

### III. TATA CARA PENELITIAN



#### A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Maret hingga Juli 2014 di Laboratorium Agrobioteknologi dan Lahan Penelitian Fakultas Pertanian UMY di Jl. Lingkar Barat, Tamantirto, Kecamatan Kasihan, Kabupaten Bantul, DIY.

#### B. Bahan dan Alat Penelitian

##### 1. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu : benih padi IR64, pupuk kandang, *Rhizobacteri indigenous* Merapi isolat MA, isolat MB, isolat MD (koleksi Ir. Agung Astuti MSi.), media *plating* (LBA) media perbanyakan isolat (LBC), media ekstrak tanah (MET), limbah tahu, air rendaman kedelai, ekstrak kentang, *taoge*, air kelapa, tanah Regosol, perekat Stiker , pupuk Urea, SP-36, dan KCl.

##### 2. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu: botol formula, botol perendam, alat steril perbanyakan isolat (tabung reaksi, Erlenmeyer dan *shaker*), besek pembibitan, perlengkapan pengolahan sawah, alat perawatan tanaman (penyiang gulma), perlengkapan pengamatan pertumbuhan isolat (*petridish* dan coloni *counter*) dan perlengkapan pengamatan pertumbuhan dan hasil tanaman padi (penggaris dan timbangan analitik).

### C. Metode Penelitian

Penelitian dilaksanakan dengan metode percobaan eksperimen yang terdiri dari dua tahap, yaitu : tahap 1 adalah pengembangan *Rhizobacteri* pada berbagai formulasi media cair dan tahap 2 adalah aplikasi berbagai formulasi cair pada benih dan bibit.

#### **Tahap 1 Pengembangan *Rhizobacteri indigenous* Merapi pada berbagai formulasi media cair**

Penelitian dilakukan dengan rancangan percobaan faktor tunggal, yang disusun dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL). Perlakuan yang diujikan adalah formulasi media cair untuk mengembangkan *Rhizobacteri indigenous* Merapi yang terdiri dari 4 formulasi , yaitu :

A = Media Ekstrak Tanah

B = Air kelapa 50%+Air rendaman kedelai50%

C = Limbah Tahu 47% + Kentang 6% + ekstrak *taoge* 47%

D = Media Luria Bakteri Cair sebagai Kontrol

Masing-masing perlakuan diulang 3 kali, sehingga diperoleh 12 unit percobaan dan didiamkan selama 3 minggu dan diamati kecepatan selnya (*lay out* pada lampiran 1a).

#### **Tahap 2 Aplikasi berbagai formula cair *Rhizobacteri indigenous* Merapi pada bibit dan benih padi IR64**

Penelitian disusun dengan Rancangan Acak Kelompok Lengkap (RAKL) dengan rancangan percobaan faktorial (4x2). Faktor 1 adalah formulasi cair yang terdiri dari 4 aras :

- A = Media Ekstrak Tanah
- B = Air kelapa 50%+Air rendaman kedelai50%
- C = Limbah Tahu 47% + Kentang 6% + ekstrak *taoge* 47%
- D = Media Luria Bakteri Cair sebagai Kontrol

Faktor 2 adalah metode aplikasi, yang terdiri dari 2 aras:

- BH = Aplikasi pada benih
- BT = Aplikasi pada bibit

Total diperoleh 8 kombinasi perlakuan (ABH, ABT, BBH, BT, CBH, CBT, DBH, DBT) yang masing-masing perlakuan diulangi 3 kali, sehingga diperoleh 24 unit perlakuan. Setiap unit perlakuan terdapat 3 tanaman sampel dan 3 tanaman korban (*lay out* pada lampiran 1b)

#### D. Cara Penelitian

##### 1. Tahap 1. Pengembangan *Rhizobacteri indigenus* Merapi pada berbagai formulasi media cair

###### a) Sterilisasi alat

Alat-alat yang terbuat dari logam dan gelas dicuci bersih kemudian setelah kering alat-alat tersebut dibungkus menggunakan kertas payung. Alat-alat dari logam dan kaca yang telah terbungkus kertas payung kemudian disterilkan dalam autoklaf dengan temperatur 121°C bertekanan 1 atm selama 30 menit.

**b) Pembuatan medium untuk perbanyakkan isolat *Rhizobacteri indigenus* Merapi**

Medium perbanyakkan yang digunakan yaitu Luria Bertani Cair (LBC) sesuai kebutuhan (lampiran 3). Seluruh bahan untuk membuat medium LBC dilarutkan dengan air di dalam erlenmeyer sebanyak 330 ml kemudian dipanaskan hingga mendidih agar seluruh bahan larut dengan air. Setelah seluruh bahan homogen, kemudian dilakukan pengecekan pH menggunakan kertas lakmus. pH yang dikehendaki ialah antara 6,5-7,2. Medium yang telah siap kemudian disterilkan menggunakan autoklaf pada temperatur 121°C tekanan 1 atm selama 15-20 menit. Medium LBC steril kemudian dimasukkan kedalam tabung reaksi steril sebanyak 10 ml.

**c) Identifikasi koloni dan sel isolat MA, MB dan MD *Rhizobacteri indigenus* Merapi**

Identifikasi koloni dilakukan dengan cara menumbuhkan isolat MA, MB dan MD dari hasil pembiakan kultur murni pada medium LBA menggunakan metode permukaan (*surface plating method*). Pada tahap ini yang perlu diamati ialah warna, diameter, bentuk koloni, bentuk tepi, elevasi dan struktur dalam koloni (Lay, 1994). Warna, bentuk koloni, bentuk tepi, elevasi dan struktur dalam koloni yang diamati haruslah sama dengan karakterisasi koloni isolat *Rhizobacteri indigenus* Merapi yang telah dilakukan oleh peneliti sebelumnya (Lampiran 2) untuk memastikan bahwa tidak terjadi kontaminasi pada isolat yang digunakan untuk pembuatan biakan murni.

**d) Pembuatan biakan murni Isolat *Rhizobacteri indigenus* Merapi**

Biakan murni *Rhizobacteri indigenus* Merapi ialah biakan yang mengandung satu macam bakteri dan dapat dibiakan menggunakan bahan cair atau padat (Lay, 1994). Hasil penelitian yang dilakukan oleh Agung-Astuti (2013) didapat 4 isolat *Rhizobacteri indigenus* Merapi yaitu MA, MB, MC dan MD. Ke empat isolat memiliki kemampuan melarutkan Phospat, Nitrifikasi dan Amonifikasi dan tidak mampu memfiksasi N, akan tetapi isolat MA, MB dan MD memiliki kemampuan melarutkan Phospat, Nitrifikasi dan Amonifikasi yang paling baik dibandingkan dengan isolat MC, sehingga dalam penelitian akan digunakan 3 isolat yaitu MA, MB dan MD. Biakan murni akan dibuat dari isolat MA, MB dan MD pada medium Luria Bertani Agar miring.

Masing-masing isolat *Rhizobacteri indigenus* Merapi dimurnikan dengan cara mengambil 1 ose isolat bakteri kemudian ditumbuhkan pada medium LBA miring dan diinkubasi selama 48 jam. Biakan murni haruslah diinkubasi pada ruangan dengan suhu dan kelembaban yang sesuai untuk pertumbuhan bakteri yaitu 27°C. *Rhizobacteri sp.* merupakan bakteri mesofil sehingga dapat tumbuh optimal pada suhu 20-50°C.

**e) Perbanyak isolat MA, MB dan MD**

Perbanyak isolat MA, MB dan MD didapat dari pembiakan murni isolat MA, MB dan MD. Perbanyak dilakukan dengan mengambil 1 ose biakan murni isolat kemudian diinokulasikan ke LBC 10 ml dalam tabung reaksi. Setelah 48 jam ambil 1 ml di inokulasi ke erlenmeyer berisi 100 ml medium LBC untuk tiap

isolat, kemudian diinkubasi dengan suhu ruang 27°C selama 48 jam pada *rotary shaker* dengan kecepatan 120 rpm.

**f) Formulasi *Rhizobacteri indigenus* Merapi Isolat MA, MB dan MD**

Tiga isolat yang telah diperbanyak dan diinkubasi selama 48 jam kemudian dicampur (lampiran 13a) dan diinokulasikan sebanyak 10% pada 4 botol steril berisi 100 ml untuk masing-masing isolat formulasi (A) ekstrak tanah, formulasi (B) air kelapa 50% + rendaman kedelai 50%, formulasi (C) Limbah tahu 42%+ ekstrak kentang 6%+ ekstrak *taoge* 42% dan formulasi (D) media Luria Bertani Cair masing-masing diulang 3 botol ( lampiran 6) (lampiran 13b), kemudian di inkubasi selama 1 bulan pada suhu ruang dan diamati kecepatan pertumbuhan *Rhizobacteri indigenus* Merapi setiap minggu dengan metode *plating* pada media Luria Bertani Agar (LBA) (Lampiran 4).

**g) Uji viabilitas *Rhizobacteri indigenus* Merapi pada media berbagai formula**

Pertumbuhan *Rhizobacteri* akan diamati setiap 1 minggu sekali selama 3 minggu dengan metode *plating* menggunakan medium LBA metode permukaan atau *surface plating method*, kemudian akan diuji 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 mL dengan menggunakan syarat menurut Yuwono (2006).

## 2. Tahap 2. aplikasi berbagai formulasi cair pada benih dan bibit.

### a) Persiapan Lahan

Persiapan lahan (lampiran 13d) dilakukan 1 (satu) minggu sebelum tanam dengan *pembajakan* 2 kali. Pembajakan pertama tanpa garu, kemudian lahan dibagi sesuai *lay out* pada masing-masing blok (lampiran 1). Selanjutnya pemberian pupuk dasar berupa pupuk kandang dan SP-36 sesuai dosis anjuran sesuai kebutuhan (lampiran 9).

### b) Pembibitan

#### 1) 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. Benih yang tenggelam adalah benih yang bagus untuk dibibitkan. Selanjutnya benih tenggelam diambil dan dibilas dengan air biasa sampai bersih dan dikering anginkan.

#### 2) Uji daya kecambah

Uji daya kecambah dilakukan untuk mengetahui potensi benih yang bisa berkecambah dari suatu kelompok atau satuan berat benih. Pengujian ini dilakukan dengan cara mengambil 100 biji secara acak kemudian benih disemai pada *petridish* yang sudah diberi kapas atau kertas saring yang telah dibasahi. Kemudian dihitung berapa jumlah benih yang berkecambah, rumus perhitungan daya kecambah :

$$DB = (JBK / JBT) \times 100 \%$$

Keterangan :

DB = Persentase biji berkecambah

JBK = Jumlah biji berkecambah

JBT = Jumlah biji yang ditabur = 100

**c) Aplikasi berbagai formula cair *Rhizobacteri indigenus* Merapi pada benih padi IR 64**

Menuru Wiwaha (2012) perlakuan dengan perendaman benih dilakukan dengan merendam benih IR64 (lampiran 7) selama 2 jam (lampiran 13c) dan ditambahkan perekat Stiker, pada berbagai formulasi sesuai perlakuan. Sedangkan untuk perlakuan aplikasi pada bibit untuk benihnya direndam dengan menggunakan air.

**d) Penyemaian**

Benih yang sudah direndam formulasi di peram selama 24 jam dan ditaburkan diatas 24 besek sesuai perlakuan. Sisa rendaman formulasi akan di tambahkan ke besek persemaian. Media tanam berupa tanah pasir dan selanjutnya besek diletakkan ditempat yang terkena sinar matahari langsung selama 3 minggu. Benih yang di semaikan dipelihara dengan cara disiram agar media tempat persemaian selalu lembab. Selama persemaian dilakukan pengamatan terhadap pertumbuhan *Rhizobacteri indigenus* Merapi saat fase persemaian. Pengamatan dilakukan per minggu selama 3 minggu dengan media *plating* pada Media Luria Bertani Agar (LBA).

**e) Aplikasi berbagai formula cair *Rhizobacteri indigenus* pada bibit padi IR 64**

Perlakuan dengan merendam bibit dilakukan dengan merendam bibit IR64 selama 30 menit pada berbagai formulasi (sesuai dengan perlakuan) (lampiran



13c). Sedangkan untuk perlakuan aplikasi pada benih, untuk bibitnya hanya direndam air. Perendaman dilakukan dengan formulasi dengan dosis pertanaman 1 ml. Sisa formulasi untuk perendaman bibit dimasukkan ke lubang tanam.

#### **f) Penanaman**

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 (lampiran 13e). Penanaman dilakukan dengan jarak tanam 20 cm x20 cm (*Lay out* jarak tanam pada lampiran 1c).

#### **g) Pemeliharaan**

##### **1) Pengairan**

Pada awal penanaman selama 1 minggu kondisi tanah akan disamakan sesuai syarat penanaman padi sawah yaitu tergenang. Selanjutnya pengairan dilakukan sesuai dengan cekaman kekeringan yaitu 3 hari sekali (KL 19%) (lampiran 8) dengan cara disiram menggunakan ember ( lampiran 10) yang dibuat pada petak-petak perlakuan perhitungan kadar air tanah terdapat pada (lampiran 11). Hasil penelitian sebelumnya mengenai frekuensi penyiraman tanaman padi yang diinokulasikan *Rhizobacteri indigenous* Merapi membuktikan bahwa tanaman padi yang diinokulasikan dengan *Rhizobacteri indigenous* Merapi dan frekuensi penyiraman 3 hari sekali tidak berbeda nyata dengan perlakuan tanaman padi tanpa inokulasi dengan frekuensi penyiraman 1 hari (Agung-Astuti dkk, 2013).

2) Pemupukan susulan

Pupuk susulan di aplikasikan 14 hari, 30 hari, 40 hari setelah tanam dengan menggunakan anjuran Urea dan KCl. Total kebutuhan pupuk yang digunakan dalam penelitian ini dapat dilihat pada lampiran 9.

3) Penyiangan

Penyiangan gulma dilakukan dengan cara mencabut, penyiangan dilakukan bersamaan dengan pengairan.

h) Pengamatan dan Pemanenan

Pengamatan dilakukan mulai dari 1 minggu hingga minggu ke 6 setelah padi ditanam. Panen dilakukan setelah tanaman berakhir pada masa vegetatif, yaitu berumur 49 hari atau 7 minggu setelah tanam .

### E. Parameter yang Diamati

1. Tahap 1. Pengembangan *Rhizobacteri Indigenous Merapi* pada berbagai formulasi media cair

a) Viabilitas total *Rhizobacteri* dan isolat MA, MB, MD dalam berbagai formula selama penyimpanan 1 bulan (CFU/ml)

Pengujian dilakukan pada hari ke 7, 14, 21 dan 28 setelah penyimpanan dengan menggunakan medium LBA dengan kadar NaCl 0,1 M. Satu gram sampel diencerkan pada 3 botol suntik ( $10^{-2}$ ;  $10^{-4}$ ;  $10^{-6}$ ) dan 2 tabung rekasi ( $10^{-7}$ ;  $10^{-8}$ ), sehingga didapat seri pengencerah hingga  $10^{-8}$ . Setiap 0,1 ml pada seri  $10^{-6}$ ;  $10^{-7}$ ;  $10^{-8}$  diinokulasikan dengan metode permukaan (*surface plating method*) dan

setiap seri pengenceran yang diujikan ( $10^{-7}$ ;  $10^{-8}$ ;  $10^{-9}$ ) dibuat ulangan sebanyak 3 kali.

Viabilitas *Rhizobacteri indigenus* Merapi didasarkan pada populasi koloni bakteri dengan menggunakan metode *Total Plate Count*. Jumlah bakteri per mililiter dapat ditentukan dengan menghitung koloni yang tumbuh dari masing-masing pengenceran. 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.

**b) pH berbagai formulasi Cair *Rhizobacteri***

Pengujian pH *carrier* dilakukan pada minggu ke 1, 2, 3 dan 4 setelah formulasi dengan cara mengambil sampel.

**2. Tahap 2. Aplikasi berbagai formulasi cair pada benih dan bibit di lapangan**

**a) Dinamika populasi total *Rhizobacteri* dan isolat MA, MB, MD pada saat di pembibitan (CFU/ml)**

Penghitungan populasi bakteri pada formula dilakukan pada minggu ke-1, dan ke-3 dengan menggunakan medium LBA dengan kadar NaCl 0,1 M. 1 ml sampel dari perakaran diencerkan pada 3 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 ( $10^{-7}$ ;  $10^{-8}$ ;  $10^{-9}$ ) dibuat ulangan sebanyak 3 kali. Viabilitas *Rhizobacteri indigenous* Merapi dilakukan dengan menggunakan metode *Total Plate Count* terhadap populasi koloni bakteri. Jumlah bakteri per mililiter dapat ditentukan dengan menghitung koloni yang tumbuh dari masing-masing pengenceran.

**b) Dinamika populasi total *Rhizobacteri* selama di Lahan pada padi IR-64 (CFU/ml)**

Penghitungan populasi bakteri pada formula dilakukan pada minggu ke-2, ke-4 dan ke-6 setelah tanam, dengan menggunakan medium LBA dengan kadar NaCl 0,1 M. 1 ml sampel dari perakaran diencerkan pada 3 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 ( $10^{-7}$ ;  $10^{-8}$ ;  $10^{-9}$ ) dibuat ulangan sebanyak 3 kali. Viabilitas *Rhizobacteri indigenous* Merapi dilakukan dengan menggunakan metode *Total Plate Count* terhadap populasi koloni bakteri. Jumlah bakteri per mililiter dapat ditentukan dengan menghitung koloni yang tumbuh dari masing-masing pengenceran.

### **c) Pertumbuhan Perakaran Tanaman Minggu Ke-6**

#### **1) Proliferasi akar**

Poliferasi akar diketahui dengan melihat penyebaran perakaran tanaman pada hari terakhir pengamatan tanaman sampel dengan cara memisahkan akar dari tajuk dan mengambil gambar persebaran akarnya (lampiran 13e).

#### **2) Panjang akar (cm)**

Pada minggu ke 2, 4 dan 6 setelah tanam dilakukan pengamatan panjang akar pada tanaman korban. Panjang akar diukur menggunakan penggaris mulai dari pangkal tanaman hingga ujung akar.

#### **3) Berat Segar Akar (g)**

Pengamatan berat segar akar dilakukan dengan cara mencabut tanaman korban, 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. Penghitungan berat segar akar dilakukan setiap 2 minggu sekali yaitu pada minggu ke 2, 4 dan 6 setelah tanam.

#### **4) Berat kering Akar (g)**

Pengamatan berat kering akar dilakukan dengan cara menimbang akar yang sudah kering oven menggunakan timbangan analitik dan dinyatakan dalam satuan gram. Penghitungan berat kering akar dilakukan setiap 2 minggu sekali yaitu pada minggu ke 2, 4 dan 6 setelah tanam.

#### **d) Pertumbuhan Tanaman Minggu Ke-6**

##### **1) 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 1 minggu sekali dimulai satu minggu setelah bibit padi ditanam di lahan sampai waktu panen.

##### **2) Berat Segar 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 dioven pada suhu 60°C sampai beratnya konstan. Penghitungan berat segar tajuk dilakukan setiap 2 minggu sekali yaitu pada minggu ke 2, 4 dan 6 setelah tanam.

##### **3) Berat Kering Tajuk (g)**

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 kering tajuk dilakukan setiap 2 minggu sekali yaitu pada minggu ke 2, 4 dan 6 setelah tanam.

##### **e) Jumlah Anakan**

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

**f) Pertumbuhan Tajuk minggu ke-7****1) Berat Segar Brangkasan (g)**

Pengamatan berat segar tanaman dilakukan dengan cara mencabut tanaman sampel kemudian menimbang bagian seluruh bagian tanaman menggunakan timbangan analitik, dan dinyatakan dalam satuan gram. Selanjutnya dioven pada suhu  $60^{\circ}\text{C}$  sampai beratnya konstan.

**2) Berat Kering Brangkasan (g)**

Pengamatan berat kering tanaman dilakukan dengan cara menimbang seluruh bagian tanaman yang sudah kering oven menggunakan timbangan analitik dan dinyatakan dalam satuan gram.

**F. Analisis Data**

Data hasil pengamatan secara periodik disajikan dalam bentuk diagram dan grafik. Data pengamatan agronomis dianalisis dengan menggunakan sidik ragam (*Analysis of variance*)  $\alpha$  5%. Untuk perlakuan yang berbeda nyata diuji lebih lanjut dengan uji jarak berganda Ducan (DMRT).