

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1. Waktu dan tempat penelitian**

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Tanah dan Tanaman serta rumah kaca, Balai Penelitian Tanaman Industri dan Penyegar (Balittri) Jalan Raya Pakuwon Km. 2 Kecamatan Parung Kuda, Kabupaten Sukabumi, Provinsi Jawa Barat kode pos 43357. Penelitian berlangsung dari bulan Januari sampai April 2021.

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

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah autoklaf, oven, *laminar air flow*, *ependorf tube*, *colony counter*, *growth chamber*, mikroskop, gelas objek, penggaris, neraca analitik, *hot plate*, *magnetic stirrer*, tabung reaksi, rak tabung reaksi, tabung ukur, gelas ukur, labu erlenmeyer, cawan petri, pipet tetes, mikropipet, mikro tips, jarum inokulasi, jarum suntik, gelas objek, plastik, *polybag* semai, keranjang plastik, ember, lampu bunsen, korek, pinset, botol sampel tanah, botol kaca, spatula, gunting, *vortex*, *shaker*, *wrap plastic*, *aluminium foil*, *hygrometer*, kapas, kertas saring, karet gelang, lap dan alat tulis serta alat dokumentasi.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel tanah gambut dari Kabupaten Tanjung Jabung Barat Provinsi Jambi, media *Nutrient Agar* (NA), media *Nutrient Broth* (NB), *Pikovskaya Agar* (5,0 g/L  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , 0,2 g/L NaCl, 0,2 g/L KCl, 0,1 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2,5 mg/L,  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2,5 mg/L  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,5 g/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 10,0 g/L glukosa, 0,5 g/L ekstrak khamir, 20,0 g/L agar). *Blood Agar*, gliserol, tanaman tembakau, isolat bakteri, tanah steril, benih cabai, minyak imersi, akuades steril, larutan fisiologis (NaCl 0,85%) dan alkohol 70% serta alkohol 96%.

#### **3.3. Metode penelitian**

Penelitian yang telah dilaksanakan meliputi dua tahapan. Pertama penelitian yang bersifat eksplorasi, sehingga metode penelitian yang digunakan yaitu metode deskriptif. Bahan eksplorasi yaitu tanah gambut dari Kabupaten Tanjung Jabung Barat Provinsi Jambi yang diisolasi untuk mendapatkan rizobakteri *indigenous* dan

diseleksi dengan menggunakan uji patogenitas. Selanjutnya, tahapan penelitian kedua. Isolat bakteri non-patogen, diuji kelarutan fosfat dan dianalisis kandungan fitohormon serta diuji kemampuan dalam memacu tumbuh tanaman yang diinokulasikan pada benih cabai (*Capsicum annum* L.) dengan metode penelitian eksperimental Rancangan Acak Kelompok (RAK), terdiri dari 13 perlakuan (12 isolat non-patogen dan 1 perlakuan kontrol) serta 3 ulangan, dengan memenuhi persamaan berikut:

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

Dimana  $t$  = jumlah perlakuan

$r$  = jumlah ulangan

Setiap plot percobaan terdiri dari 6 *polybag*, sehingga keseluruhan benih yang disemai ialah  $t \times r \times 6$  (234 benih cabai) dengan tata letak percobaan (Lampiran 4).

Aplikasi perlakuan dalam penelitian ini yaitu :

$P_0$  = Kontrol (NB 1 ml)

$P_1$  = Isolat 1 (1 ml NB + isolat 1)

dan seterusnya sampai isolat ke-12.

### 3.4. Analisis data

Data diperoleh dengan cara mengumpulkan dan mengamati hasil dari semua proses isolasi, uji patogenitas, uji kelarutan fosfat dan analisis kandungan fitohormon, selanjutnya dianalisis secara deskriptif oleh peneliti. Data hasil pengamatan uji kemampuan dalam memacu pertumbuhan benih cabai dianalisis untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap variabel yang diamati dengan ANOVA atau sidik ragam menggunakan uji F.

Model linier rancangan acak kelompok sederhana adalah sebagai berikut :

$$Y_{ij} = \mu + t_i + r_j + \epsilon_{ij}$$

Keterangan :

$Y_{ij}$  : nilai pengamatan dari perlakuan ke  $-i$  dan kelompok ke  $-j$

$\mu$  : nilai rata-rata umum

$t_i$  : pengaruh perlakuan ke  $-i$

$r_j$  : pengaruh kelompok ke  $-j$

$\epsilon_{ij}$  : pengaruh faktor random terhadap perlakuan ke  $-i$  dan kelompok ke  $-j$

Tabel 1. Daftar sidik ragam

Sumber Ragam	Db	JK	KT	F hitung	Ftab 5%
Kelompok	$v1 = k - 1$	JKK	$JKK / v1$	$KTK / KTG$	$(v1, v3)$
Perlakuan	$v2 = (t-1)$	JKP	$JKP / v2$	$KTP / KTG$	$(v2, v3)$
Galat	$v3 = (vt - v1 - v2)$	JKG	$JKG / v3$		
Total	$kt - 1 = vt$	JKT			

Sumber : (Gomez dan Gomez, 2010)

Tabel 2. Kaidah pengambilan keputusan

Hasil Analisa	Kesimpulan Analisa	Keterangan
$F_{hit} \leq F_{0,05}$	Tidak Berbeda Nyata	Tidak Ada Perbedaan Pengaruh Antar Perlakuan
$F_{hit} > F_{0,05}$	Berbeda nyata	Ada Perbedaan Pengaruh Antar Perlakuan

Sumber : (Gomez dan Gomez, 2010)

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

$$LSR = SSR \cdot S\bar{x}$$

$$SSR (\alpha, dbg, p)$$

$$S\bar{x} = \frac{\sqrt{KT \text{ Galat}}}{r}$$

Keterangan :

$S\bar{x}$  : Galat baku rata-rata (*Standard Error*)

KTG : Kuadrat tengah galat

r : Jumlah ulangan pada tiap nilai tengah perlakuan yang dibandingkan

SSR : *Significant Studentized Range* (dilihat dari tabel dengan db Galat,  $\alpha = 5\%$ )

$\alpha$  : Taraf nyata

*dbg* : Derajat bebas galat

*p* : Range ( Perlakuan)

*LSR* : *Least Significant Range*

### 3.5. Prosedur penelitian

#### 3.5.1. Sterilisasi

Alat dan media yang digunakan dalam laboratorium dilakukan sterilisasi menggunakan dua metode sterilisasi. Metode panas lembab untuk Sterilisasi media di autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit. Metode panas kering dilakukan

pada beberapa peralatan yang terbuat dari gelas menggunakan oven dengan suhu efektif 160°C selama 2 jam (Hajoeningtjas, 2012).

#### 3.5.2. Pengambilan sampel tanah

Pengambilan sampel tanah di sekitar daerah perakaran tanaman kopi liberika di perkebunan Tanjung Jabung Barat, Provinsi Jambi, Lat 0°59'14"S dan Long 103°22'36"(Lampiran 1). Cara pengambilan sampel tanah secara komposit sampai 500 g, lalu dimasukkan ke dalam plastik sampel untuk dibawa dan disimpan di Laboratorium.

#### 3.5.3. Isolasi sampel tanah

Metode yang dilakukan pada sampel tanah yaitu metode pengenceran  $10^{-1}$  sampai  $10^{-6}$ . Sebanyak 10 g sampel tanah dimasukkan kedalam 90 ml NaCl 0.85%, lalu dihomogenkan menggunakan *vortex* sehingga diperoleh tingkat pengenceran pertama ( $10^{-1}$ ). Selanjutnya diambil 1 ml dari pengenceran  $10^{-1}$  kemudian dimasukkan kedalam tabung reaksi yang berisi 9 ml NaCl 0.85%, lalu dihomogenkan menggunakan *vortex* sehingga diperoleh tingkat pengenceran kedua ( $10^{-2}$ ). Pengenceran tersebut dilakukan sampai diperoleh pengenceran keenam ( $10^{-6}$ ). Selanjutnya diambil 1 ml dari setiap tabung reaksi hasil pengenceran  $10^{-4}$  sampai  $10^{-6}$  dituang ke dalam cawan petri dan ditambahkan media NA (Rahmayuni, *et al.*, 2018). Masing-masing taraf pengenceran yang diambil sebanyak dua kali ulangan. Cawan diinkubasi dalam suhu ruang selama 48 jam (Lampiran 2).

#### 3.5.4. Pembuatan biakan murni

Reisolasi merupakan proses pemindahan isolat dari satu biakan ke media baru. Biakan murni dibuat dengan mengambil koloni bakteri pada sampel yang telah diisolasi menggunakan jarum ose dan dibiakkan pada cawan petri yang telah diisi media NA (Lampiran 2). Pembuatan biakan murni dilakukan di dekat api bunsen untuk meminimalisir kontaminasi yang mungkin terjadi (Priyanta, Proborini dan Dalem, 2019).

Koloni bakteri yang tumbuh diamati karakteristik morfologinya, yaitu ukuran koloni, bentuk koloni, elevasi koloni, tepi koloni dan warna koloni. Jumlah koloni yang tumbuh dihitung dengan menggunakan *colony counter* dengan metode *Total Plate Count* (TPC). Perhitungan jumlah mikroba dianggap valid, apabila dalam

satu cawan tumbuh koloni sebanyak 30 sampai 300 (Lampiran 3). Rumus menghitung populasi bakteri menggunakan SNI-01-2332-2006 yaitu sebagai berikut :

$$\text{Koloni per mL} \left( \frac{\text{CFU}}{\text{mL}} \right) = \text{Jumlah koloni} \times \frac{1}{\text{faktor pengenceran} \times \text{Jumlah yang ditumbuhkan}}$$

Keterangan :

Jumlah yang ditumbuhkan adalah volume yang dimasukkan dalam cawan petri (0,1 ml atau 1 ml).

#### 3.5.5. Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram dilakukan dengan cara membersihkan gelas objek dengan alkohol 70% sehingga bebas lemak, kemudian dipanggang di atas nyala bunsen. Preparat bakteri dibuat dengan mengambil secara aseptik 1 ose biakan bakteri lalu diratakan di atas permukaan gelas objek kira-kira seluas 1 cm<sup>2</sup>. Olesan bakteri diberi 2 sampai 3 tetes pewarna kristal violet (Gram A) dan dibiarkan selama 1 menit. Zat warna berlebih dicuci dengan air mengalir dan dikering anginkan. Olesan bakteri digenangi dengan larutan iodin (Gram B), dibiarkan selama 1 menit. Zat warna berlebih dicuci dengan air mengalir dan dikering anginkan. Olesan dicuci dengan larutan alkohol 95% (Gram C) selama 30 detik. Zat pewarna berlebih dibilas dengan air mengalir dan dikering anginkan. Olesan diberi pewarna safranin (Gram D) selama 45 detik sampai 1 menit, dicuci dengan air mengalir dan dikering anginkan. Preparat diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran kuat (100x) menggunakan minyak emersi. Bakteri Gram negatif berwarna merah, sedangkan Gram positif berwarna ungu (Cappucino dan Welsh, 2014).

#### 3.5.6. Uji patogenitas

##### a. Uji hipersensitivitas pada tanaman tembakau

Uji hipersensitivitas dilakukan dengan mengikuti prosedur yang dipublikasikan oleh (Zou, *et al.*, 2006). Sebanyak 0,5 ml suspensi bakteri disuntikkan melalui permukaan bawah daun menggunakan alat suntik steril tanpa jarum. Sebagai kontrol negatif daun diinfiltrasi dengan 0,5 ml NB steril, sedangkan kontrol positif daun tembakau yang diinfiltrasi dengan isolat *Ralstonia solanacearum*. Reaksi patogenitas pada tanaman ditandai dengan adanya gejala

nekrotik yang muncul pada jaringan daun dan diamati pada hari kedua (48 jam) setelah infiltrasi.

b. Uji aktivitas hemolitik

Uji patogenisitas isolat juga dilakukan berdasarkan uji hemolisis pada medium *Blood Agar* (3 g/L *beef extract*, 5 g/L pepton, 5% v/v (volume/volume) darah domba, 20 g/L agar) sesuai dengan yang dilakukan oleh Pratiwi (2019) yang mengacu pada penelitian Tarshis dan Frisch (1951). Uji aktivitas hemolitik ini dilakukan untuk mengetahui potensi isolat sebagai patogen pada hewan mamalia. Kultur murni isolat diinokulasikan pada media *Blood Agar* sebanyak dua ulangan dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu ruang. Reaksi patogenisitas pada mamalia ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekeliling koloni.

3.5.7. Uji kelarutan fosfat

Uji kelarutan fosfat dilakukan secara kualitatif menggunakan media *Pikovskaya Agar* (*yeast extract* 0,5 g/L, *dextrose* 10 g/L, *calcium phosphate* 5g/L, *ammonium sulphate* 0.5 g/L, *potassium chloride* 0.2 g/L, *magnesium sulphate* 0.1 g/L, *manganese sulphate* 0.0001 g/L, *ferrous sulphate* 0,0001 g/L, agar 15 g/L). Media uji dimasukkan dalam cawan petri dan dibiarkan mengeras. Setiap isolat bakteri ditumbuhkan pada media uji dengan 2 ulangan agar didapatkan rata-rata hasil yang valid. Inkubasi dilaksanakan selama 7 hari. Mikroba pelarut fosfat yang membentuk *holozone* (zona bening) paling cepat dengan diameter paling besar di sekitar koloni menunjukkan besar kecilnya potensi bakteri pelarut fosfat dalam melarutkan unsur P dari bentuk yang tidak terlarut (Sembiring, Ramadhan dan Purba, 2020).

3.5.8. Uji kecepatan tumbuh benih

Pengamatan terhadap pertumbuhan benih cabai dilakukan setiap 24 jam (etmal) sampai akhir pengujian benih (14 hari). Media tanam yang digunakan adalah kapas yang disimpan di atas cawan petri dan dibungkus dengan plastik serta diikat dengan karet lalu disimpan di dalam *growth chamber* selama pengujian. Satu perlakuan terdiri dari 30 benih cabai, yang diplotkan pada 3 kali ulangan. Aplikasi perlakuan yaitu dengan cara merendam biji pada masing-masing isolat yang terseleksi sebanyak 10 ml isolat dalam media NB untuk tiap perlakuan selama 1

jam. Kecepatan tumbuh benih merupakan jumlah dari kecepatan tumbuh harian. Kecepatan tumbuh harian adalah persentase kecambah yang tumbuh normal setiap 24 jam (%KN/etmal) (Widajati, *et al.*, 2012). Kecepatan tumbuh dihitung dengan rumus berikut :

$$\text{Kecepatan tumbuh} = \sum_{i=0}^{i=n} \% \frac{Kn}{etmal}$$

### 3.5.9. Uji pertumbuhan tanaman

#### a. Persiapan media tanam

Media semai berupa tanah yang disterilkan dengan menggunakan autoklaf selama 1 jam, kemudian didinginkan selama 15 menit. Setelah disterilkan, tanah dikeringkan di ruangan tertutup dengan sirkulasi udara yang baik, setelah itu tanah dimasukkan ke dalam *polybag* semai (Hidayat, Supriyadi dan Sarjiyah, 2015). *polybag* yang digunakan berukuran 4 cm x 6 cm.

#### b. Persiapan benih

Benih cabai yang digunakan adalah benih yang sehat dan tidak memiliki cacat secara morfologi. Benih cabai direndam dengan air hangat selama 1 jam, lalu dikering anginkan dalam *laminar air flow* (Syamsuddin, 2010).

#### c. Aplikasi perlakuan

Aplikasi perlakuan dilakukan pada media tanam sebelum penanaman dan setelah 14 hari tanam, masing- masing sebanyak 1 ml per tanaman.

#### d. Penyemaian

Benih ditanam dalam *polybag* ukuran 4 cm x 6 cm, dibuat lubang semai 0.5 cm dan ditutup dengan tanah halus.

#### e. Pemeliharaan

Pemeliharaan berupa penyiraman yang dilakukan setiap hari sekali atau disesuaikan dengan kondisi kelembaban tanah.

### 3.5.10. Analisis kandungan fitohormon

Isolat rizobakteri *indigenous* yang terseleksi dan mempunyai kemampuan dalam melarutkan fosfat serta dapat memacu tumbuh tanaman yang nilai potensinya tinggi (5 besar), maka dilakukan analisis kandungan fitohormon. Sel bakteri diinokulasikan sebanyak satu ose pada 10 ml media NB, diinkubasikan selama 8 hari pada suhu kamar. Penetapan dilakukan dengan *High Performance Liquid*

*Chromatography* (HPLC) dengan menggunakan kolom Aminex ®HPX-87H, 300 mm x 7,8 mm pada suhu 35°C (Sembiring, Ramadhan dan Purba, 2020). Pengujian dilakukan di Laboratorium Residu Bahan Agrokimia, Bogor.

### 3.6. Parameter pengamatan

#### 3.6.1. Pengamatan penunjang

Pengamatan penunjang adalah pengamatan yang dilakukan terhadap variabel yang datanya tidak diuji secara statistik untuk menunjang data penelitian. Variabel tersebut yaitu isolasi, identifikasi bakteri dan uji patogenitas.

##### a. Identifikasi isolat bakteri

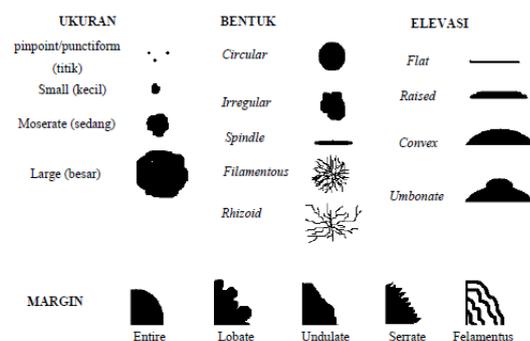
Bakteri yang telah diisolasi kemudian dikarakterisasi dan diidentifikasi.

Karakterisasi yang dilakukan meliputi :

##### 1) Pengamatan makroskopik

Karakteristik koloni bakteri hasil isolasi yaitu :

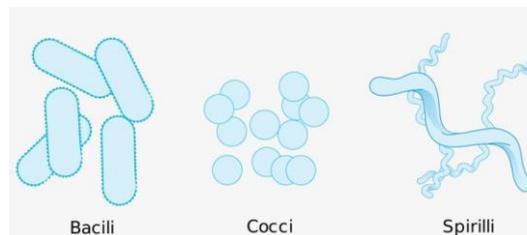
- a) Bentuk koloni (dilihat dari atas) : berupa titik-titik, bulat, berbenang, tak teratur, serupa akar, serupa kumbaran.
- b) Permukaan koloni (dilihat dari samping) : rata, timbul-datar, melengkung, membukit, serupa kawah.
- c) Tipe koloni (dilihat dari atas) : utuh, berombak, berbelah, bergerigi, berbenang, keriting.
- d) Warna koloni : keputih-putihan, kelabu, kekuning-kuningan atau hampir bening.
- e) Ukuran koloni : titik, kecil, sedang, besar.



Gambar 1. Morfologi bakteri  
Sumber : (Hermawan, 2018)

## 2) Pengamatan mikroskopik

Pengamatan mikroskopik dilihat untuk menentukan jenis bakteri (bakteri gram positif/bakteri gram negatif) melalui pewarnaan gram dan untuk melihat bentuk bakteri secara mikroskopis (kokus/basil/spiral).



Gambar 2. Bentuk bakteri secara mikroskopis  
Sumber : (Pngkey, 2018)

### 3.6.2. Pengamatan utama

Pengamatan utama meliputi uji kelarutan fosfat, analisis kandungan fitohormon dan uji pertumbuhan terhadap tanaman cabai. Pada pengamatan uji pertumbuhan tanaman cabai yang dilakukan pada setiap variabel, datanya diuji secara statistik, tujuannya adalah untuk mengetahui pengaruh dari setiap perlakuan yang diuji coba. Adapun parameter yang diuji :

#### a. Parameter pertumbuhan

##### 1) Kecepatan tumbuh benih

Pengamatan terhadap pertumbuhan benih cabai dilakukan setiap 24 jam (etmal) sampai akhir pengujian benih (14 hari). Kecepatan tumbuh benih merupakan jumlah dari kecepatan tumbuh harian. Kecepatan tumbuh harian adalah persentase kecambah yang tumbuh normal setiap 24 jam (%KN/etmal) (Widajati, *et al.*, 2012). Kecepatan tumbuh dihitung dengan rumus berikut :

$$\text{Kecepatan tumbuh} = \sum_{i=0}^{i=n} \% \frac{Kn}{etmal}$$

##### 2) Tinggi tanaman

Tinggi tanaman adalah rata-rata tinggi tanaman sampel pada setiap perlakuan dengan cara mengukur dari mulai pangkal batang sampai ujung daun yang tertinggi. Pengamatan dilakukan pada saat tanaman cabai berumur 28 hari setelah semai.

3) Panjang akar

Panjang akar adalah rata-rata panjang akar sampel pada setiap perlakuan dengan cara diukur dari mulai pangkal batang sampai ujung akar yang terpanjang. Pengamatan dilakukan pada saat tanaman cabai berumur 28 hari setelah semai.

4) Bobot basah dan bobot kering brangkasan

Bobot basah dan bobot kering brangkasan diamati ketika tanaman cabai telah berumur 28 hari setelah semai. Bobot kering tanaman cabai yang diamati yaitu hasil pengeringan dengan menggunakan oven selama 24 jam pada suhu 70°C. Setelah itu, diukur menggunakan neraca analitik.

b. Indeks Kelarutan Fosfat

Pengukuran indeks kelarutan fosfat :

$$IK = \frac{\text{Diameter koloni} + \text{diameter zona bening}}{\text{Diameter Koloni}}$$