

III. TATA CARA PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Agrobioteknologi, Laboratorium Penelitian dan lahan percobaan Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Yogyakarta pada bulan September 2017 sampai Desember 2017.

B. Bahan dan Alat Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu Benih Jagung, bakteri pelarut fosfat yang sudah diperbanyak, tulang ayam, Medium Pikovkaya's, Tanah Regosol sebagai media tanam dan pupuk anorganik urea, SP-36 dan KCl.

Alat yang digunakan adalah saringan, tabung reaksi, tabung ukur, *bekerglas*, cawan petri, *coloni counter*, *rotary shaker*, erlenmeyer, mikro pipet, timbangan analitik, jarum ose, *driglasky*, pinset, pipet ukur, *blue and yellow tip*, autoklaf, oven, mikroskop, lampu bunsen, pH stik, label, spidol, cutter, stapler, gunting, karet gelang, plastik klep, timbangan (max 15 kg), penggaris, meteran, polybag ukuran 40 cm x 40 cm (15 kg), karung plastik, cetok, gembor plastik, nampan, ayakan pasir, semprotan pestisida, dan plastik sungkup.

C. Metode Penelitian

Penelitian dilakukan dengan metode percobaan lapangan, menggunakan rancangan percobaan faktorial (5 x 2) yang disusun dalam Rancangan Acak Lengkap

(RAL). Faktor pertama terdiri dari 5 imbangan pupuk fosfat dan tepung tulang ayam yaitu:

A = Pupuk SP-36 100% + tepung tulang ayam 0%

B = Pupuk SP-36 75% + tepung tulang ayam 25%

C = Pupuk SP-36 50% + tepung tulang ayam 50%

D = Pupuk SP-36 25% + tepung tulang ayam 75%

E = Pupuk SP-36 0% + tepung tulang ayam 100%

Faktor ke dua adalah inokulasi bakteri pelarut fosfat terdiri dari 2 aras yaitu:

P = Inokulasi bakteri pelarut fosfat

Q = Tanpa inokulasi bakteri pelarut fosfat

Diperoleh 10 kombinasi perlakuan masing-masing kombinasi perlakuan diulang sebanyak 3 kali, dengan demikian diperoleh 30 unit percobaan. Setiap unit percobaan digunakan 3 tanaman sampel, 2 tanaman korban sehingga terdapat 150 polibag (*Layout* pada lampiran. 1)

D. Cara Penelitian

1. Tahap pertama pembuatan inokulum Bakteri Pelarut Fosfat

a. Sterilisasi alat dan bahan.

Seluruh alat yang digunakan untuk pembuatan inokulum disterilkan dengan menggunakan autoklaf bertemperatur 121°C tekanan 1 atm selama 30 menit. Untuk bahan yang digunakan dalam pembuatan inokulum juga perlu disterilisasi dengan autoklaf 121°C tekanan 1 atm selama 15 menit.

b. Pembuatan media Pikovskaya

Dalam setiap 1 liter medium Pikovskaya dibutuhkan bahan-bahan berupa $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 5 g, Khamir extract 0,5 g, KCl 0,2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g, $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2,5 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5 g, glukosa 10 g, Agar 15 g (Untuk Nutrien Agar) dan Aquades 1000 ml. Panaskan seluruh bahan kecuali agar untuk Nutrien Cair hingga homogen dan ber-pH 6,5-7,2. Pengecekan pH digunakan pH stik. Untuk membuat NA miring, masukkan NA pada tabung reaksi sebanyak 5 ml setiap tabung reaksi. Untuk membuat NC, masukkan NC pada tabung reaksi sebanyak 10 ml setiap tabung reaksi. Seluruh media disterilkan dengan menggunakan autoklaf bertemperatur 121°C , 1 atm selama 15 menit. Media NA di tabung reaksi kemudian diletakkan dengan kemiringan $30-45^\circ$.

c. Identifikasi dan karakterisasi isolat Bakteri Pelarut Fosfat

Identifikasi isolat berasal dari beberapa sumber isolat yaitu dari tanah perakaran jagung, tanah kuburan dan perakaran pisang (Lampiran 6.a). Identifikasi isolat BPF dilakukan dengan menginokulasikan isolat ke dalam medium Pikovskaya dengan dan goresan (*streak plating method*) dari pengenceran 10^{-2} . Dalam inokulasi ini dilakukan 2 kali ulangan setiap isolat. Kemudian inkubasi selama 48 jam hingga didapatkan koloni tunggal. Dari koloni tunggal tersebut, diamati karakteristiknya dengan menggunakan mikroskop. Pengamatan yang dilakukan terhadap lingkaran bening, diameter, bentuk koloni, bentuk tepi, elevasi, struktur dalam koloni.

d. Pembuatan biakan murni isolat BPF untuk kultur stok.

BPF dimurnikan dengan cara mengambil satu ose isolat hasil identifikasi. Isolat diinokulasikan pada dua NA miring dengan metode goresan (*streak plating method*) kemudian diinkubasi selama 48 jam. Apabila sudah seragam hasilnya, maka dianggap murni. Selanjutnya inokulasikan kultur murni pada NC (10 ml tiap tabung reaksi) dan diinkubasi 48 jam.

e. Perbanyak dan pembuatan starter campuran isolat

Hasil inkubasi masing masing isolat pada NC diambil 2 x 10 ml dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer steril berukuran 250 ml yang berisi 100 ml NC kemudian diinkubasi pada *rotary shaker* 120 rpm selama 48 jam, hingga populasi BPF mencapai 10^8 - 10^9 CFU/ml (Lampiran 6.c). Diinokulasikan 10 ml per tanaman sehingga diperlukan 750 ml.

2. Tahap kedua Penyiapan bahan

a. Pembuatan Tepung Tulang Ayam

Pembuatan tepung tulang ayam dilakukan dengan menyiapkan tulang ayam yang diperoleh dari *Greenhouse* Fakultas Pertanian UMY. (lampiran 6.g) Selanjutnya tulang ayam dikeringkan menggunakan sinar matahari kurang lebih 2-3 hari. Tahap selanjutnya tulang ayam yang sudah kering digiling menggunakan mesin penggiling

tulang. (lampiran 6.h) Selanjutnya didapatkan tepung tulang ayam yang akan digunakan. (lampiran 6.i)

b. Persiapan Media Tanam dan Perlakuan Pupuk Fosfat SP-36 dengan Tepung Tulang Ayam

Media tanam yang akan digunakan merupakan tanah Regosol. Media tanam tanah Regosol diambil dari daerah sekitar kampus UMY secara komposit. Teknik pengambilan dilakukan dengan cara membersihkan bagian permukaan tanah Regosol terlebih dahulu dan mengambil sampel tanah Regosol dari kedalaman 0-30 cm. Pengambilan dalam kedalaman tanah ini menyesuaikan dengan kedalaman akar tanaman jagung dan mengambil sesuai dengan kebutuhan untuk penanaman. Tanah Regosol yang akan digunakan terlebih dahulu disaring menggunakan ayakan. Setelah disaring dengan ayakan, tanah Regosol dikeringkan terlebih dahulu dengan dijemur pada sinar matahari selama 3 hari. Tanah Regosol yang telah diayak kemudian dicampur dengan pupuk kandang dan dimasukkan ke dalam polybag yang berukuran 40 cm x 40 cm (13 kg).

Perlakuan pupuk dasar dengan dosis pupuk kandang yang digunakan yaitu sebanyak 20 ton per hektar. Selain itu, juga dicampur dengan $\frac{1}{2}$ dosis pupuk N, pupuk K dan seluruh imbangannya pupuk P dengan tepung tulang ayam (lampiran 6.j) sesuai dengan perhitungan pupuk setiap perlakuan (Lampiran 2). Media tanam yang telah siap kemudian dimasukkan dalam polybag yang telah diberi label untuk masing-masing perlakuan. Media tanam kemudian didiamkan selama 1 minggu sebelum dilakukan penanaman benih tanaman jagung.

3. Penanaman Jagung dan aplikasi Bakteri Pelarut Fosfat

Penanaman dilakukan dengan cara membuat lubang tanam yang ada di polybag dengan kedalamannya \pm 4 cm dari permukaan tanah. Jarak tanam yang digunakan adalah 75 x 20 cm. Setiap lubang tanam diberikan 2-3 benih jagung untuk mengurangi resiko jika tanaman mati. Selanjutnya aplikasi bakteri pelarut fosfat dengan inokulasi 10 ml inokulum bakteri pelarut fosfat (BPF)/polybag pada lubang tanam.

4. Tahap Pemeliharaan Tanaman

Penyiraman dilakukan secara intensif pada fase perkecambahan (satu hari dua kali) setiap pagi dan sore. kemudian dilanjutkan pada fase vegetatif satu hari sekali.

Pemupukan pada tanaman jagung dilakukan kali, yaitu pemupukan dasar dan pemupukan susulan. Pemupukan dasar yang diberikan yaitu berupa pupuk kandang sebanyak 300 g/tanaman, 1/3 dosis pupuk N (Urea) sebanyak 1,5 g/tanaman, dan imbalan pupuk P (SP-36) dengan tepung tulang ayam pupuk susulan pertama 28 HST diberikan 1/3 urea sebanyak 1,5 gram/tanaman dan KCl 1,75 gram/tanaman dan susulan kedua 45 HST diberikan 1/3 urea 1,5 gram dan 1/2 KCl 1,75 gram (perhitungan pada lampiran 2).

5. Pengendalian OPT (Organisme Pengganggu Tanaman)

Pengendalian OPT yang dilakukan berupa pengendalian hama, gulma dan penyakit. Pengendalian terhadap hama dilakukan dengan cara teknis dan juga secara kimiawi

bergantung pada serangan hama dan besar kerusakannya. Apabila serangan dan kerusakan tanaman telah melebihi ambang batas ekonomi maka dilakukan pengendalian secara kimiawi. Pengendalian terhadap gulma dilakukan dengan cara penyiangan (pengendalian secara teknis). Pengendalian terhadap penyakit dilakukan apabila tanaman terserang penyakit dengan cara pengendalian secara kimiawi yang menyesuaikan dengan jenis penyakit yang menyerangnya.

- a. **Belalang** merupakan hama yang memiliki daya rusak yang cukup besar. Hama ini dapat berpindah dari satu tanaman ke tanaman lain dengan cepat. Gejala yang ditimbulkan berupa rusaknya pinggiran daun dengan luka bergerigi tidak beraturan. Serangan yang hebat dapat mengakibatkan penurunan produksi tongkol jagung. pengendalian dilakukan dengan cara menangkap kemudian membunuhnya. Pengendalian secara kimiawi dilakukan dengan menggunakan insektisida DHARMABAS 500 EC yang disemprotkan ke seluruh daun dan pucuk daun.
- b. **Penggerek batang** (*ostrinia furnacalis*) kerusakan yang ditimbulkan pada setiap bagian tanaman jagung yaitu lubang kecil pada daun, lubang gorokan pada batang, bunga jantan, atau pangkal tongkol, batang dan tassel yang mudah patah, dan tumpukan tassel yang rusak. pengendalian insektisida DHARMABAS 500 EC
- c. **Belalang daun** (*Locusta migratoria*). gejala serangan memakan duntanaman, serngan yang parah bisa menghabiskan seluruh daun tanaman

dan batang-batang muda. Pengendalian dengan penyemprotan insektisida DHARMABAS 500 EC

- d. **Penyakit Bulai** (*Corn Downy Mildew*) merupakan penyakit utama pada tanaman jagung yang disebabkan oleh cendawan *Peronosclerospora maydis*. Faktor yang memicu serangan penyakit ini adalah suhu yang tinggi sampai 30°C, pemberian Urea yang berlebihan, dan turunnya hujan yang sesekali. Penyakit ini dapat ditularkan melalui benih atau spora yang terbawa angin. Penyemprotan dengan fungisida sistemik DEMORF 60WP.

6. Pemanenan Tongkol Jagung Manis

Pemanenan dilakukan pada saat jagung telah mencapai masak fisiologis yaitu berkisar 70-80 hari setelah tanam tergantung dari jenis varietas yang digunakan. Dipanen ketika masak susu (lampiran 6.p)

E. Parameter

1. Identifikasi, Uji Daya Pelarutan P dan Perbanyakan

a. Diameter

Identifikasi bakteri pelarut fosfat salah satunya dengan pengukuran diameter zona bening pada bakteri dan koloni bakteri. Pengamatan ini dilakukan untuk mengetahui seberapa besar kemampuan BPF dalam melarutkan fosfat. Pemilihan isolat dilihat dari ukuran diameter yang paling besar.

b. Karakterisasi

Karakterisasi pada pengamatan ini bertujuan untuk mengetahui jenis BPF yang akan digunakan untuk penelitian. Karakterisasi ini meliputi jenis-jenis elevasi, bentuk koloni, bentuk tepi, struktur dalam dan cat gram.

c. Jumlah Bakteri Pelarut Fosfat pada inokulum BPF

Pengamatan jumlah BPF pada inokulum dilakukan setelah diinkubasi pada inokulum selama 7 hari. Kemudian diambil dan diencerkan pada botol suntik (10^{-2} ; 10^{-4} ; 10^{-6}) dan 2 tabung reaksi (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* pada media NA dan dilakukan sebanyak 3 kali ulangan. Jumlah populasi BPF didasarkan pada populasi koloni bakteri dengan menggunakan metode TPC (*Total Plate Count*), 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.

2. Dinamika populasi Bakteri Pelarut Fosfat di Rizosfer Jagung Manis

Jumlah Populasi Bakteri Pelarut Fosfat pada tanah. (Lampiran 6.n) Dilakukan pada minggu ke- 3, 6 dan 9 setelah tanam dengan cara menyemprot rhizosfer tanaman dengan aquades, lalu diencerkan pada botol suntik (10^{-2} ; 10^{-4} ; 10^{-6}) dan 2 tabung reaksi (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* pada media NA dan dilakukan sebanyak 3 kali ulangan. (lampiran 6.e) Jumlah populasi BPF didasarkan pada populasi koloni bakteri dengan menggunakan metode TPC (*Total Plate Count*), dengan syarat:

- a. Jumlah koloni tiap cawan petri antara 30 – 300 koloni
 - i. Tidak ada koloni yang menutup lebih besar dari setengah luas cawan petri (*Spreader*)
 - ii. 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
 - iii. Jika dengan ulangan setelah memenuhi syarat hasilnya dirata-rata

3. Pertumbuhan Tanaman

- a. **Panjang akar (cm)**

Panjang akar diamati pada minggu terakhir setelah panen. Pengamatan dilakukan dengan membersihkan akar tanaman jagung menggunakan air sampai bersih kemudian diukur dari bagian pangkal tajuk sampai ke bagian akar paling bawah dengan menggunakan mistar.

b. Bobot Segar Akar (gram)

Pengamatan bobot segar akar dilakukan pada saat tanaman berumur 70 hari dengan cara menimbang semua bagian akar tanaman jagung yang telah dipisahkan dari bagian tajuk tanamannya menggunakan timbangan analitik.

c. Bobot Kering Akar (cm)

Pengamatan bobot kering akar dilakukan pada saat tanaman berumur 70 hari dengan cara menimbang semua bagian akar tanaman jagung yang telah dikering anginkan terlebih dahulu kemudian dioven hingga mencapai bobot konstan. Selanjutnya ditimbang dengan timbangan analitik.

d. Tinggi tanaman Jagung (cm)

Pengamatan tinggi tanaman dilakukan setiap satu minggu sekali dimulai sejak tanaman berumur satu minggu setelah tanam sampai tanaman berumur 70 hari. Tinggi tanaman diukur dengan cara mengukur dari pangkal batang hingga titik tumbuh tanaman jagung. Pengamatan tinggi tanaman ini dilakukan dengan menggunakan mistar. (lampiran 6.m)

e. Bobot Segar Tanaman (gram)

Pengamatan bobot segar tanaman dilakukan pada saat tanaman berumur 70 hari dengan cara menimbang semua bagian tanaman percobaan menggunakan timbangan analitik.

f. Bobot Kering Tanaman (gram)

Pengamatan bobot kering tanaman dilakukan pada saat tanaman berumur 70 hari dengan cara menimbang semua bagian tanaman jagung yang telah dijemur di bawah sinar matahari terlebih dahulu kemudian setelah kering, dioven hingga mencapai bobot konstan. Selanjutnya tanaman yang telah dioven tersebut ditimbang menggunakan timbangan analitik.

g. Waktu pembungaan (hari)

Pengamatan dilakukan pada waktu tanaman sudah memasuki masa generative. Hal ini penting untuk diamati karena fase generative suatu tanaman diamati dengan munculnya kuncup bunga pada tanaman tersebut.

h. Jumlah Daun (helai)

Jumlah daun diamati setiap seminggu sekali sampai tanaman menghasilkan yaitu minggu ke sembilan.

i. Luas daun

Luas daun diukur dengan menggunakan LAM (*Leaf Area Meter*). Daun yang akan diukur, dipotong terlebih dahulu, lalu diukur menggunakan LAM dan dinyatakan dalam satuan cm^2 . Pengamatan dilakukan pada minggu ke-3, 6 dan 9 setelah tanam pada tanaman korban.

1. Hasil tanaman jagung

a. Bobot Tongkol Basah (gram)/tanaman

Pengamatan bobot tongkol basah dilakukan pada saat tanaman berumur 70 hari dengan cara menimbang tongkol yang ada pada masing-masing tanaman percobaan menggunakan timbangan.

b. Bobot Tongkol tanpa kelobot (gram)

Pengamatan bobot tongkol tanpa kelobot dilakukan pada saat tanaman berumur 70 hari dengan cara menimbang tongkol yang sudah dibersihkan dari kelobot pada masing-masing tanaman percobaan menggunakan timbangan.

c. Diameter Tongkol (cm)

Pengamatan diameter tongkol dilakukan pada saat tanaman berumur 70 hari dengan cara mengukurnya menggunakan jangka sorong pada tongkol jagung yang dihasilkan dari masing-masing tanaman percobaan.

d. Panjang Tongkol (cm)

Pengamatan panjang tongkol dilakukan pada saat tanaman berumur 70 hari dengan cara mengukurnya menggunakan penggaris pada pangkal tongkol jagung sampai ujung tongkol yang dihasilkan dari masing-masing tanaman percobaan.

e. Jumlah baris biji per tongkol

Pengamatan diameter jumlah baris biji per tongkol dilakukan pada saat tanaman berumur 70 hari dengan cara menghitung jumlah baris pada tongkol jagung yang sudah dibersihkan dari kelobotnya.

F. Analisis Data

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