

III. TATA CARA PENELITIAN



A. Tempat Dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di lahan percobaan Pertanian UMY, Jenis tanah pada lahan yaitu Regosol dan pengujian dilakukan di laboratorium Agrobioteknologi dan *green house*. Waktu penelitian dilaksanakan pada bulan Oktober 2013 sampai Februari 2014.

B. Bahan Dan Alat Penelitian

1. Bahan

- a. Isolat murni *Rhizobakteri indigenus* Merapi isolat MA, MB, MD (koleksi penelitian Ir. Agung Astuti, MSi. dkk.). (Lampiran 11 b)
- b. Bibit Ciherang dan IR64 yang diperoleh dari toko saprodi DIY, sedang Segreng yang diperoleh dari balai benih.
- c. Pupuk kandang, SP-36, Urea, KCl (Lampiran 6).
- d. Medium Lurial Bertani Agar (LBA), Medium Lurial Bertani Cair (LBC) untuk perbanyak dan *plating* isolat *Rhizobakteri indigenus* Merapi (lampiran 3).

2. Alat

- a. Alat perbanyak isolat (*Glass ware*, alat inokulasi dan *shaker*).
- b. Perlengkapan olah tanah.
- c. Alat perawatan tanaman (penyanggulma).

- d. Perlengkapan pengamatan pertumbuhan isolat (*petridish* dan *colony counter*).
- e. Perlengkapan pengamatan pertumbuhan dan hasil tanaman padi (penggaris dan timbangan analitik).

C. Metode Penelitian

Percobaan eksperimental pada lahan disusun dalam Rancangan Acak Kelompok Lengkap (RAKL) dengan desain percobaan Faktorial (3X3).

Faktor 1 adalah jenis varietas tanaman padi yang terdiri dari 3 aras (V1) **Ciherang**, (V3) **IR 64**, dan (V6) **Segreng Handayani** . Faktor 2 adalah isolat bakteri yang terdiri dari 3 aras (I1) **Tanpa inokulum**, (I2) **Inokulum campuran MB dan MD**, dan (I3) **Inokulum campuran MA, MB dan MD**. Sehingga diperoleh 9 kombinasi perlakuan (V1I1, V1I2, V1I3, V3I1, V3I2, V3I3, V6I1, V6I2, dan V6I3) yang masing-masing perlakuan diulang sebanyak 3 kali. Dengan demikian diperoleh 27 unit perlakuan (lampiran 1). Setiap unit perlakuan terdapat 5 tanaman sampel 3 tanaman korban dan 9 tanaman sebagai petak hasil (lamp. 2)

D. Tata Cara Penelitian

1. Perbanyak inokulum

a. Sterilisasi alat

Alat-alat yang terbuat dari logam dan gelas dicuci bersih dan dibungkus kertas payung, kemudian disterilkan dalam autoklaf dengan temperatur 121⁰C tekanan 1 atm selama 30 menit.

b. Pembuatan medium perbanyak isolat

Medium perbanyak yang digunakan yaitu LBC sesuai kebutuhan (lampiran 3). Membuat medium perbanyak LBC yaitu dengan cara mencampur semua bahan sesuai kebutuhan kemudian dimasukkan kedalam tabung reaksi sebanyak 10 ml dan erlenmeyer sebanyak 150 ml (lampiran 4). Tabung reaksi dan erlenmeyer ditutup dengan kapas dan dibungkus dengan kertas payung kemudian disterilkan dalam autoklaf pada temperatur 121°C tekanan 1 atm selama 15-20 menit.

c. Identifikasi dan Karakterisasi

Identifikasi koloni dilakukan dengan cara menumbuhkan isolat MA, MB dan MD dari hasil pembiakan kultur murni pada medium LBA koleksi penelitian Ir. Agung Astuti, MSi. dkk (2013) menggunakan metode permukaan (*surface plating method*). Hasil penelitian yang dilakukan oleh Agung Astuti dkk. (2013 a) 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 digunakan 3 isolat yaitu MA, MB dan MD. Isolat hasil

d. Perbanyak inokulum

Rhizobakteri yang telah murni pada medium *Luria Bertani* Agar (LBA) diambil 1 ose kemudian dimasukkan dalam medium perbanyak 10 ml pada tabung reaksi, selanjutnya diinkubasi selama 48 jam. Setelah media

perbanyak 10 ml diinkubasi, selanjutnya isolat pada medium perbanyak 10 ml di masukkan pada erlenmeyer 150 ml LBC kemudian diinkubasi dengan metode kultur gojog (120 rpm) selama 48 jam hingga diperoleh jumlah bakteri setara 10^8 cfu/ml (lampiran 5).

2. Persiapan Lahan

Persiapan lahan dilakukan 1 (satu) minggu sebelum tanam dengan pembajakan 2 kali (Lampiran 11 a). Pembajakan pertama tanpa *garu*, kemudian lahan dibagi sesuai *lay out* pada masing-masing blok (lampiran 1). Pemberian pupuk dasar sesuai kebutuhan yaitu pupuk kandang dan SP-36 (lampiran 6).

3. Pembibitan

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

b. 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 :

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

Keterangan : DK = Persentase biji berkecambah
 JBK = Jumlah biji berkecambah
 JBT = Jumlah biji yang ditabur = 100

c. Pemeraman dan persemaian

Setelah 12 jam, benih diangkat dan diperam dalam karung yang tertutup hingga 24 jam dan diletakkan ditempat yang tidak terkena sinar matahari langsung. Setelah 24 jam bibit diangkat, ditaburkan diatas *besek* yang sudah berisi media tanah yang dicampur kompos (Lampiran 11 a). Selanjutnya besek di diletakkan ditempat yang terkena sinar matahari langsung selama 3 minggu. Benih yang di semaikan dipelihara dengan cara disiram agar media tempat persemaian selalu lembab.

4. Inokulasi *Rhizobacter indegenous* Merapi pada bibit padi.

Penanaman dan pemindahan bibit dilakukan pada saat umur bibit 14 hari setelah persemaian. Terlebih dahulu dilakukan inokulasi *Rhizobakteri indegenous* Merapi dengan cara perendaman, sebagai berikut: mencabut bibit dengan hati-hati dari petak persemaian, kemudian akar bibit padi setiap satu lubang tanam di rendam dalam 2 ml suspensi *Rhizobacter indegenous* Merapi yang dibiakkan dalam medium LBC + NaCl 5%, dengan kerapatan 10^8 cfu/ml selama 1 jam. Jumlah inokulum dari isolat *Rhizobakteri indegenous* Merapi isolat MA, MB, MD yang dibutuhkan tersaji pada lampiran 5.

5. Penanaman

Setelah perendaman akar bibit pada suspensi *Rhizobakteri indigenus* Merapi, penanaman dilakukan dengan cara tanam 2 bibit dalam 1 lubang untuk mengurangi resiko jika ada tanaman yang mati. Penanaman dilakukan dengan jarak tanam 20 cm x 20 cm.

6. Pemeliharaan

a. Pengairan

Pada awal penanaman, selama 2 minggu pengairan dilakukan setiap hari, selanjutnya setelah 2 minggu pengairan dilakukan setiap 6 hari sekali. Jika terjadi hujan saat sebelum 6 hari maka akan diukur kadar lengasnya, jika kondisi lengas tanah belum mencapai 12% (Lampiran 9) maka lahan tidak disiram sampai mencapai kondisi lengas 12%, kemudian setelah mencapai titik lengas baru dilakukan penyiraman.

b. Penyiangan Gulma

Penyiangan gulma dilakukan dengan cara mencabut dan membenamkan gulma ke tanah dengan manual, penyiangan dilakukan ketika gulma yang tumbuh di lahan populasinya > 50% pada minggu II, III dan IV HST.

c. Pemupukan

Kebutuhan pupuk tanaman padi selama musim tanam adalah pupuk kandang = 25000 kg/ha, Urea=200 kg/ha, SP-36=150 kg/ha dan KCl=100 kg/ha. Dengan uraian aplikasi pupuk dasar menggunakan pupuk kandang 100% dan SP-36 100%, setelah 14 hari setelah tanam di berikan Urea 30%

dan KCl 50%, dan ketika umur 30 hari setelah tanam berikan Urea 40%, kemudian terahir 40 hst diberi Urea 30% dan KCl 50% (Anonim, 2011). Total kebutuhan pupuk yang digunakan dalam penelitian ini dapat dilihat pada lampiran 6.

d. Pengendalian Hama

Hama yang sering ada pada tanaman padi:

i. **Walang Sangit** (*Leptocorixa acuta*)

Walang sangit merupakan hama yang menghisap cairan bulir pada fase masak susu. Kerusakan yang ditimbulkan walang sangit menyebabkan beras berubah warna, mengapur serta hampa. Hal ini dikarenakan walang sangit menghisap cairan dalam bulir padi. Fase tanaman padi yang rentan terserang hama walang sangit adalah saat tanaman padi mulai keluar malai sampai fase masak susu. Pengendalian dilakukan pada saat gabah masak susu pada umur 70-80 hari setelah tanam dengan disemprot insektisida Greta 500EC (1-2 ml/L).

7. **Pengamatan dan Pemanenan**

Pengamatan dilakukan mulai dari 1 minggu setelah tanam, menjelang panen hingga pada saat panen. Pemanenan dilakukan setelah padi menguning (95% malai padi menguning dari sejumlah tanaman yang ada) dan di panen untuk padi Segreng umur 110 hst, sedangkan IR-64 dan Ciherang 120 hst.

E. Parameter Yang Diamati

Dalam penelitian ini variabel pengamatan meliputi pertumbuhan vegetatif dan pertumbuhan generatif dengan tahapan antara lain:

1. Pengamatan Tanaman Sampel Mingguan

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 1 minggu sekali dimulai satu minggu setelah perlakuan dan berhenti ketika titik maksimum perkembangan vegetatif yang ditandai dengan keluarnya malai.

b. Jumlah anakan per rumpun

Pengamatan jumlah anakan per rumpun dilakukan setiap 1 minggu sekali setelah perlakuan dan berhenti ketika titik maksimum perkembangan vegetatif yang ditandai dengan keluarnya malai.

2. Pengamatan Tanaman Korban Minggu ke-2, ke-4 dan ke-6

a. Pengamatan *Rhizobakteri Indigenus* Merapi (cfu/ml)

Pengamatan dilakukan dengan cara mencabut tanaman korban dan mengisolasi bakteri dengan mencuci akar padi menggunakan air steril. Air hasil cucian akar diambil 0,1 ml kemudian dilakukan *plating* pada media LBA pada petridish menggunakan metode *surface plate count*

menggunakan seri pengenceran 10^{-7} , 10^{-8} dan 10^{-9} . Pada perhitungan menggunakan cara *plate count* harus memenuhi syarat sebagai berikut:

1. Jumlah koloni tiap cawan petri antara 30-300 koloni.
2. Tidak ada koloni yang menutup lebih besar dari setengah luas cawan petri (*Spreader*).
3. 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.
4. Jika dengan ulangan setelah memenuhi syarat hasilnya dirata-rata.

b. Berat segar akar (g)

Mengukur berat segar akar menggunakan timbangan analitik setelah akar dicuci bersih dan kering angin.

c. Panjang akar (cm)

Panjang akar diukur menggunakan penggaris mulai dari pangkal tanaman hingga ujung akar.

d. Berat kering akar (g)

Pengamatan dilakukan dengan cara menimbang berat akar yang telah dioven terlebih dahulu hingga berat kering konstan.

e. Berat segar tajuk (g)

Pengamatan dilakukan dengan cara menimbang tajuk tanaman yang telah dipisahkan dari akarnya.

f. Berat kering tajuk (g)

Pengamatan dilakukan dengan cara menimbang berat tajuk yang telah dioven terlebih dahulu hingga berat kering konstan.

3. Pengamatan Kadar Air Tanah (g)

Pengamatan dilakukan pada minggu ke-2, ke-4 dan ke-6 dengan cara mengambil sampel tanah secara acak pada setiap blok kemudian dicampur dan diacak, diulang sebanyak 3 ulangan kemudian diukur kadar airnya. Rumus yang digunakan :

$$\frac{W1 - W2}{W2 - W3} \times 100\%$$

W1 = berat cawan + tanah basah (gram).

W2 = berat cawan + tanah kering (gram)

W3 = berat cawan kosong (gram)

W1 - W2 = berat air (gram)

W2 - W3 = berat bahan kering (gram)

4. Pengamatan Tanaman Sampel menjelang panen dan setelah panen

a. Umur berbunga (%)

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

b. Berat segar berangkasan tanaman (g)

Cara pengamatan dilakukan dengan menimbang berat segar tanaman sampel tanpa akar tanaman ketika akan panen dengan menggunakan timbangan analitik.

c. Berat kering brangkasan (g)

Pengamatan dilakukan dengan menimbang berat tanaman sampel yang telah dioven terlebih dahulu hingga mendapatkan berat kering yang konstan. Tanaman sampel yang telah dioven kemudian ditimbang dengan timbangan analitik.

d. Jumlah malai (malai/rumpun)

Pada setiap rumpun tanaman dihitung berapa jumlah malainya.

e. Jumlah gabah (bulir/rumpun)

Pada tiap rumpun dihitung berapa jumlah bulir yang dihasilkan.

f. Berat 1000 biji (g)

Pengamatan berat 1000 biji dilakukan dengan cara menimbang berat gabah 1000 biji dari petak hasil masing-masing perlakuan yang telah dikeringkan, kemudian mengukur kadar airnya dengan dikonversikan pada kadar air 14% dengan rumus:

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

a = berat 1000 biji pada kadar air 14 %

b = berat 1000 biji pada kadar air terukur

g. Hasil (ton/ha)

Pengamatan dilakukan pada saat panen dari petak hasil perlakuan yaitu dengan mengeringkan bulir gabah kemudian ditimbang diukur kadar airnya kemudian dikonversikan dalam ton/ha pada kadar air 14% dengan rumus :

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

H = hasil gabah/ha pada kadar air 14%

A = luas lahan dalam satuan ha (10.000 m²)

B = luas petak hasil (m²)

C = berat biji per petak hasil (kg/m²) 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%. Pada perlakuan yang berbeda nyata diuji lebih lanjut dengan uji jarak berganda Ducan (DMRT).