

III. TATA CARA PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Agrobioteknologi dan *Green House* Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Penelitian dilakukan pada bulan Maret 2015 sampai September 2015.

B. Bahan Dan Alat Penelitian

1. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu : benih padi Segreng Handayani koleksi petani Gunungkidul, *Rhizobakteri indegenous* Merapi isolat MB dan isolat MD (koleksi Ir. Agung Astuti, M.Si.), media *plating* LBA (Luria Bertani Agar), media perbanyakan isolat LBC (Luria Bertani Cair), mikoriza pada rhizosfer tanaman jagung, KOH 10%, HCl 1%, *Acid fuchin* (untuk pengecatan), pupuk kandang, pupuk NPK (Urea, SP-36, dan KCl), tanah Regosol untuk media tanam, air untuk penyiraman, air steril, alkohol, dan bahan perekat *sticker*

2. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian adalah tabung reaksi *colonicounter*, *haemocytometer*, *petridish*, *shaker*, erlenmeyer, mikro pipet, timbangan, gelas, besek pembibitan, penggaris, dan timbangan analitik, jarum ose, *driglasky*, pinset, pipet ukur, *blue and yellow tip*, autoklaf, oven, gelas piala, lampu bunsen, lumpang martir

C. Metode Penelitian

Penelitian dilakukan menggunakan metode percobaan di *Green House* dengan menggunakan rancangan percobaan faktorial (3 x 3) yang disusun dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL).

Faktor pertama adalah frekuensi penyiraman yang terdiri dari 3 aras yaitu:

S3 = Penyiraman 3 hari sekali

S6 = Penyiraman 6 hari sekali

S9 = Penyiraman 9 hari sekali

Faktor kedua adalah macam inokulum yang terdiri dari 3 aras yaitu:

I1 = *Rhizobakteri indigenus* Merapi Isolat MB dan MD

I2 = *Rhizobakteri indigenus* Merapi Isolat MB dan MD+mikoriza

I3 = Mikoriza .

Sehingga kombinasi perlakuan yang diujikan yaitu:

S3.I1 = Penyiraman tiga hari sekali + *Rhizobakteri indigenus* Merapi

S3.I2 = Penyiraman tiga hari sekali + *Rhizobakteri indigenus* Merapi dan mikoriza

S3.I3 = Penyiraman tiga hari sekali + mikoriza

S6.I1 = Penyiraman enam hari sekali + *Rhizobakteri indigenus* Merapi

S6.I2 = Penyiraman enam hari sekali + *Rhizobakteri indigenus* Merapi dan mikoriza

S6.I3 = Penyiraman enam hari sekali + mikoriza

S9.I1 = Penyiraman sembilan hari sekali + *Rhizobakteri indigenus* Merapi

S9.I2 = Penyiraman sembilan hari sekali + inokulasi *Rhizobakteri indigenus* Merapi

S9.I3 = Penyiraman sembilan hari sekali + inokulasi mikoriza

Dengan demikian diperoleh 9 kombinasi perlakuan dan masing-masing perlakuan diulang sebanyak 3 kali dengan demikian diperoleh 27 unit percobaan. Setiap unit percobaan digunakan 7 tanaman, meliputi 3 tanaman sampel, 3 tanaman korban dan 1 tanaman cadangan sehingga total polybag sebanyak 189 *polybag* (Lampiran 1).

D. Tata Laksana Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dalam 3 tahapan, yaitu:

1. Tahap Pertama : Pembuatan Inokulum Campuran *Rhizobakteri indigenous* Merapi dan Formulasi *Carrier* Padat

i. Sterilisasi Alat.

Alat-alat yang terbuat dari logam dan gelas dicuci bersih kemudian dibungkus menggunakan kertas payung (lampiran 2. a 1). Seluruh alat disterilkan dalam autoklaf dengan temperatur 121°C tekanan 1 atm selama 30 menit. Bahan bahan untuk formulasi disterilisasi menggunakan autoklaf sebanyak dua kali dengan temperatur 121°C, 1 atm, selama 30 menit.

ii. Pembuatan medium *Luria Bertani* Agar (LBA) dan *Luria Bertani* Cair (LBC).

Media *Luria Bertani* merupakan media spesifik untuk pertumbuhan *Rhizobakteri*. Komposisi dan total kebutuhan media *Luria Bertani* terlampir pada lampiran 4. a-b. Media LBA digunakan untuk identifikasi isolat MA, MB dan MD dan untuk pembuatan kultur stok isolat. Media LBC digunakan untuk perbanyakkan *Rhizobakteri indigenous* Merapi dan pembuatan *starter* campuran. Seluruh bahan LBA dan LBC dilarutkan dan dipanaskan hingga homogen, pH 6,5-7,2 dan media harus steril (lampiran

10. a. 2). Medium LBA kemudian dimasukkan ke dalam 4 tabung reaksi steril sebanyak 10 ml/tabung reaksi, kemudian sebagian medium LBA dimasukkan dalam erlenmeyer (lampiran 10. a. 3). Medium LBC dimasukkan ke dalam erlenmeyer sebanyak 160 ml dan ke dalam 4 tabung reaksi steril sebanyak 10 ml/tabung reaksi. Setelah medium dipindah ke dalam tabung reaksi dan erlenmeyer, kemudian distrerilkan menggunakan autoklaf pada temperatur 121°C, 1 atm selama 15 menit. Medium steril dalam tabung reaksi kemudian diletakkan dengan kemiringan 30-45°.

iii. Identifikasi koloni dan sel isolat MB dan MD *Rhizobacteri indigenus* Merapi.

Sebelum masuk tahap identifikasi, dilakukan uji *screening* terlebih dahulu terhadap isolat MB dan MD untuk menguji ketahanan isolat pada kondisi stres lingkungan pada media LBA 2,5 M dan 2,75 M (lampiran 10. a. 4). Selanjutnya, isolat MB dan MD yang mampu tumbuh pada LBA 2,5 M dan 2,75 M dipindahkan pada media LBA standar untuk identifikasi karakteristik koloni dan sel (lampiran 10. a. 5). Identifikasi koloni dan sel dilakukan dengan cara menumbuhkan isolat MB dan MD dari hasil *screening* pada medium LBA standar (0,2 M) menggunakan metode permukaan (*surface plating method*). Pada tahap ini dilakukan pengamatan warna, diameter, bentuk koloni, bentuk tepi, elevasi dan struktur dalam koloni serta bentuk dan sifat sel *Rhizobacteri indigenus* (Lay, 1994). Hasil identifikasi karakteristik koloni *Rhizobacteri indigenus* Merapi dapat dilihat pada gambar 1.

iv. **Pembuatan biakan murni Isolat *Rhizobakteri indigenus* Merapi untuk kultur stok.**

Isolat *Rhizobakteri indigenus* Merapi isolat MB dan MD hasil identifikasi yang memiliki kesesuaian karakteristik koloni dan sel dengan hasil karakterisasi Agung_Astuti (2012) pada lampiran 3.a dimurnikan dengan cara mengambil 1 ose isolat bakteri ditumbuhkan pada medium LBA miring dengan medium goresan (*streak plating method*). Setiap tabung reaksi diisi dengan satu ose isolat bakteri yang diharapkan dalam medium LBA pada tabung reaksi tumbuh bakteri yang berkoloni. Biakan murni dibuat dari 1 ose isolat MB dan MD pada medium Luria Bertani Agar miring dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 27°C (lampiran 10. a. 6).

v. **Perbanyak dan pembuatan *starter* campuran isolat MB dan MD**

Perbanyak isolat MB dan MD dilakukan dengan mengambil 1 ose setiap isolat hasil pemurnian kemudian diinokulasikan ke dalam 2 tabung reaksi berisi 10 ml medium LBC untuk tiap isolat dan diinkubasi dengan suhu ruang 27°C selama 48 jam (lampiran 10. a. 7). Selanjutnya diteruskan pembuatan *starter* campuran dengan mengambil 2,5 ml hasil perbanyak tiap isolat dan diinokulasikan pada erlenmeyer steril berisi media LBC 50 ml dan dilakukan penggojokan pada *rotary shaker* dengan kecepatan 120 rpm selama 48 jam (lampiran 10. a. 8). Tujuan penggojokan adalah untuk menggiatkan kontak antara permukaan bakteri dengan larutan media, memudahkan peresapan larutan nutrisi ke dalam jaringan bakteri, melancarkan sirkulasi udara, sehingga udara dapat masuk ke dalam media serta menjaga homogenitas atau keseragaman larutan nutrisi dalam media (Kumala dkk., 2015). Setelah 48 jam pengaktifan fase mid *log* bakteri

pada *rotary shaker* dilakukan uji viabilitas *starter* campuran. Uji viabilitas dilakukan dengan cara mengambil satu mililiter *starter* campuran lalu diencerkan menggunakan air steril hingga seri pengenceran 10^{-8} . Pada seri pengenceran 10^{-6} , 10^{-7} dan 10^{-8} diambil 0,1 ml lalu diinokulasikan pada medium LBA dengan *surface plating method*. Perhitungan jumlah koloni *Rhizobakteri indigenus* Merapi dilakukan setelah inkubasi selama 48 jam pada suhu ruangan 27°C dengan metode *Total Plate Count* (TPC) (lampiran 10. a. 9). *Starter* campuran harus memiliki kepadatan populasi bakteri $\pm 10^7$ cfu/g. Skema perbanyakan dan pembuatan *starter* campuran dapat dilihat pada lampiran 5.

vi. Formulasi inokulum padat.

Menurut Noviana (2009) *Rhizobakteri Bacillus sp. DUCC-BR-K1* diaplikasikan dengan ketentuan 15 ml *starter* campuran *Rhizobakteri Bacillus sp. DUCC-BR-K1* untuk setiap 50 gram *carrier* gambut dan lempung halus yang telah disterilkan dengan perbandingan 3:2 (Noviana dkk., 2009). *Carrier* inokulum padat yang digunakan pada penelitian adalah kombinasi 89% gambut (w/w) + 1% gula (w/w) +10 arang aktif (w/w) dengan kemasan plastik (lampiran 10. a. 10). Tahapan formulasi diawali dengan mengambil 15 *starter* campuran *Rhizobakteri indigenus* Merapi dan dituang ke dalam kemasan plastik yang berisi 50 g *carrier* inokulum padat sambil diaduk supaya homogen yang dilakukan secara steril di dalam ruangan inokulasi bakteri (lampiran 10. a. 11). Hal yang perlu diperhatikan saat formulasi adalah pH dan kadar air. Kemasaman dan kadar air formula harus disesuaikan yaitu pH 7 dan kadar air 40%

untuk menunjang pertumbuhan *Rhizobakteri indigenus* Merapi dalam *carrier*. Bahan yang digunakan untuk menyesuaikan pH *carrier* ialah CaCO_3 (kapur) dan untuk menyesuaikan kadar air digunakan air steril. Selanjutnya, hasil percampuran *starter* campuran dan bahan pembawa dikemas dalam plastik kemasan diinkubasi selama 1 minggu (lampiran 10. a. 12). Pada hari ke-7 masa inkubasi dilakukan uji viabilitas *Rhizobakteri indigenus* Merapi untuk mengetahui pertumbuhannya selama penyimpanan. Menurut Husen (2012) jumlah populasi bakteri minimum yang terdapat dalam kemasan pupuk hayati, yaitu $>10^9$ sel g^{-1} atau ml^{-1} pada saat diproduksi dan $>10^7$ sel g^{-1} atau ml^{-1} pada masa kedaluarsa. Selanjutnya formula inokulum padat diaplikasikan pada benih padi Segreng Handayani saat persemaian benih .

vii. Perbanyak inokulum mikoriza.

Perbanyak inokulum dengan cara kultur pot dengan menggunakan tanaman jagung, masing-masing sebanyak 5 kg tanah sisa bekas tanam jagung kemudian ditanam biji jagung 2 butir tiap pot, lalu dipelihara selama ± 1 bulan. Setelah berumur 1 bulan, tanah dibongkar, akar jagung dibersihkan dan dicuci, kemudian dirajang. Tanah dan akar jagung tersebut dicampur kemudian dikering anginkan ± 7 hari. Kemudian dilakukan uji pendahuluan yaitu infeksi dan isolasi spora.

viii. Isolasi dan inokulasi mikoriza.

Inokulum mikoriza diperoleh dengan cara mengambil tanah sisa bekas penanaman jagung berumur 1 bulan yang telah diperbanyak dan selanjutnya disaring dengan teknik penyaringan basah (dekantasi) untuk

menghitung jumlah spora. Sedangkan akar tersier jagung dicacah dan dipotong sebanyak 25 potong berukuran 1-2 cm dan selanjutnya di rendam dalam larutan *Acid Fuchsin* kemudian diamati pada mikroskop dan dihitung persentase infeksi mikoriza. Apabila dari perhitungan jumlah spora didapatkan $\pm 50-60$ spora/gram dan persentase infeksi $\pm 80\%$ maka cukup diinokulasikan sebanyak 40 gram crude/tanaman dengan cara dimasukkan dalam lubang sebelum bibit padi ditanam. Apabila *crude* inokulum belum layak diaplikasikan (jumlah spora dan persentase infeksi kurang dari ketentuan di atas) maka inokulasi ditambahkan menjadi 2-3 kali lipatnya.

2. Tahap Kedua : Aplikasi Inokulum Padat *Rhizobakteri indigenus* Merapi Pada Benih Padi Segreng Handayani Serta Uji Efektifitasnya Terhadap Pertumbuhan Tanaman Padi Segreng Handayani.

a. Seleksi benih dengan larutan garam.

Seleksi benih dilakukan dengan cara memasukkan benih ke dalam wadah yang berisi air dan dicampur dengan garam $\pm 20\%$ dari volume air yang digunakan, kemudian benih tersebut diaduk sampai benih terpisah antara yang terapung dan tenggelam (lampiran 10. b. 1). Benih yang tenggelam adalah benih yang bagus untuk dibibitkan. Selanjutnya benih tenggelam diambil dan dibilas dengan air biasa sampai bersih dan dikering anginkan.

b. Uji perkecambahan.

Uji perkecambahan dimaksudkan untuk mengetahui kualitas daya kecambah padi Segreng Handayani hasil dari seleksi benih dari kelompok atau satuan berat benih sehingga layak digunakan dalam penanaman. Pengujian dilakukan dengan cara mengambil 100 benih secara acak

kemudian benih disemai pada *petridish* yang sudah diberikan kapas atau kertas saring yang telah dibasahi dengan air dan dilakukan sebanyak 3 ulangan (lampiran 10. b. 2). Kemudian diamati perkecambahannya setiap hari selama 7 hari dan kemudian dihitung daya kecambahnya, rumus perhitungan daya kecambah:

$$DK = \frac{\text{jumlah biji berkecambah}}{\text{jumlah biji yang dikecambahkan}} \times 100\%$$

Syarat benih dapat digunakan sebagai bahan tanam apabila memiliki daya kecambah lebih dari 80%. Hasil uji daya kecambah benih padi Segreng Handayani diperoleh sebesar 92% sehingga benih layak digunakan sebagai bahan tanam.

c. Pengaturan Kadar Lengas dan Kapasitas Lapang

Mengukur kadar lengas kapasitas lapang (KLKL), dengan cara mengukur kadar lengas kering udara (KLKU) yaitu menimbang botol timbang kosong dan tutupnya (a gram) dan mengambil contoh tanah kering udara kira-kira separuh volume botol timbang lalu ditimbang (b gram). Botol timbang dengan tutup terbuka dimasukkan dalam oven pada suhu 105-110°C selama 4 jam, setelah itu didinginkan dalam desikator lalu ditimbang (c gram), kemudian menghitung KLKU dengan rumus:

$$KLKU = \frac{b - c}{c - a} \times 100\%$$

Kemudian mengukur kadar lengas kapasitas lapang (KLKL) dengan mengambil contoh tanah kering udara secukupnya, dibungkus kain kasa dan direndam dalam gelas piala berisi air selama 15 menit, kemudian digantung (ditiriskan) pada statis selama 24 jam. Kemudian contoh tanah

diambil pada bagian tengahnya, dimasukkan dalam botol timbang kira-kira separuh botol timbang kemudian ditimbang dengan tutupnya (b gram).

Menghitung KLKL dengan rumus : $KLKL = \frac{b - c}{c - a} \times 100\%$

Setelah itu mengukur kebutuhan air tanaman pada kapasitas lapang dengan rumus:

Kebutuhan air pada kapasitas lapang = $\frac{KLKL - KLKU}{100} \times \text{berat tanah}$

Berdasarkan hasil perhitungan, volume kebutuhan air pada kondisi kapasitas lapang sebesar 1660 ml (lampiran 8)

d. Persiapan media tanam dan pemupukan dasar.

Persiapan media tanam diawali dengan mengambil tanah Regosol di lahan *Greenhouse* lalu tanah dikering anginkan untuk kebutuhan persemaian dan penanaman (lampiran 10. b. 3-4). Selanjutnya satu minggu sebelum tanam dilakukan pengisian tanah Regosol sebanyak 7 kg tanah Regosol per polibag dan diberikan pupuk kandang 67,3 g/polibag dan SP-36 0,4 g/polibag sebagai pupuk dasar.

e. Tahap inokulasi *Rhizobakteri* saat persemaian benih.

Formula padat *Rhizobakteri indigenus* Merapi diaplikasikan pada benih padi Segreng Handayani dengan takaran 4-6 g/kg benih atau setara dengan 0,28-0,42 kg/ha (Metting, 1992) (lampiran 6. b). Menurut Rao (1982) jumlah minimum inokulan/mikrobia yang harus terkandung dalam inokulum padat pada 15 hari sebelum diaplikasi ke lapangan adalah 10^7 sel/gram. Perekatan formula pada benih dilakukan dengan membasahi benih padi Segreng Handayani kemudian digunakan bahan perekat sebagai

adhesiv dengan penggunaan sebanyak 0,03% (v/w). Benih yang telah terlapis oleh formula inokulum padat *Rhizobacteri indigenous* Merapi kemudian didiamkan selama 12 jam dimaksudkan agar *Rhizobacteri indigenous* Merapi melekat pada benih (lampiran 10. b. 5-6). Selanjutnya, benih dikeringanginkan dan ditempatkan pada tempat yang teduh agar tidak terkena sinar matahari dan kemudian langsung disemai (lampiran 10. b. 7). Benih yang di semaikan dipelihara dengan cara disiram agar media tempat persemaian selalu lembab. Selama persemaian dilakukan pengamatan terhadap pertumbuhan *Rhizobakteri indigenous* Merapi saat fase persemaian. Pengamatan dilakukan setiap 1 minggu sekali selama 3 minggu (lampiran 10. b. 8).

f. Aplikasi mikoriza saat penanaman

Aplikasi mikoriza saat penanaman dengan cara memasukkan *crude* mikoriza sebanyak 40 gram/pot ke dalam lubang tanam sebelum bibit padi ditanam. Penanaman dilakukan saat padi berumur 3 minggu setelah semai kemudian ditanam dengan cara tanam 2 bibit dalam 1 lubang untuk mengurangi resiko jika ada tanaman yang mati. Penanaman dilakukan dalam polibag dengan jarak tanam 20 cm x 20 cm. Penanaman dilakukan pada sore hari dengan cara membuat lubang tanam yang ada di polibag, kemudian bibit padi dimasukkan ke dalam lubang tanam (lampiran 10. b. 9). Satu minggu setelah tanam dilakukan pemupukan dasar sesuai anjuran kebutuhan pupuk (Lampiran 9).

3. Tahap Ketiga : Pemeliharaan Tanaman

a. Penyiraman.

Pemeliharaan tanaman padi setelah aplikasi inokulum meliputi penyiraman yang dilakukan 1 hari sekali selama 2 minggu dan selanjutnya penyiraman dilakukan sesuai dengan faktor frekuensi penyiraman dan kadar lengas tanah (pengaturan kebutuhan air). Pengaturan kebutuhan air sesuai kadar lengas dengan cara menimbang tanaman setiap 3 hari sekali, 6 hari sekali dan 9 hari sekali yaitu:

$$\text{Jumlah siraman} = \text{KL tanah} - (\text{berat timbangan} - \text{berat tanaman koreksi})$$

Pada penyiraman dengan kondisi pertumbuhan tanaman yang semakin bertambah berat yang akan mengakibatkan evapotranspirasi yang terjadi semakin besar sehingga berat tanaman harus ditimbang menggunakan tanaman koreksi.

b. Pemupukan susulan.

Pemupukan susulan dilakukan pada saat padi berumur 14 HST (Urea 0,67 g dan KCl 0,4 g), 30 HST (Urea 0,67 g) , dan 40 HST (Urea 0,67 g dan KCl 0,4 g) (BPTP Kalbar, 2010). Total kebutuhan pupuk yang digunakan dalam penelitian ini dapat dilihat pada lampiran 7.

c. Penyiangan.

Penyiangan gulma dilakukan setiap ada tumbuhan lain yang tumbuh di polybag dengan cara manual (menggunakan tangan) karena area tanam yang tidak terlalu luas..

d. Pengendalian hama dan penyakit.

Pengendalian hama dan penyakit selama penelitian dilakukan dengan secara manual, tapi ketika serangan hama melewati ambang ekonomi dilakukan pengendalian secara kimiawi menggunakan pestisida spesifik. Hama yang menyerang padi Segreng Handayani selama penelitian berupa hama pemakan daun antara lain ulat penggulung daun (*Lamprosema indicata*), hama putih (*Nymphula depunctalis*) dan belalang (*Oxya chinensis*). Ulat penggulung menyebabkan kerusakan daun padi Segreng pada fase vegetatif dan dikendalikan secara manual. Sedangkan hama putih dan belalang pengendaliannya dilakukan dengan penyemprotan menggunakan Decis dengan dosis 1-1,5 ml/l.

4. Tahap Keempat : Pengamatan dan Panen

Pengamatan Padi Segreng dilakukan dari minggu ke-1 hingga panen. Panen didasarkan pada hasil pengamatan lapangan yang menunjukkan bahwa padi telah menguning 95% pada setiap unit perakuan dan merunduk karena malai dari padi telah terisi sehingga mengakibatkan banyak gabah yang rontok saat dipanen. Cara pemanenan yaitu dengan memotong padi pertanaman pada pot dengan gunting/*cutter* secara hati hati.

E. Variabel Pengamatan

Dalam penelitian ini variabel pengamatan meliputi pertumbuhan bakteri, pertumbuhan vegetatif dan pertumbuhan generatif. Pengamatan parameter pertumbuhan dan hasil tanaman dilakukan mulai dari minggu 1 sampai minggu ke 8.

1. Pertumbuhan *Rhizobakteri indigenous* Merapi

a. Viabilitas total *Rhizobakteri indigenous* Merapi dan isolat MB dan MD selama penyimpanan (cfu/ml)

Pengujian dilakukan pada hari ke-7 setelah penyimpanan dengan menggunakan medium LBA dengan kadar NaCl 0,2 M. Satu gram sampel diencerkan pada botol suntik (10^{-2} ; 10^{-4} ; 10^{-6}) dan 2 tabung rekasi (10^{-7} ; 10^{-8}), sehingga didapat seri pengenceran hingga 10^{-8} . Setiap 0,1 ml pada seri 10^{-6} ; 10^{-7} ; 10^{-8} diinokulasikan dengan metode permukaan atau *surface plating method* dan setiap seri pengenceran yang diujikan (10^{-7} ; 10^{-8} ; 10^{-9}) dengan seri pengenceran 10^{-7} ; 10^{-8} ; 10^{-9} sebanyak 3 kali ulangan. Uji kemampuan hidup mikroba berdasarkan daya viabilitas dan jumlah koloni populasi bakteri. Penghitungan populasi bakteri ini dengan metode *Total Plate Count* (TPC). Jumlah bakteri per mL dapat ditentukan dengan menghitung koloni yang tumbuh dari masing-masing pengenceran. Penentuan jumlah bakteri per mililiter dengan menggunakan rumus :

$$\text{Jumlah bakteri per ml sampel (CFU/ml)} = \frac{\text{Jumlah koloni}}{\text{Faktor pengenceran}}$$

Penentuan jumlah jumlah bakteri per mililiter dengan menggunakan cara TPC harus memenuhi syarat sebagai berikut:

- i. Jumlah koloni tiap cawan petri antara 30 – 300 koloni
- ii. Tidak ada koloni yang menutup lebih besar dari setengah luas cawan petri (*Spreader*)
- iii. Perbandingan jumlah koloni dari pengenceran yang berturut-turut antara pengenceran yang lebih besar dengan pengenceran

sebelumnya. Jika sama atau lebih kecil dari 2 maka hasilnya dirata-rata, dan jika lebih besar dari 2 maka yang dipakai adalah jumlah koloni dari hasil pengenceran sebelumnya

- iv. Jika dengan ulangan setelah memenuhi syarat hasilnya dirata-rata (Agung_Astuti dkk, 2014).

2. Pengamatan Pertumbuhan Tanaman

a. Tinggi tanaman (cm)

Tinggi tanaman sampel diukur dari pangkal batang atau permukaan tanah sampai dengan ujung daun yang tertinggi, alat yang digunakan adalah penggaris dengan satuan cm. Pengamatan dilakukan setiap minggu hingga minggu ke-8 pada tanaman sampel atau berhenti ketika titik maksimum perkembangan vegetatif yang ditandai dengan keluarnya malai. Visualisasi tinggi tanaman pada minggu ke-8 ditunjuk pada lampiran 10. b. 11.

b. Jumlah anakan (satuan)

Pengamatan dilakukan dengan menghitung keseluruhan jumlah anakan dinyatakan dalam satuan. Diamati setiap satu minggu sekali sampai minggu ke-7 pada tanaman sampel.

3. Pengamatan Tanaman Korban Minggu ke-2, ke-5 dan ke-8

a. Dinamika populasi total bakteri selama masa pembibitan dan masa tanam (cfu/ml)

Pengamatan dilakukan pada minggu ke-1 dan 3 pembibitan dan minggu ke-2, 5 dan 8 setelah tanam dengan menggunakan medium LBA dengan kadar NaCl 0,1 M. Sampel formula diinokulasikan dengan *surface plating method* dan setiap seri pengenceran yang diujikan (10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9}) dibuat

ulangan sebanyak 3 kali. Dinamika *Rhizobakteri indigenus* Merapi didasarkan pada populasi koloni bakteri dengan menggunakan metode TPC (*Total Plate Count*) (lampiran 10. b. 10), dengan syarat:

- i. Jumlah koloni tiap cawan petri antara 30 – 300 koloni
- ii. Tidak ada koloni yang menutup lebih besar dari setengah luas cawan petri (*Spreader*)
- iii. Perbandingan jumlah koloni dari pengenceran yang berturut-turut antara pengenceran yang lebih besar dengan pengenceran sebelumnya. Jika sama atau lebih kecil dari 2 maka hasilnya dirata-rata, dan jika lebih besar dari 2 maka yang dipakai adalah jumlah koloni dari hasil pengenceran sebelumnya
- iv. Jika dengan ulangan setelah memenuhi syarat hasilnya dirata-rata (Agung_Astuti dkk., 2014).

b. Pengaruh inokulasi MVA

1. Persentase infeksi MVA (%)

Pengamatan dilakukan dengan pengecatan pada akar lalu diamati dengan mikroskop, dengan cara sebagai berikut:

- i. Mengambil sampel akar sesuai perlakuan lalu dibersihkan dari segala kotoran dengan menggunakan air, kemudian akar dipotong dengan panjang 0,5-1 cm
- ii. Akar yang telah dipotong dimasukkan dalam botol reaksi dan diberi 2 ml KOH 10% sehingga akar tercelup semua dan dibiarkan selama 24 jam. Setelah itu akar dibilas dengan air bersih

- iii. 2 ml HCl 1% ditambahkan pada botol hingga tercelup selama 1 jam. Setelah itu larutan dibuang
- iv. 2 ml Cat Acid-fuchin diberikan pada botol reaksi selama 10-60 menit
- v. 20 potongan akar diambil dan diatur dalam gelas benda lalu ditutup dengan gelas penutup dan diamati dengan mikroskop, lalu dihitung persentase infeksi dengan rumus:

Persentase infeksi=(jumlah akar terinfeksi)/(jumlah akar total) x 100%

2. Jumlah Spora

Pengamatan spora dilakukan dengan menggunakan metode penyaringan basah dan dekantasi, dengan cara sebagai berikut:

- i. Mengambil sampel tanah perlakuan inokulum mikoriza pada pot penanaman sebanyak 250 gram kemudian dilarutkan dalam 1 liter aquades (1:4) dan biarkan beberapa detik agar partikel kasar mengendap
- ii. Tuang cairan (dekantasi) melalui saringan kasar 90 MM/170 *mesh* (untuk memisahkan partikel kasar. Tampung cairan yang lolos pada saringan tersebut. Cuci saringan dengan air mengalir agar semua partikel kecil lolos saringan
- iii. Berikan air lagi pada contoh tanah dan lakukan kembali seperti langkah ii dan iii
- iv. Cairan yang diperoleh pada ii dan iii disaring dengan saringan 38 MM/400 *mesh*

- v. Cuci bahan yang tertahan pada saringan dengan air mengalir agar semua bahan yang berupa koloidal lolos saringan
- vi. Pindahkan bahan yang tertahan pada saringan ke dalam cawan petri, selanjutnya teteskan (1-2 tetes) cairan ke *haemocytometer*
- vii. Amati jumlah spora yang ada pada kotak sampel *haemocytometer* pada mikroskop dengan perbesaran 400 kali, kemudian masukkan dalam rumus:

$$\text{Jumlah Spora} = \frac{1000 \text{ ml}}{0,0025 \text{ mm}^2 \times 0,1 \text{ mm}} \times a \times \text{faktor pengenceran}$$

Keterangan:

a=jumlah spora teramati pada *haemocytometer*

c. Proliferasi akar (+)

Proliferasi akar diketahui dengan mengamati percabangan perakaran tanaman padi. Pengamatan dilakukan pada 1 tanaman korban per perlakuan pada minggu ke-2, ke-5 dan ke-8 setelah tanam.

Tabel 1. Skoring Proliferasi Akar Padi Segreng Handayani

Skoring	Keterangan
++++	Memiliki percabangan yang rumit serta banyak
+++	Memiliki percabangan yang cukup banyak
++	Memiliki percabangan akar yang sedang
+	Memiliki percabangan akar yang sedikit

d. Panjang akar (cm)

Panjang akar diukur menggunakan penggaris mulai dari pangkal tanaman hingga ujung akar terpanjang. Pengamatan panjang akar dilakukan pada minggu ke- 2, 5 dan 8 setelah tanam pada 3 tanaman korban per perlakuan.

e. Berat segar dan kering akar (g)

Pengamatan berat segar akar dilakukan dengan cara mencabut tanaman sampel kemudian menimbang bagian akar yang sudah dibersihkan dari tanahnya. Akar ditimbang menggunakan timbangan analitik, dan dinyatakan dalam satuan gram. Selanjutnya akar dijemur di bawah sinar matahari selama 24 jam dan dioven pada suhu 60°C sampai beratnya konstan. Pengamatan berat kering akar dilakukan dengan cara menimbang akar yang sudah kering oven menggunakan timbangan analitik dan dinyatakan dalam satuan gram. Penghitungan berat segar dan kering akar dilakukan pada tanaman sampel minggu ke-8

f. Berat segar dan kering tajuk (g)

Pengamatan berat segar tajuk dilakukan dengan cara mencabut tanaman korban kemudian menimbang bagian daun dan batang. Tajuk ditimbang menggunakan timbangan analitik, dan dinyatakan dalam satuan gram. Selanjutnya tajuk dijemur di bawah sinar matahari selama 24 jam dan dioven pada suhu 60°C sampai beratnya konstan. Pengamatan berat kering tajuk dilakukan dengan cara menimbang daun dan batang yang sudah kering oven menggunakan timbangan analitik dan dinyatakan dalam satuan gram. Penghitungan berat segar dan kering tajuk dilakukan pada tanaman korban minggu ke-2, ke- 5 dan ke-8.

4. Pengamatan Tanaman Sampel menjelang panen dan setelah panen

a. Umur berbunga(%)

Pengamatan menentukan umur berbunga dilakukan saat padi mengalami pembungaan lebih dari 50%.

b. Jumlah malai/rumpun (satuan)

Menghitung jumlah malai dari tanaman sampel, dilakukan dengan menghitung semua anakan yang ada dalam rumpun tersebut, baik yang berisi maupun yang hampa. Penghitungan jumlah gabah per malai ini dilakukan pada tanaman sampel pada waktu panen. Alat yang digunakan dalam pengamatan adalah bolpoint dan kertas.

c. Berat gabah kering per rumpun (g)

Menghitung semua berat biji dalam satu rumpun padi dari 3 tanaman sampel yang dilakukan setelah kering matahari dengan cara menimbang biji per rumpun dan dinyatakan dalam gram.

d. Berat 100 biji (g)

Pengamatan berat 100 biji dilakukan dengan cara menimbang berat gabah 100 biji dari setiap tanaman sampel masing-masing perlakuan yang telah dikeringkan, kemudian mengukur kadar airnya dan selanjutnya dikonversikan pada kadar air 14% dengan rumus:

$$a = \frac{(100 - K_a)}{100 - 14\%} \times b$$

a= berat 100 biji pada kadar air 14 %

b= berat 100 biji pada kadar air terukur

e. Hasil Gabah (ton/ha)

Pengamatan dilakukan pada saat panen dari tanaman sampel tiap perlakuan yaitu dengan cara mengeringkan butir gabah selama 3 hari di dalam *Greenhouse* (lampiran 10. b. 12). Selanjutnya gabah ditimbang dan diukur kadar airnya kemudian dikonversikan dalam ton/ha pada kadar air 14% dengan rumus :

$$H = \frac{A}{B} \times \frac{(100 - K_a)}{100 - 14\%} \times C \text{ kg}$$

H = hasil gabah/ha pada kadar air 14%
 A = luas lahan dalam satuan ha (10.000 m²)
 B = jarak tanam (20x20 cm=0,04m²)
 C = berat biji per rumpun (g)
 Ka= kadar air biji terukur

F. Analisis Data

Data hasil pengamatan secara periodik disajikan dalam bentuk histogram dan grafik, sedangkan hasil akhir dianalisis sidik ragam (*analysis of variance*) menggunakan uji F pada tingkat kesalahan α 5%. Untuk perlakuan yang berbeda nyata diuji lebih lanjut dengan uji jarak berganda Duncan (DMRT).