

III. METODOLOGI PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium Agrobioteknologi Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Yogyakarta, yang dilaksanakan pada bulan Juli sampai dengan Desember 2007.

B. Bahan dan Alat Penelitian

Bahan yang digunakan adalah 12 isolat Rhizobakteri yang diperoleh dari penelitian Ir. Agung Astuti M.Si., medium LB, medium Nfb , bahan untuk cat gram, bahan untuk menguji nitrit, nitrat, dan ammonia, bahan untuk menguji fermentasi (lampiran III), benih Padi Merah-Putih RI-1 yang diperoleh dari Adji Koesumo dan Fakultas Pertanian UMY, tanah regosol, pupuk makro-mikro.

Alat yang digunakan yaitu: Mikroskop, petridis, tabung reaksi, *autoklave*, kompor gas, gelas piala, Erlenmeyer, pipet ukur, spatel, jarum ose, *dryglasky*, lampu Bunsen, mikropipet, *plate colony*, tabung durham, polibag ukuran 20x30 cm.

C. Metode Penelitian

Penelitian dilakukan dengan metode percobaan laboratorium yang terdiri dari empat tahap yaitu: (a) Pemurnian dan Perbanyakkan 12 Isolat Rhizobakteri Padi Merah-Putih RI-1 (b). Skrining Isolat Rhizobakteri Padi Merah-Putih RI-1

Identifikasi, dan Karakterisasi Isolat Rhizobakteri Padi Merah-Putih RI-1, (d) Re-inokulasi Rhizobakteri pada Akar Tanaman Padi Merah-Putih RI-1.

Tahap I. Pemurnian dan Perbanyakkan 12 Isolat Rhizobakteri Padi Merah-Putih RI-1

Pemurnian dan perbanyakkan isolat dengan menggunakan medium NA. 12 Isolat Rhizobakteri yang didapat lalu dimurnikan terlebih dahulu pada medium NA. Setelah dimurnikan, diperbanyak untuk membuat stok persediaan Rhizobakteri pada agar miring.

Tahap II. Skrining 12 Isolat Rhizobakteri Padi Merah-Putih RI-1 terhadap Cekaman kekeringan dan kemampuan fiksasi Nitrogen meliputi:

- a. Cekaman kekeringan dengan medium LB+NaCl 1,5 M; 1,75 M; 2 M

Skrining ini dilakukan dengan metode *surface* (metode permukaan) dengan seri pengenceran 10^{-6} . Petridish yang berisi suspensi Rhizobakteri (10^{-6}) diinkubasi pada suhu kamar selama 2 x 24 jam. Isolat yang mampu tumbuh pada NaCl tertinggi untuk selanjutnya diidentifikasi dan dikarakterisasi yang nantinya juga digunakan pada tahapan re-inokulasi.

- b. Kemampuan Fiksasi Nitrogen dengan medium Nfb.

Skrining ini dilakukan dengan metode *surface* (metode permukaan) dengan seri pengenceran 10^{-6} . Petridis yang berisi suspensi Rhizobakteri (10^{-6}) diinkubasi pada suhu kamar selama 2 x 24 jam Isolat yang mampu tumbuh untuk selanjutnya diidentifikasi dan dikarakterisasi yang nantinya juga digunakan pada tahapan re-inokulasi.

Tahap III. Identifikasi & Karakterisasi Rhizobakteri Padi Merah-Putih RI-1.

Tahap ini dilakukan di laboratorium Agrobioteknologi dengan melakukan percobaan menggunakan metode kualitatif dengan mendeskripsikan isolat murni bakteri hasil skrining. Karakterisasi dilakukan dengan cara memisahkan sifat bakteri berdasarkan bentuk sel, warna, diameter, bentuk koloni, elevasi, bentuk tepi dan struktur dalam dan juga mengidentifikasi sifat sel, bentuk sel dan sifat-sifat fisiologisnya.

Tahap IV. Ré-inokulasi Rhizobakteri pada akar Padi Merah-Putih RI-1

Tahap re-inokulasi merupakan tahap uji lapangan (*experimental research*) yang dilakukan dengan metode percobaan pot. Tahap ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh inokulum biakan murni Rhizobakteri sp. terhadap pertumbuhan tanaman Padi Merah-Putih RI-1. Penelitian lapangan ini dilakukan selama 3 minggu, menggunakan percobaan Laboratorium dalam polibag dengan rancangan percobaan faktor tunggal 4 perlakuan yang disusun dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL). Macam perlakuannya adalah (A) Tanaman Padi + Isolat Tahan cekaman kekeringan; (B) Tanaman Padi + Isolat Fiksasi N; (C) Tanaman Padi + Isolat tahan cekaman kekeringan dan Fiksasi N; (D) kontrol (Tanpa Inokulum). Masing-masing perlakuan diulang sebanyak 3 kali, sehingga total semua 4 unit percobaan tiap unit digunakan 3 polibag, sehingga total

D. Tata Laksana Penelitian

Tahap I. Pemurnian dan Perbanyakkan 12 Isolat Rhizobakteri Padi Merah-Putih RI-1

a. Sterilisasi alat

Alat-alat yang terbuat dari logam dipijarkan dengan menggunakan lampu bunsen kemudian disimpan. Alat-alat gelas direndam dengan air yang dicampur dengan *detergen* kemudian direbus selama 10 menit, kemudian dibilas sampai bersih, dibungkus dengan kertas atau plastik kemudian disterilkan dalam *autoclaf* dengan temperatur 121⁰C tekanan 1 atm selama 30 menit.

b. Pembuatan Media

Medium yang digunakan yaitu medium NA, medium LB+NaCl dan medium Nfb (lampiran III). Bahan untuk masing-masing media dicampur jadi satu dilarutkan dalam aquadest, kemudian dipanaskan dalam penangas air supaya homogen, selanjutnya pengaturan pH dengan menggunakan pH stik. Setelah pH diukur maka medium dimasukkan ke dalam erlenmeyer kemudian ditutup dengan kapas dan dibungkus kertas. Sterilisasi medium dilakukan dengan menggunakan *autoclaf* 121⁰C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit

c. Pemurnian Isolat

Keduabelas Isolat Rhizobakteri yang didapat dari penelitian Agung-Astuti, dkk (2007) dimurnikan dengan cara mengambil 1 ose isolat Rhizobakteri pada medium agar miring yang kemudian dilakukan pengenceran seri 10⁻⁶ pada aquadest steril. Pemurnian ini dilakukan dengan metode *surface* (metode permukaan), kemudian diambil 0,1 ml larutan suspensi Rhizobakteri (10⁻⁶) dengan

untuk dimurnikan, diinkubasi selama 2 x 24 jam. Pemurnian ini dilakukan secara berulang-ulang, apabila seluruh koloni yang tumbuh telah seragam maka dianggap telah murni.

d. Perbanyak isolat

Setelah keduabelas isolat Rhizobakteri dimurnikan secara berulang-ulang sampai didapat biakan yang murni, isolat tersebut diperbanyak untuk persediaan stok pada medium NA miring.

Tahap II. Skrining 12 Isolat Rhizobakteri Padi Merah-Putih RI-1 terhadap cekaman kekeringan dan kemampuan fiksasi Nitrogen meliputi:

a. Isolasi Isolat ke medium LB+NaCl 1,5 M; 1,75 M; 2 M

Isolasi dilakukan dengan metode *surface* (metode permukaan) dengan seri pengenceran 10^{-6} . Caranya yaitu 12 isolat Rhizobakteri masing-masing diambil 1 ose yang dilarutkan pada aquadest steril dalam tabung reaksi kemudian dilakukan pengenceran seri 10^{-6} . 0,1 ml larutan suspensi Rhizobakteri (10^{-6}) dengan menggunakan mikropipet yang kemudian diinokulasikan pada medium LB+NaCl 1,5 M; 1,75 M; 2 M kemudian diinokulasikan dalam petridish secara aseptis dan diratakan dengan menggunakan *dryglasky*. Petridish tersebut diinkubasi pada suhu kamar selama 2 x 24 jam. Isolat yang mampu tumbuh pada NaCl tertinggi untuk selanjutnya dikarakterisasi dan Identifikasi dan juga nantinya digunakan sebagai inokulun pada tahapan re-inokulasi.

b. Kemampuan fiksasi Nitrogen

Isolasi dilakukan dengan metode *surface* (metode permukaan) dengan seri

10^{-6} . Caranya yaitu 12 isolat Rhizobakteri masing-masing diambil 1

ose yang dilarutkan pada aquadest steril 9 ml dalam tabung reaksi kemudian dilakukan pengenceran seri 10^{-6} . 0,1 ml larutan suspensi Rhizobakteri (10^{-6}) dengan menggunakan mikropipet yang kemudian diinokulasikan pada medium Nfb kemudian diinokulasikan dalam petridish secara aseptis dan diratakan dengan menggunakan *dryglasky*. Petridish tersebut diinkubasi pada suhu kamar selama 2x24 jam. Isolat yang mampu tumbuh pada médium Nfb untuk selanjutnya dikarakterisasi, Identifikasi dan digunakan sebagai inokulum pada tahapan re-inokulasi.

c. Pemurnian Isolat

Rhizobakteri yang diperoleh hasil skrining pada medium LB+NaCl dan Nfb dimurnikan dengan cara mengambil koloni isolat Rhizobakteri kemudian dilakukan pengenceran seri 10^{-6} . Selanjutnya diambil 0,1 ml larutan suspensi Rhizobakteri (10^{-6}) dengan menggunakan mikropipet yang kemudian diinokulasi ke permukaan medium NA untuk dimurnikan, diinkubasi selama 2 x 24 jam. Pemurnian ini dilakukan secara berulang-ulang, apabila seluruh koloni yang tumbuh telah seragam maka dianggap telah murni.

Tahap III. Identifikasi & Karakterisasi Rhizobakteri Padi Merah-Putih RI-1

a. Bentuk Koloni dan Motilitas

Identifikasi Rhizobakteri pada medium LB dan Medium Nfb dilakukan

Motil atau non motilnya Rhizobakteri dapat dilihat apabila selama pengamatan pertumbuhan terdapat koloni yang berpindah letaknya pada medium LB dan Fiksasi N maka termasuk motil, jika tidak pindah maka termasuk non motil.

b. Suspensi Isolat Rhizobakteri.

Biakan murni diambil sebanyak 1 ml yang dilarutkan dalam 9 ml aquades kemudian diinokulasi pada medium LB dan Fiksasi N. pengujian karakterisasi meliputi:

1) Bentuk Sel dan Sifat Gram.

Pengamatan bentuk sel dan sifat gram dengan cara mengambil 1 ose suspensi yang diletakan di atas gelas preparat dan dipanaskan di atas api alkohol selama \pm 2 menit. Setelah dingin ditetesi dengan cat utama (gram A) sebanyak 2-3 tetes dan diamkan selama 1 menit, cuci dengan air mengalir kemudian kering-anginkan. Selanjutnya tetesi dengan larutan mordan (gram B) dan biarkan selama 1 menit, cuci dengan air mengalir dan kering-anginkan. Tetesi dengan larutan peluntur (gram C) selama 30 detik, selanjutnya cuci dengan air mengalir dan kering-anginkan, kemudian tetesi larutan cat penutup (gram D) selama 2 menit, cuci dengan air mengalir dan kering-anginkan. Setelah ini, amati preparat dengan mikroskop, apabila bakteri gram positif berwarna violet dan apabila gram negatif berwarna merah.

2) Uji Aerobisitas

Identifikasi pada medium nutrient cair dengan mengambil 1 ml suspensi

ini diamati pertumbuhan sel yang dihasilkan. Jika koloni tumbuh dipermukaan maka termasuk aerob, jika tersebar maka termasuk fakultatif anaerob, dan jika didasar tabung termasuk anaerob.

3) pH

Pengamatan perubahan pH dapat dilakukan dengan pengamatan tipe pertumbuhan. Jika isolat tersebut termasuk ke dalam *fast Growing* maka Rhizobakteri dapat memproduksi asam (kuning) tetapi jika termasuk dalam *slow growing* dapat mereduksi basa (biru).

4) Uji Fermentatif (Sukrosa, Glukosa, Amilum)

Pada medium glukosa, sukrosa dan amilum (Lampiran IV) dilakukan dengan uji fermentatif untuk mengetahui Rhizobakteri sp. dapat memfermentasi glukosa, sukrosa dan atau amilum menjadi asam dan gas CO₂. Caranya 10 ml glukosa, sukrosa, amilum diinkubasi 1 ml suspensi Rhizobakteri sp. dan ditempatkan pada suhu kamar selama 2 x 24 jam, setelah 2 x 24 jam diamati perubahan warnanya. Jika warnanya berubah menandakan Rhizobakteri dapat menghasilkan asam, sedangkan adanya gelembung yang dihasilkan pada durham menandakan dapat menghasilkan CO₂

5) Pembentukan Nitrit, Nitrat dan Amonia

a) Pengujian Nitrifikasi

Pengujian nitrifikasi ini dilakukan dengan cara yaitu: ambil 1 ml suspensi biakan murni Rhizobakteri dicampur pada medium nitrat cair (Lampiran IV)

... .. 24 jam pada suhu kamar kemudian ditempatkan pada cawan

porselin sebanyak 2 tetes dan ditambahkan 2 tetes asam sulfanilat dan Napthylamin kemudian diamati reaksinya berdasarkan perubahan warna.

b) Uji Amonia

Untuk uji amonia caranya yaitu dengan melihat perubahan warna yang terjadi setelah dipanaskan selama 5 menit (dilihat pada kertas lakmus), jika berubah berarti terbentuk amonia.

6) Tipe Pertumbuhan

Pengamatan pertumbuhan dilakukan dengan metode *plate count* yaitu dengan membuat seri pengenceran dengan kelipatan 10 dan selanjutnya diinokulasi pada medium NA cair setelah diinokulasi dihitung jumlah koloni tiap Petridis dengan menggunakan *coloni counter* setiap hari selama 10 hari, jika dalam waktu kurang dari 4 hari jumlah populasi koloni rhizobacter yang tumbuh meningkat cepat kemudian menurun pada jam berikutnya maka dapat dikategorikan ke dalam *fast Growing* tetapi jika meningkat secara pelan-pelan dalam waktu 6 – 8 hari maka dikategorikan *slow growing*.

Tahap IV. Re-inokulasi Rhizobakteri pada Akar Padi Merah-Putih RI-1.

a. Persiapan Media Tanam

Media tanam yang digunakan adalah tanah Regosol yang dimasukkan ke dalam polybag sebanyak 2 kg yang sebelumnya dilakukan pembersihan batu-batu besar, krikil dan rumput-rumput kering. Setelah itu tanah regosol diayak supaya didapat tanah yang diameternya seragam.

b. Seleksi Benih

Seleksi benih dimaksudkan untuk mendapatkan benih yang baik dan dapat tumbuh untuk dijadikan bibit. Seleksi benih ini menggunakan larutan garam 20 % dengan kadar garam hasil eksperimen seleksi garam. Benih yang digunakan adalah benih yang tenggelam di dasar larutan, sedangkan benih yang terapung merupakan benih yang kualitasnya rendah.

c. Uji Daya Kecambah Benih (DK)

Uji daya kecambah benih ini dimaksudkan untuk mengetahui kemampuan berkecambah benih. Kemampuan benih kecambah yang dipilih yaitu $DK \pm 80\%$. Cara pengujian daya kecambah yaitu dengan menggunakan petridish. Benih padi dikecambahkan ke dalam petridish yang telah di isi dengan kertas saring dan air, kemudian dilihat perkecambahan benih tersebut selama 1 minggu. Setelah 1 minggu, dihitung daya kecambahnya. Perhitungan daya kecambah dengan rumus sebagai berikut:

$$DK = \frac{\text{Jumlah benih yang berkecambah}}{\text{Jumlah benih yang dikecambahkan}} \times 100\%$$

d. Pesemaian Benih

Benih hasil seleksi direndam terlebih dahulu dengan pupuk cair (pupuk makro dan mikro) selama 24 jam dan diperam selama 24 jam kemudian dengan

e. Penanaman dan Pemupukan dasar.

Penanaman tanaman padi merah putih ini dilakukan tanpa genangan. Pada saat pertama penanaman dilakukan pemupukan dasar dengan menggunakan pupuk makro dan mikro (lampiran V).

f. Penyiapan Inokulum dan Aplikasi Inokulum.

Aplikasi Inokulum dilakukan setelah 7 hari penanaman tanaman Padi Merah-Putih RI-1. Setelah tanaman Padi Merah-Putih RI-1 berumur 7 hari maka diberikan inokulum sesuai perlakuan yaitu (1) Isolat Tahan cekam kekeringan; (2) Isolat Fiksasi N; (3) Isolat tahan cekam kekeringan dan Fiksasi N; (4) kontrol (Tanpa Inokulum).

Penyiapan inokulum dilakukan dengan cara menumbuhkan masing-masing isolat pada kelompok yang sama untuk inokulum tahan cekaman kekeringan yaitu MPA 6, MPA 9 dan MPA 10 ditumbuhkan bersama pada 100 ml medium Nutrient Cair dalam Erlenmeyer 250 ml dengan kerapatan 10^6 sel/ml dan diinkubasi pada alat penggojog (100 rpm) selama \pm 60 jam pada suhu 37°C . Untuk inokulum tahan Fiksasi Nitrogen yaitu MPA 7 dan MPA 10 ditumbuhkan bersama pada 100 ml medium Nutrient Cair (NC) dalam Erlenmeyer 250 ml dengan kerapatan 10^6 sel/ml dan diinkubasi pada alat penggojog (100 rpm) selama \pm 60 jam pada suhu 37°C .

Setelah \pm 60 jam, sel dipanen dengan sentrifuge caranya yaitu diambil 8 ml NC yang berisi sel inokulum kemudian dicentrifuge pada 4000 rpm selama 3 menit dan dicuci 3 kali dengan *Phosphate buffered saline* steril (PBS 0,01 M; pH

erlenmeyer sebelum diinokulasikan pada perakaran tanaman Padi Merah-Putih RI-1. Inokulum digunakan dalam kondisi segar (*fresh*) atau tidak mengalami penyimpanan dalam lemari es.

Pada saat aplikasi inokulum ini dilakukan dengan menggunakan jarum suntik. inokulum diambil sebanyak 5 ml yang kemudian disuntikan pada perakaran tanaman. Untuk perlakuan Inokulum tahan cekaman kekeringan, disuntikan inokulum tahan cekaman kekeringan keperakaran tanaman sebanyak 5 ml. Untuk perlakuan Inokulum fiksasi N, disuntikan inokulum fiksasi N keperakaran tanaman sebanyak 5 ml. Untuk perlakuan Inokulum tahan cekaman kekeringan dan fiksasi N, disuntikan inokulum tahan cekaman kekeringan keperakaran tanaman sebanyak 5 ml dan juga inokulum fiksasi N sebanyak 5 ml. Sementara untuk perlakuan kontrol atau tanpa inokulum, tidak diberikan inokulum tahan cekaman kekeringan maupun inokulum fiksasi N.

g. Pemeliharaan

Setelah dilakukan pemupukan (lampiran V) dan tanaman diberi inokulum tahan cekaman kekeringan, inokulum fiksasi N, inokulum tahan cekaman kekeringan dan inokulum Fiksasi N, dan control atau tanpa pemberian inokulum, maka dipelihara dengan melakukan penyiraman dengan frekuensi 2 hari sekali sampai keadaan tanah becek. Pengamatan dilakukan setelah 2 minggu pemberian Inokulum. Pengamatan ini bertujuan untuk melihat pengaruh dari Rhizobakteri

h. Pengamatan.

Setelah 2 minggu maka dilakukan pengamatan. Pengamatannya meliputi; proliferasi akar, panjang akar, berat kering akar dan *plate count* bakteri *Rhizosfer*.

E. Variabel Pengamatan

Tahap I. Skrining 12 Isolat Rhizobakteri Padi Sang Dwi Warna Varietas RI-1 terhadap Cekaman kekeringan dan kemampuan fiksasi Nitrogen

Diperoleh koloni dari Rhizobakteri. Variabel yang diamati pada tahap 1 meliputi: bentuk koloni, bentuk tepi, elevasi, struktur dalam, warna dan ukuran koloni.

Tahap II. Identifikasi dan Karakterisasi Rhizobakteri Padi Merah-Putih RI-1

- a. Ukuran koloni: dihitung diameter koloni (mm) dengan menggunakan penggaris.
- b. Bentuk koloni: diamati berdasarkan bentuk koloni, bentuk tepi, struktur dalam dan elevasi pada medium LB dan Fiksasi N
- c. Bentuk sel: diamati pada saat pengenceran gram.
- d. Sifat gram: diamati berdasar warna yang dihasilkan, jika berwarna merah berarti gram negatif, jika berwarna biru berarti gram positif.
- e. Aerobisitas: diamati berdasarkan pertumbuhan sel yang dihasilkan setelah diinkubasi pada medium Nutrient cair. Jika koloni tumbuh dipermukaan maka

- f. Uji fermentatif (glukosa, sukrosa, amilum): diamati berdasarkan perubahan warna indikator menandakan Rhizobakteri dapat menghasilkan asam, sedangkan adanya gelembung yang dihasilkan pada Durham menandakan dapat menghasilkan CO₂
- g. Uji nitrit, nitrat, ammonia: diamati berdasarkan perubahan warna. Untuk nitrit dan nitrat perubahan warna terjadi setelah dilakukan penambahan 2 tetes asam sulfanilat dan Naphthylamin, jika berubah warna menjadi merah berarti isolat ini mampu mereduksi nitrat menjadi nitrit. Untuk uji ammonia perubahan warna terjadi setelah dipanaskan selama 5 menit (dilihat pada kertas lakmus), jika berubah berarti terbentuk ammonia.
- h. Motilitas: diamati dengan melihat ada tidaknya pergerakan koloni. Jika ada termasuk motil dan sebaliknya jika tidak termasuk non motil.
- i. Tipe pertumbuhan: diamati dengan cara plating selama 10 hari pada medium LB dan Fiksasi N, ditentukan apakah termasuk cepat (*fast growing*) atau lambat (*slow growing*). Tipe Pertumbuhan termasuk cepat (*fast growing*) jika dalam waktu 2 - 4 hari koloni mencapai ukuran maksimum dan termasuk lambat (*slow growing*) jika memerlukan waktu lebih dari 6 - 8 hari. Pengamatan dilakukan dengan metode *plate count* dengan memperhatikan syarat-syarat sebagai berikut:

- 1) koloni tiap petridish antara 30 – 300 koloni.
- 2) Tidak ada koloni yang menutup lebih besar dari setengah luas Petridis (*spreader*).
- 3) Perbandingan jumlah koloni dari pengenceran yang berturut-turut antara pengenceran yang lebih besar dengan pengenceran sebelumnya. Jika sama atau lebih dari 2 maka hasilnya dirata-rata, dan jika lebih besar dari 2

4) Jika dengan ulangan telah memenuhi syarat hasilnya dirata-rata.

Tahap III. Re-inokulasi Rhizobakteri pada Akar Padi Merah-Putih RI-1.

Re-inokulasi Rhizobakteri pada tanaman Padi Merah-Putih RI-1 untuk Pertumbuhan tanaman meliputi:

a. Proliferasi Akar

Pengamatan proliferasi akar ini dilakukan dengan pengamatan secara visual. Kita mengamati banyaknya akar tanaman padi tersebut.

b. Panjang Akar (cm)

Pengamatan dilakukan pada minggu terakhir yaitu pada minggu ke-3. Pengamatan dilakukan dengan menggunakan penggaris untuk mengukur Panjang akar dari pangkal sampai ujung akar yang paling panjang.

c. Berat Kering Akar (g)

Pengamatan dilakukan pada minggu terakhir yaitu pada minggu ke-3. Pengamatan dengan mengukur berat kering akar tanaman. Mengukur berat kering diukur dengan dioven sampai konstan.

d. Perubahan Populasi Rhizobakteri pada Perakaran Padi Merah-Putih RI-1 (CFU/ml)

Perhitungan populasi Rhizobakteri pada perakaran Padi Merah-Putih RI-1 dilakukan dengan mengambil 1 gram tanah yang terdapat pada permukaan akar yang telah digoyang-goyang sebelumnya, kemudian disuspensikan dalam 9 ml aquades steril dan dibuat seri pengenceran. Sebanyak 0,1 ml dari tingkat pengenceran ditumbuhkan dalam medium LB agar yang mengandung NaCl untuk

juga ditumbuhkan pada medium Nfb untuk menandakan mikrobial yang diinginkan dari Rhizobakteri yang dapat memfiksasi N.

F. Analisis Data

Tahap pertama, kedua dan ketiga, data hasil pengamatan yang diperoleh dianalisis dengan grafik, histogram dan foto. Tahap keempat, data hasil pengamatan yang diperoleh dianalisis dengan grafik, histogram, foto dan juga dianalisis dengan menggunakan sidik ragam pada taraf $\alpha = 5\%$. Apabila ada beda nyata antar perlakuan yang diujikan, dilakukan uji lanjut dengan jarak ganda