlakuan dianalisis menggunakan bantuan perangkat lunak SAS v. 9.3 dan *Statistic 8*.