

III. TATA CARA PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan di *Greenhouse* Fakultas Pertanian UMY dan Laboratorium Bioteknologi Fakultas Pertanian UMY di Jl. Lingkar Selatan, Tamantirto, Kecamatan Kasihan, Kabupaten Bantul, DIY. Waktu penelitian pada Bulan Oktober-Desember 2011

B. Bahan dan Alat Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

1. Isolat dari *Rhizobakteri* Tanaman pioner di Pangukrejo pasca erupsi Merapi Nopember 2010.(A_Astuti, 2011) 1 isolat mendapatkan 4 bakteri yaitu : MA,MB,MC,MD (Lampiran VI)
2. Tahap isolasi : Aquadest, air steril, larutan fisiologis, alkohol, medium (Nutrient Agar) NA.
3. Tahap pemurnian : Medium miring NA, isolat *Rhizobakteri sp*
4. Tahap karakterisasi : Biakan murni *Rhizobaceri sp*, medium NA, médium Nutrient Cair (NC), medium Nitrat Cair, medium (Glukosa, Sukrosa, Amylum), Alkohol, kertas Lakmus, Asam Sulfanilat, Napthylamin, cat gram, cat BCG, cat Safranin.
5. Tahap uji potensi pupuk hayati : Medium bebas N, medium Pykovskaya's Agar (PA), medium LB+NaCl.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

1. Sterilisasi dan medium : *Autoklaf*, oven, Erlemeyer, gelas piala

2. Tahap isolasi : Lampu bunsen, lumpang, martir, tabung reaksi, jarum ose, *petridish*, pipet ukur, *driglasky*, *skalpel*, pinset, mikro pipet, *blue* dan *yellow tip*.
3. Tahap pemurnian : Tabung reaksi, jarum ose, *driglasky*, *petridish*.
4. Tahap karakterisasi dan uji potensi pupuk hayati: Jarum ose, tabung reaksi, *petridis*, tabung durham, jarum preparat, spatel, desikator.
5. *Colony counter*, mikroskop, *haemocytometer*, cawan porselin, gelas preparat, oven, kulkas.
6. Alat analisis : *Colony counter*, timbangan elektrik, mikroskop.

C. Metode Penelitian

Penelitian dilakukan dengan melakukan eksperimen yang menggunakan metode Deskriptif, meliputi dua tahap yaitu: (1) karakterisasi isolat *Rhizobakteri Indegenous* (2) Uji potensi pupuk hayati.

1. Tahap pertama = Identifikasi dan Karakterisasi isolat *Rhizobakteri Indegenous*

Identifikasi dan Karakterisasi isolat *Rhizobakteri Indegenous* meliputi: bentuk koloni, bentuk sel, sifat gram, uji aerobisitas, motilitas, uji biokimia (Glukosa, Sukrosa, Amilum), kemampuan menghasilkan Nitrit dan Nitrat, perubahan pH media.

2. Tahap kedua = Re-Inokulasi terhadap tanaman padi.

Percobaan di susun dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan rancangan faktorial 2 X 5. Faktor pertama adalah frekuensi penyiraman terdiri dari 2 aras yaitu: (A). 2 hari sekali (B).3 hari sekali. Faktor ke dua adalah macam

inokulum terdiri dari 5 aras yaitu (P). Isolat MA, (Q). Isolat MB, (R). Isolat MC, (S). Isolat MD, (T). Tanpa Inokulum (kontrol) sehingga total ada 10 kombinasi perlakuan sebagai berikut :

AP= Pupuk Hayati MA disiram 2 hari sekali

BP= Pupuk Hayati MA disiram 3 hari sekali

AQ= Pupuk Hayati MB disiram 2 hari sekali

BQ= Pupuk Hayati MB disiram 3 hari sekali

AR= Pupuk Hayati MC disiram 2 hari sekali

BR= Pupuk Hayati MC disiram 3 hari sekali

AS= Pupuk Hayati MD disiram 2 hari sekali

BS= Pupuk Hayati MD disiram 3 hari sekali

AT= kontrol disiram 2 hari sekali

BT= kontrol disiram 3 hari sekali

Dengan demikian diperoleh 10 kombinasi perlakuan yang diulang 3 kali, sehingga diperoleh 30 unit polibag.

D. Cara Penelitian

1. Tahap Pertama : Identifikasi dan Karakterisasi *Rhizobakteri Indegenous* 4 Isolat lahan Pasir Abu *Vulkanik* Merapi.

Tahapan ini dilakukan di Laboratorium Agrobioteknologi dengan melakukan percobaan menggunakan metode kualitatif dengan mendeskripsikan isolat murni bakteri hasil *skrining*. Karakterisasi dilakukan dengan cara mengidentifikasi 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.

a. Sterilisasi Alat

Peralatan *glassware* yang akan digunakan direndam dengan air yang dicampur dengan *detergen* kemudian direbus selama 10 menit, kemudian dibilas sampai bersih, dibungkus dengan kertas atau plastik kemudian disterilkan dalam *autoklaf* 121°C tekanan 1 atm selama 30 menit.

b. Pembuatan Media

Medium yang digunakan yaitu medium NA. Bahan untuk untuk membuat medium dicampur jadi satu dan 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 *autoklaf* 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit.

c. Perbanyak Isolat

Setelah ke empat isolat *Rhizobakteri Indegenous* dimurnikan secara berulang-ulang sampai dapat biakan yang murni, isolat tersebut diperbanyak untuk persediaan stok pada medium NA miring dan untuk dikarakterisasi koloni dan sel serta elevasi, bentuk tepi, struktur dalam, diameter dan sifat fisiologisnya.

d. Karakterisasi Koloni

Identifikasi *Rhizobakteri Indegenous* pada medium NA dilakukan dengan pengamatan bentuk koloni, elevasi, bentuk tepi, struktur dalam, ukuran dan warnanya.

e. Karakterisasi Sel dan Sifat Gram

Pengamatan karakterisasi sel dan sifat gram dengan cara mengambil 1 ose suspensi letakkan di atas gelas preparat. Memanaskan di atas api bunsen selama ± 2 menit. Dingin angin terlebih dahulu. Setelah dingin ditetesi dengan cat gram A sebanyak 2-3 tetes dan diamkan selama 1 menit, dicuci dengan air mengalir kemudian kering-anginkan. Selanjutnya menetesi dengan larutan gram B dan biarkan selama 1 menit, mencuci dengan air mengalir dan kering-anginkan. Menetesi dengan larutan gram C selama 30 detik, selanjutnya dicuci dengan air mengalir dan kering-anginkan, kemudian menetesi dengan gram D selama 2 menit, dicuci dengan air mengalir dan kering-anginkan. Setelah itu, mengamati preparat dengan mikroskop, apabila bakteri gram positif berwarna violet dan apabila gram negatif berwarna merah.

f. Uji Aerobisitas

Identifikasi pada medium nutrien cair dengan mengambil 1 ml suspensi *Rhizobakteri Indegenous* yang diinokulasi 2 x 24 jam pada suhu kamar. Pada medium ini diamati pertumbuhan sel yang dihasilkan. Jika koloni tumbuh dipermukaan maka termasuk aerob, jika tersebar maka termasuk fakultatif anaerob, dan jika didasar tabung termasuk aerob.

g. pH

Pengukuran tingkat keasaman atau kebasaan larutan digunakan pH stik.

h. Uji fermentatif (Sukrosa, Glukosa, Amilum)

Untuk mengetahui kemampuan *Rhizobakteri Indegenous* dalam memfermentasi Glukosa, Sukrosa dan Amylum menjadi asam dan gas CO₂ dilakukan dengan menggunakan uji fermentatif. Caranya 10 ml Glukosa, Sukrosa, Amilum diinkubasi 1 ml suspensi *Rhizobakteri* dan tempatkan pada suhu kamar selama 2 x 24 jam, setelah 2 x 24 jam amati perubahan warnanya. Jika warnanya berubah menandakan *Rhizobakteri Indegenous* dapat menghasilkan asam, sedangkan adanya gelembung yang dihasilkan pada durham menandakan dapat menghasilkan CO₂.

i. Uji Motilitas

Pengujian Motilitas ini dilakukan dengan cara melihat motil atau non motil *Rhizobakteri* dapat dilihat apabila selama pengamatan pertumbuhan terdapat koloni yang berpindah letaknya pada medium LB maka termasuk motil, jika tidak pindah maka termasuk non motil.

j. Pembentukan Nitrit, Nitrat dan Amonia

Pengujian Nitrifikasi ini dilakukan dengan cara yaitu: Mengambil 1 ml suspensi biakan murni *Rhizobakteri Indegenous* di campurkan pada medium Nitrat cair diinkubasi selama 2 x 24 jam pada suhu kamar kemudian tempatkan pada cawan porselen sebanyak 2 tetes dan ditambahkan 2 tetes asam Sulfanilat dan Naphthylamin kemudian amati reaksinya berdasarkan perubahan warna.

Sedangkan uji Amonia caranya yaitu dengan melihat perubahan warna merah menjadi biru yang terjadi setelah dipanaskan selama 5 menit jika berubah berarti berbentuk Amonia.

2. Tahap kedua : Re-inokulasi *Rhizobakteri Indegenous* pada akar Padi Menthik.

a. Penyiapan Inokulum dan Aplikasi Inokulum

Penyiapan Inokulum dilakukan dengan cara menumbuhkan masing-masing isolat pada kelompok yang sama untuk inokulum tahan cekaman kekeringan yaitu MA, MB, MC, MD ditumbuhkan bersama pada 50 ml medium Nutrien Cair dalam Erlenmeyer 250 ml dan diinokulasi pada alat penggojog (125 rpm) selama 48 jam pada suhu $\pm 37^{\circ}\text{C}$. Setelah dipanen, inokulum tersebut harus digunakan dalam kondisi segar atau tidak mengalami penyimpanan dalam lemari es. Aplikasi inokulum dilakukan dengan menggunakan gelas ukur. Inokulum diberikan ke dalam *polybag* sebanyak 5 ml . Sementara untuk perlakuan kontrol atau tanpa inokulum, tidak diberikan inokulum.

b. Seleksi Benih

Seleksi benih dimaksudkan untuk mendapatkan benih yang baik dan dapat tumbuh untuk dijadikan bibit. Seleksi benih ini menggunakan larutan garam. Masukkan telur dalam larutan garam hingga terapung Masukkan benih padi Menthik kedalam larutan garam. Benih yang dipakai adalah benih yang tenggelam. Benih yang tenggelam memiliki endosperm yang penuh dan sempurna sehingga dapat tumbuh dengan baik sedangkan gabah yang terapung endosperemnya kurang sempurna karena kurang baik.

c. Penanaman Padi Menthik dengan Kapas Di Laboratorium

Botol jam sudah distrilisasikan. Masukkan kapas yang sudah dibasahi ke dalam botol jam. Benih yang sudah direndam dengan inokulum MA, MB, MC, MD dimasukkan dalam botol jam sesuai perlakuan. Kelembaban padi dalam botol

jam tersebut dijaga. Setelah dua minggu, benih padi diperlakukan lagi dengan inokulum MA, MB, MC, MD. Setelah itu diamati tinggi tanaman, panjang akar, jumlah daun dan berat segar.

d. Penanamana Padi Menthik dengan *Polybag* di *Green House*

Tahap Re-Inokulasi merupakan tahap uji lapangan yang dilakukan dengan metode percobaan *polybag*. Tahapan ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh inokulum biakan murni *Rhizobakteri Indegenous* terhadap pertumbuhan tanaman padi Menthik. Penelitian ini dilakukan selama satu bulan. *Polybag* tersebut diisi dengan pasir abu *vulkanik* Merapi $\pm 1,5$ kg.

1. Persiapan media

Persiapan media dilakukan dengan cara membersihkan pasir abu Merapi dari kerikil-kerikil. Pasir kemudian diayak. Pasir dipisahkan antara yang bertekstur kasar dan lembut. Setelah itu pasir dimasukkan pada *polybag* dengan ukuran 25 x 25 cm. *Polybag* diisi pasir Merapi sebanyak 1,5 kg. *Polybag* yang sudah diisi pasir Merapi di sterilisasi selama 1 atm atau 121° selama 20 menit.

2. Uji Kapasitas Lapang

Uji kapasitas lapangan dimaksudkan untuk mengetahui volume air yang dapat diserap tanah sehingga dengan demikian akan diketahui volume air. Pertama mengambil pasir abu Vulkan Merapi. Pasir diambil secukupnya, pasir dibungkus menggunakan kain kassa. Bungkusan pasir tersebut direndam ke dalam gelas piala yang berisi air selama ± 30 menit, sampai tidak ada lagi gelembung udara yang keluar dari bungkusan. Pasir ditiriskan dengan cara digantung pada statis selama sehari semalam. Pasir yang sudah ditiriskan, diambil

ke dalam botol timbang yang sebelumnya sudah ditimbang kira-kira separuh botol timbang, kemudian ditimbang dengan botol terbuka. Botol timbang tersebut dimasukkan ke dalam oven pada suhu 105-110⁰C selama 4 jam berturut-turut. Botol timbang beserta isinya dimasukkan ke dalam desikator. Menghitung kadar lengas udara.

3. Benih di bibitkan

Benih dibibitkan sampai umur \pm 10-12 hari. Setelah bibit umur 10-12 hari mencabut bibit padi dan bersihkan tanah yang menempel pada akar padi Menthik dengan air. Setelah akar padi Menthik bersih maka merendam bibit padi kedalam inokulum \pm 2 jam. Kemudian bibit padi Menthik ditanam ke dalam *polybag* yang sudah di isi dengan pasir Merapi. Setelah umur 2 minggu bibit padi disiram dengan air mengalir.

4. Penanaman

Benih hasil seleksi direndam terlebih dahulu dengan *Rhizobakteri Indigenous* hasil pemurnian selama \pm 2 jam kemudian ditanam dengan media kapas.

5. Penyiraman

Penyiraman dilakukan dengan frekuensi 2 hari sekali dan 3 hari sekali dijaga agar lembab (sesuai perlakuan) . Macam perlakuannya adalah (A)Tanaman padi + Pupuk Hayati MA disiram 2 hari sekali Pupuk Hayati MA disiram 3 hari sekali, Pupuk Hayati MB disiram 2 hari sekali, Pupuk Hayati MB disiram 3 hari sekali, Pupuk Hayati MC disiram 2 hari sekali, Pupuk Hayati MC disiram 3 hari sekali, Pupuk Hayati MD disiram 2 hari sekali, Pupuk Hayati MD disiram 3 hari

sekali, kontrol disiram 2 hari sekali, kontrol disiram 3 hari sekali isolat tahan cekaman kekeringan. (B) kontrol (tanpa Inokulum). Masing-masing perlakuan diulang tiga kali, sehingga total dibutuhkan 30 *polybag*. Pengamatan dilakukan setelah 2 minggu pemberian inokulum.

6. Pengamatan

Pengamatan ini bertujuan untuk melihat pengaruh dari *Rhizobakteri Indegenous* yang tahan terhadap cekaman kekeringan. Setelah 2 minggu maka dilakukan pengamatan. Pada media kapas pengamatan dilakukan meliputi: panjang akar, berat kering, tinggi tanaman, jumlah daun, jumlah akar. Pada media pasir pengamatan dilakukan meliputi: total mikrobial, panjang akar, berat kering, tinggi tanaman, jumlah daun, jumlah akar.

E. Parameter yang diamati

1. Tahap Pertama: Identifikasi dan Karakterisasi *Rhizobakteri Indegenous* 4 Isolat Lahan Pasir Abu *Vulkanik Merapi*.

- 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 NA.

- c. Bentuk Sel: diamati pada saat pengencatan gram
- d. Sifat Gram: diamati berdasarkan warna yang dihasilkan, jika berwarna merah menunjukkan gram negatif, jika berwarna biru menunjukkan gram positif.
- e. Aerobisitas: diamati berdasarkan pertumbuhan sel yang dihasilkan setelah diinkubasi pada medium Nutrien Cair. Jika koloni tumbuh dipermukaan maka termasuk aerob, jika tersebar maka termasuk fakultatif anaerob, jika didasar tabung termasuk anaerob.
- f. Uji Motilitas : diamati berdasarkan ada tidaknya bakteri yang berjalan dan berada di tengah media.
- g. Uji Fermentatif (glukosa, sukrosa, amilum): diamati berdasarkan perubahan warna indikator menandakan *Rhizobakteri Indegenous* dapat menghasilkan asam, sedangkan adanya gelembung yang dihasilkan pada Durham menandakan dapat menghasilkan CO₂.
- h. 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.

2. Tahap kedua: Re-inokulasi *Rhizobakteri Indegenous* pada Akar Padi Menthik

Re-inokulasi *Rhizobakteri Indegenous* pada tanaman padi Menthik untuk pertumbuhannya meliputi

a. Total mikrobia dengan metode *plating* (cfu / ml)

Total mikrobia dilakukan dengan cara mengambil pasir yang ditanami padi yang sudah diberi isolat tersebut dan dilakukan *plating*. Jika pada *plating* pasir yang sudah ditanami pasir tersebut ada mikrobianya berarti isolat tersebut mampu hidup pada lahan pasir yang tahan terhadap kekeringan, dan bisa dibudidayakan secara luas dilahan pasir

b. Berat Segar Akar (g)

Dengan cara menimbang bagian akar padi dalam keadaan segar.

c. Berat Kering Akar (g)

Pengamatan dilakukan dengan menimbang bagian akar padi yang telah dikering anginkan dan dioven selama 24 jam hingga berat konstan.

d. Berat Segar Tanaman (g)

Cara pengamatan dilakukan dengan menimbang berat segar tanaman, setelah dicabut dan dibersihkan sisa tanah yang menempel pada tanaman tersebut. Alat yang digunakan timbangan analitik, satuan yang digunakan adalah gram.

e. Panjang Akar (cm)

Pengamatan dilakukan pada minggu terakhir. Pengamatan dilakukan dengan menggunakan penggaris untuk mengukur panjang akar dari pangkal sampai ujung akar yang paling panjang.

f. Jumlah Daun (helai)

pengamatan dilakukan hanya dengan menghitung daun yang tumbuh. Pengamatan jumlah daun dilakukan 7 hari sekali selama satu bulan.

g. Tinggi Tanaman (cm)

Pengamatan tinggi pada tanaman padi dilakukan menggunakan penggaris yang diletakkan pada batang padi yang daunnya ditangkupkan. Tinggi tanaman dilakukan setiap 7 hari sekali selama satu bulan.

F. Analisis Data

Data periodik hasil pengamatan disajikan dalam bentuk grafik dan histogram setelah itu dianalisis dan dibandingkan hasil dari masing-masing perlakuan dengan menggunakan sidik ragam pada taraf $\alpha = 5\%$. Apabila beda nyata antar perlakuan yang diujikan, dilakukan uji lanjut DMRT taraf $\alpha 5\%$.