

## **BAB III**

### **METODE PERCOBAAN**

#### **3.1. Tempat dan waktu percobaan**

Percobaan ini dilaksanakan mulai bulan September 2023 hingga bulan Januari 2024 di Laboratorium Mikrobiologi dan Rumah Kaca (*Green House*) Fakultas Pertanian Universitas Siliwangi Kampus Mugarsari Kota Tasikmalaya.

#### **3.2. Alat dan bahan**

Alat yang digunakan dalam percobaan ini diantaranya tabung reaksi, gelas kimia, gelas ukur, erlenmeyer, cawan petri, jarum ose, *cork borer*, pipet, mikropipet, *tube* mikropipet, bunsen, cutter, spatula, kaca objek, *hot plate magnetic stirrer*, inkubator, autoklaf, *laminar air flow cabinet* (LAFC), mikroskop, timbangan analitik, *shaker*, *centrifuge*, *luxmeter*, pinset, aluminium foil, *plastic wrap*, *polybag*, penggaris, alat tulis.

Adapun bahan yang digunakan yaitu isolat mikroba endofit hasil eksplorasi pada penelitian sebelumnya dengan kode Ginseng Jawa (GJ)-1, GJ-2, GJ-3, GJ-4, GJ-5, GJ-6, GJ-7, GJ-8, GJ-9, GJ-10, GJ-11, dan GJ-12, aquadest steril, media *nutrient agar* (NA), media *nutrient broth* (NB), media *pycovskaya agar*, media *alexandrov agar*, media *nitrogen free bromothymol blue* (NFB), media *sulfide indole mortality* (SIM), reagen kovac, *glycine*, asam pikarat, natrium karbonat, air pepton, reagen nessler, media *yeast malt agar* (YMA), media *chrome azurol sulfate* (CAS), tritofan, media *skim milk agar* (SMA), hidrogen peroksida, pati larut, lugol, pektin, *carboxyl methyl cellulose* (CMC), HDTMA, tanah, biji jagung.

#### **3.3. Rancangan percobaan**

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif dan eksperimen untuk menguji karakteristik PGPM dengan uji *in-vitro* dan uji *in-vivo* menggunakan sampel mikroba yang dihasilkan dari penelitian sebelumnya.

Uji *in-vitro* dilakukan dengan uji kuantitatif dan kualitatif sebanyak 3 kali ulangan yaitu mengukur kemampuan mikroba dengan melihat perubahan seperti adanya zona bening maupun perubahan warna secara makroskopis.

Sedangkan uji *in-vivo* dilakukan dilapangan untuk uji evaluasi karakteristik mikroba endofit sebagai PGPM pada pertumbuhan vegetatif tanaman jagung. Adapun rancangan penelitian yang digunakan yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL) sebanyak 5 perlakuan dengan masing masing 5 ulangan, sehingga diperoleh 25 unit percobaan. Setiap ulangan terdiri dari 4 tanaman, sehingga diperoleh 100 tanaman, dengan uraian sebagai berikut:

A= Tanpa mikroba endofit (kontrol)

B= Isolat mikroba endofit GJ-8

C= Isolat mikroba endofit GJ-7

D= Isolat mikroba endofit GJ-4

E= Isolat mikroba endofit GJ-8, GJ-7, dan GJ-4

Semua data yang diperoleh dari hasil pengamatan diproses, selanjutnya dianalisis secara deskriptif. Sementara itu, data hasil pengujian pengaruh isolat mikroba endofit terhadap perkecambahan tanaman jagung dianalisis melalui persamaan Rancangan Acak Lengkap (RAL) sebagai berikut:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

Dengan  $i = 1, 2, \dots, t$  dan  $j = 1, 2, \dots, r$

Keterangan:

$Y_{ij}$  : Pengamatan pada perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

$\mu$  : Rataan umum

$\tau_i$  : Pengaruh perlakuan ke-i

$\varepsilon_{ij}$  : Pengaruh acak pada perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

Data hasil pengamatan selanjutnya dimasukkan kedalam tabel sidik ragam sebagai berikut.

Tabel 1. Sidik Ragam

| Sumber ragam  | Db | JK   | KT                               | F Hitung                          | F Tabel 5% |
|---------------|----|--|----------------------------------|-----------------------------------|------------|
| Perlakuan (p) | 4  | $\frac{\sum x_{ij}^2}{r} - \frac{X^2}{RK}$ | JK <sub>k</sub> /db <sub>k</sub> | KT <sub>k</sub> / KT <sub>g</sub> | 2,87       |
| Galat (g)     | 20 | Jktotal – Jkk                              | JK <sub>g</sub> /db <sub>g</sub> |                                   |            |
| Total (T)     | 24 | $\sum X_{ij}^2 - \frac{X^2}{rk}$           |                                  |                                   |            |

Sumber: Gomez dan Gomez (2015)

Kaidah pengambilan keputusan berdasarkan pada nilai  $F_{hitung}$  dapat dilihat pada Tabel berikut:

Tabel 2. Kaidah Pengambilan Keputusan

| Hasil analisa           | Kesimpulan analisa  | Keterangan         |
|-------------------------|---------------------|--------------------|
| $F_{hit} \leq F_{0,05}$ | Berbeda tidak nyata | Tidak ada pengaruh |
| $F_{hit} > F_{0,05}$    | Berbeda nyata       | Ada pengaruh       |

Sumber: Gomez dan Gomez (2015)

Jika berpengaruh nyata, maka dilakukan uji lanjut dengan uji jarak berganda Duncan pada taraf nyata 5% dengan rumus sebagai berikut:

$$LSR = SSR (\alpha \cdot dbg \cdot p) \cdot S_x$$

$$S_x = \sqrt{\frac{KT \text{ Galat}}{r}}$$

Keterangan:

LSR : *Least Significant Range*

SSR : *Significant Stuendrized Range* (dilihat dari tabel Db galat 20 taraf 5%)

$\alpha$  : Taraf nyata

dbg : Derajat bebas galat

$p$  : *Range* (perlakuan)

$S_x$  : Galat baku rata-rata (Standard error)

$r$  : Jumlah ulangan pada tiap nilai tengah perlakuan yang dibandingkan

KTG : Kuadrat tengah galat

### 3.4. Prosedur penelitian

#### 3.4.1. Uji karakteristik mikroba endofit secara *in-vitro*

##### 1. Sterilisasi alat

Alat-alat berbahan kaca yang akan digunakan dalam penelitian di laboratorium dicuci terlebih dahulu, kemudian dibungkus dengan kertas dan plastik. Sterilisasi menggunakan autoklaf dengan tekanan 1 atm dan suhu 121°C selama 15-20 menit. Sedangkan alat-alat yang tidak tahan panas dapat disterilkan dengan alkohol 70% dengan tujuan untuk mengeliminasi kontaminasi alat.

##### 2. Pembuatan media

Medium yang digunakan untuk memperbanyak isolat mikroba yaitu media cair dan media padat. Untuk media padat menggunakan *nutrient agar* (NA) dan untuk media cair menggunakan *nutrient broth* (NB). Medium selektif yang digunakan untuk menguji isolat mikroba pelarut fosfat menggunakan media *pycovskaya agar*, untuk menguji pelarut kalium menggunakan *alexandrov agar*, untuk menguji fiksasi N menggunakan media *nitrogen free bromothymol blue* (NFB), untuk menguji produksi HCN menggunakan *nutrient agar* (NA) ditambah dengan *glycine*, untuk menguji produksi ammonia menggunakan kaldu air pepton, uji siderofor menggunakan media *chrome azurol sulfate* (CAS), uji produksi IAA dengan agar *sulfide indole mortality* (SIM), uji aktivitas enzim proteasi dengan *skim milk agar* (SMA), uji aktivitas enzim katalase dengan hidrogen peroksida, uji aktivitas enzim amilase dengan agar YM-Pati larut 1%, uji aktivitas enzim pektinase dengan YM-Pektin 1%, uji produksi enzim selulase dengan *carboxyl methyl cellulose* (CMC).

Adapun cara pembuatan media yaitu dengan menimbang kebutuhan bahan kemudian melarutkannya dalam 1 liter aquadest steril, dan dipanaskan menggunakan *hot plate*. Setelah mendidih dan larut, media kemudian disterilkan menggunakan autoklaf.

##### 3. Penyiapan dan peremajaan isolat mikroba

Penelitian ini menggunakan isolat mikroba endofit hasil eksplorasi dari akar tanaman ginseng jawa dengan kode GJ-1, GJ-2, GJ-3, GJ-4, GJ-5, GJ-6, GJ-7,

GJ-8, GJ-9, GJ-10, GJ-11, dan GJ-12 yang tersedia di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Pertanian Universitas Siliwangi. Mikroba endofit diperbanyak dengan cara menanam kembali pada media padat *Nutrient agar* (NA).

#### 4. Uji karakteristik mikroba endofit

Pengujian karakteristik mikroba endofit dilakukan secara kualitatif dan kuantitatif dengan melihat perubahan yang terjadi dan mengukur diameter zona bening yang telah diinkubasi minimal 24 jam dalam suhu ruangan. Menurut Sudewi dkk., (2020) zona bening dapat diukur dan dihitung dengan rumus sebagai berikut.

$$\text{Indeks Potensial} = \frac{\text{Diameter koloni} + \text{Diameter zona bening}}{\text{Diameter koloni}}$$

Metode-metode yang digunakan untuk tiap pengujian masing-masing karakteristik adalah sebagai berikut.

##### a. Uji potensi pelarut fosfat

Pengujian kemampuan mikroba pelarut fosfat dilakukan pada media *Pycovskaya* yang menunjukkan adanya aktivitas pelarutan fosfat. Kultur endofit ditumbuhkan dalam media NA. Selanjutnya mikroba dilakukan pengujian menggunakan metode sumur pada media *Pikovskaya* dan diinkubasi selama 4 hari pada suhu ruang (Susanti dkk., 2021). Pelarutan fosfat dengan mendegradasi  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  sebagai sumber fosfatnya yang dibebaskan ke media oleh mikroba di sekitar koloni, dengan menghitung luas indeks zona bening (zona halo) di sekitar koloni, dimana semakin tinggi indeks zona bening maka kemampuan mikroba dalam melarutkan fosfat semakin tinggi. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya zona bening yang mengindikasikan bahwa isolat mikroba mampu melarutkan fosfat (Nugraha dkk., 2014).

Bahan yang digunakan untuk uji pelarut fosfat dengan membuat medium *pikovskaya* sebanyak 1 L yaitu glukosa 10 g, NaCl 0,2 g, KCl 0,2 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,1 g,  $\text{MnSO}_4$  0,002 g,  $\text{FeSO}_4$  0,002 g,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  5g, ekstrak yeast 0,5 g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,5 g, dan agar 15 g. Semua bahan dilarutkan dalam 1 L aquadest steril dan dihomogenkan. Medium tersebut disterilisasi

menggunakan autoklaf pada tekanan 1 atm dengan suhu 121°C selama 20 menit (Rani, 2017).

b. Uji potensi pelarut kalium (potasium)

Media *Aleksandrov* untuk uji pelarut kalium dengan membuat media sebanyak 1 L dengan bahan yang digunakan berupa glukosa 5 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,5 g, FeCl<sub>3</sub> 0,006 g, CaCO<sub>3</sub> 0,1 g, Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 2 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3 g, agar 15 g. Semua bahan dilarutkan dalam 1 L aquadest steril dan dihomogenkan. Medium tersebut disterilisasi menggunakan autoklaf pada tekanan 1 atm dengan suhu 121°C selama 20 menit (Mutmainnah dkk, 2015).

Inokulasi dilakukan dengan metode *cock borer*/ sumur. Inkubasi pada suhu ruang selama 2 hari dan lakukan pengamatan. Mikroba yang tumbuh dan mampu membentuk zona bening diasumsikan sebagai mikroba pelarut kalium.

c. Uji potensi fiksasi N

Media yang digunakan untuk menguji potensi fiksasi N adalah *nitrogen-free bromothymol blue* (NFB) dengan konsentrasi sukrosa 10 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.6 g, MgSO<sub>4</sub> 0.20 g, NaCl 0.2 g, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1 g, CaCO<sub>3</sub> 2.0 g, 2.0 ml dari 0.5% *Bromothymol blue* dan dilarutkan dalam 1 L aquadest steril. Mikroba yang dapat tumbuh dalam media NFB dan menimbulkan perubahan warna diidentifikasi sebagai mikroba pemfiksasi nitrogen (Satu dkk., 2014).

d. Uji produksi HCN

Untuk menguji mikroba dalam produksi HCN dilakukan dengan menyaring isolat dengan menggunakan metode Lorck. Secara singkat, *nutrient agar* ditambah dengan 4,4 g Glycine/L dan isolat digoreskan pada pelat agar yang dimodifikasi. Setiap cawan petri dilapisi kertas whatman yang diresapi dengan asam pikrat 0,5% dan natrium karbonat 2%. Pelat ditutup dengan parafilm dan diinkubasi pada suhu 28°C selama 24 jam. Perubahan warna dari kuning menjadi warna oranye-cokelat pada kertas saring merupakan Indikator produksi HCN (Ghorpade dkk., 2023).

e. Uji produksi ammonia

Kemampuan strain mikroba endofit untuk memproduksi ammonia diuji dalam kaldu air pepton. Setiap strain mikroba diinokulasi ke dalam tabung berisi 10

ml air pepton dan diinkubasi pada suhu 33°C selama 48 jam. Pada akhir masa inkubasi, sekitar 0,5 ml reagen Nessler ditambahkan ke media kaldu kultur. Perkembangan menjadi warna kuning merupakan indikator mikroba endofit memproduksi ammonia (Abdel-Hamid dkk., 2021).

f. Uji potensi penghasil siderofor

Sekresi siderofor dianalisis secara kualitatif menggunakan media  $MgSO_4$  1,5 g, Agar, 15 g, 1 L aquadest steril ditambah dengan *chrome azurol S* (CAS), larutan  $Fe^{3+}$ , dan *hexadecyltrimethylammonium bromide* (HDTMA) sebagai indikator. Persiapan indikator dicapai sebagai berikut: 60,5 mg CAS dilarutkan dalam 50 ml aquadest steril, diikuti dengan pencampuran dengan 10 ml  $Fe^{3+}$  larutan (1 mmol  $L^{-1}$  dilarutkan dalam 10 mmol  $L^{-1}$  HCl). Dalam kondisi pengadukan, campuran sebelumnya diteteskan dan ditambahkan ke dalam larutan HDTMA (72,9 mg HDTMA dilarutkan dalam 40 ml  $H_2O$  sulingan). Indikator yang telah disiapkan ditambahkan pada media dengan perbandingan 1:15. Kultur mikroba segar ditotolkan pada piringan agar dan diinkubasi pada suhu 28°C selama 72 jam. Munculnya halo oranye di sekitar pertumbuhan mikroba endofit menunjukkan produksi siderofor yang positif (Morales dkk., 2021).

g. Uji potensi penghasil IAA

Untuk mendeteksi produksi IAA oleh isolat mikroba dilakukan dengan menginokulasi mikroba ke dalam media agar *sulfide indole motility* (SIM) dengan takaran 36,23 gram dalam 1 L aquadest steril. Setelah inkubasi, keberadaan indole dideteksi dengan menambahkan dua hingga tiga tetes reagen Kovac ke dalam kultur masing-masing isolat selama 48 jam dalam tabung reaksi yang berisi mikroba. Berkembangnya lapisan warna merah jambu/merah seperti cincin ceri menunjukkan produksi indole asam asetat (Siddiqui dkk., 2021).

h. Uji potensi produksi enzim protease

Untuk menguji aktifitas proteolitik mikroba ditumbuhkan dalam media *Skim Milk Agar* (SMA). Komposisi media adalah 51,5 gram dalam 1 L aquadest steril. Terbentuknya zona bening di sekitar koloni mikroba endofit

menunjukkan aktivitas mikroba tersebut dalam menghasilkan enzim protease (Susanti dkk., 2021).

i. Uji potensi produksi enzim katalase

Untuk aktivitas katalase, setetes hidrogen peroksida (3%) ditambahkan ke koloni terisolasi endofit dan diamati pembentukan oksigennya. Gelembung yang kuat menunjukkan reaksi katalase yang kuat (Khalil dkk., 2021).

j. Uji potensi produksi enzim amilase

Aktivitas amilase diuji dengan menumbuhkan isolat pada media agar YM yang ditambah dengan pati larut 1%. Setelah masa inkubasi 48 jam, pelat ditetesi dengan larutan lugol 10%, sebanyak 1-2 tetes. Munculnya zona bening di sekitar pertumbuhan mikroba menandakan adanya aktivitas amilolitik (Fouda dkk., 2015).

k. Uji potensi produksi enzim pektinase

Uji aktivitas pektinolitik dilakukan dengan menumbuhkan mikroba dalam media yang mengandung Pektin-YM 1%. Setelah masa inkubasi selama 48 jam, pelat dibanjiri dengan larutan *heksadesil trimetil amonium bromide* 1%. Zona bening yang terbentuk di sekitar koloni mikroba menunjukkan adanya aktivitas pektinase (Fouda dkk., 2015).

l. Uji potensi produksi enzim selulase

Pengujian mikroba aktivitas selulolitik dilakukan skrining secara kualitatif ditumbuhkan pada media selektif CMC (*Carboxyl Methyl Cellulose*) dengan takaran  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,02 g,  $KNO_3$  0,075 g, CMC 1 g,  $K_2HPO_4$  0,05 g,  $FeSO_4$  0,002 g,  $CaCl_2$  0,004 g, ekstrak khamir 0,2 g, agar 1,8 g, glukosa 0,1 g, dilarutkan dalam 1 L aquadest steril. Suspensi dikultur pada suhu kamar (29°C) selama 3 hari diamati zona bening disekitarnya (Suyanto dkk., 2012). Jika mikroba tersebut mampu tumbuh maka terbukti dapat memanfaatkan selulosa sebagai salah satu sumber nutrisi terutama sebagai unsur karbon, adanya zona bening pada sekitar koloni merupakan indikasi awal untuk mengetahui kemampuan mikroba dalam mendekomposisi selulosa. Semakin luas zona bening yang terbentuk, secara kualitatif dianggap potensi mikroba selulolitik semakin besar (Susanti dkk., 2021).

### 3.4.2. Uji karakteristik mikroba endofit secara *in-vivo*

#### 1. Pembuatan suspensi isolat mikroba terbaik

Mikroba dengan hasil terbaik dari uji karakteristik sebagai PGPM (*Plant Growth Promoting Microbes*) dipilih untuk selanjutnya dilakukan pengujian pada tanaman jagung. Untuk penyiapan suspensi isolat dengan jenis mikroba endofit terpilih dilakukan dengan menumbuhkan mikroba selama 48 jam dan diinkubasi menggunakan *shaker* kemudian di *centrifuge* untuk memisahkan mikroba dan media. Selanjutnya mikroba disuspensikan dengan menambahkan 10 ml aquadest steril, kemudian aduk, dan masukan ke dalam tabung reaksi. Konsentrasi suspense mikroba endofit yang digunakan untuk perendaman benih yaitu  $10^8$ – $10^{10}$  CFU ml<sup>-1</sup> (Munif dkk, 2015).

#### 2. Perlakuan benih

Benih jagung disterilisasi permukaannya dengan alkohol 70% selama 1-2 menit, kemudian dibilas tiga kali dengan aquadest steril, lalu ditiriskan. Sebagai kontrol, benih hanya disterilisasi permukaannya dan tidak direndam dengan suspensi mikroba endofit. Setelah benih ditiriskan, benih direndam selama 12 jam menggunakan air steril kemudian direndam dalam suspensi mikroba endofit yang telah dipersiapkan sebelumnya selama 30 menit.

#### 3. Penyiapan lahan

Lahan yang digunakan untuk menumbuhkan tanaman jagung dengan 6 perlakuan dan 5 ulangan dalam *polybag* berdiameter 25 cm dengan diberi jarak 20 cm x 15 cm pada *Green house* yang ada di Fakultas Pertanian Universitas Siliwangi.

## 3.5. Variabel pengamatan

### 3.5.1. Pengamatan penunjang

Pengamatan penunjang dilakukan untuk mengetahui faktor-faktor dari eksternal yang dapat mempengaruhi jalannya penelitian. Pengamatan penunjang merupakan pengamatan yang dilakukan terhadap variabel yang datanya tidak diuji secara statistik, diamati untuk mengetahui kemungkinan adanya pengaruh eksternal selain pemberian perlakuan. Pengamatan penunjang yang dilakukan meliputi.

a. Suhu

Pengamatan dilakukan dengan mengukur suhu ( $^{\circ}\text{C}$ ) ruang *green house* pada pagi, siang, dan sore hari.

b. Intensitas cahaya (lux)

Pengamatan dilakukan dengan mengukur intensitas cahaya menggunakan *luxmeter* pada pagi hari dan siang hari.

c. Hama

Pengamatan dilakukan terhadap jenis hama yang menyerang tanaman jagung di tempat percobaan.

d. Jenis gulma

Pengamatan dilakukan dengan mencatat terhadap jenis gulma yang tumbuh dominan di sekitar tanaman jagung.

### 3.5.2 Pengamatan utama

Pengamatan utama adalah pengamatan yang dilakukan pada setiap variabel dan data yang dihasilkan dianalisis secara statistik untuk mengetahui pengaruh dari setiap perlakuan yang diteliti. Dilakukan dengan menguji pada masa vegetatif awal pertumbuhan jagung selama 21 hari setelah tanaman (HST).

a. Tinggi tanaman (cm)

Pengamatan tinggi tanaman dilakukan dengan mengukur tanaman dari pangkal batang hingga ujung daun pada fase vegetatif. Pengukuran dilakukan pada umur 7, 14 dan 21 HST.

b. Panjang akar (cm)

Pengukuran panjang akar dilakukan pada akar terpanjang tanaman jagung yang telah dibersihkan pada umur 21 HST.

c. Bobot basah brangkasan (gram)

Bobot basah brangkasan dilakukan pada umur 21 HST yaitu dengan cara menimbang seluruh bagian tanaman.

d. Bobot kering brangkasan (gram)

Bobot kering brangkasan dilakukan pada 21 HST dengan menimbang seluruh bagian tanaman setelah brangkasan dikeringkan menggunakan oven bersuhu  $50^{\circ}\text{C}$  selama 48 jam (setelah diperoleh bobot yang konstan).