

BAB IV. METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan pada Laboratorium Mikrobiologi pada Jurusan Biologi FMIPA UNRI. Rincian pelaksanaan penelitian tahun pertama (2015) adalah:

4.1 Aktivasi dan viabilitas kulturkan bakteri pelarut fosfat dan Aktinomisetes

Sebanyak 45 isolat bakteri dan aktinomisetes hasil penelitian sebelumnya telah disimpan di dalam gliserol 20% selama lebih kurang 5 tahun pada refrigerator. Masing-masing isolat ditumbuhkan dengan medium NB untuk bakteri dan SCB untuk aktinomisetes.

4.2 Karakterisasi bakteri dan aktinomisetes

Masing-masing isolat yang sudah berhasil ditumbuhkan dilakukan karakterisasi melalui pengamatan makroskopis terhadap morfologi koloni yang meliputi bentuk, warna, tepian, konsistensi dan elevasi koloni. Pengamatan dilanjutkan secara mikroskopis melalui pewarnaan Gram (Hadioetomo, 1993).

4.3 Uji kemampuan bakteri dan aktinomisetes dalam melarutkan fosfat secara kualitatif

Setelah masing-masing isolat tumbuh selanjutnya di amati kemampuan pertumbuhannya dan viabilitas isolat dalam menghidrolisis fosfat dengan menumbuhkan pada medium pikov agar.

A. Pembuatan Medium Pikovskaya

Medium Pikovskaya agar dibuat dengan mencampurkan 5 gr $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$; 10 gr glukosa; 0,2 gr NaCl; 0,2 gr KCl; 0,0025 gr $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,1 gr $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,0025 gr $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,5 gr NH_4SO_4 ; 0,5 gr ekstrak khamir dan ditambahkan 17 gr agar, lalu dilarutkan dalam 1 liter aquades. pH diatur menjadi 7. Kemudian disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C tekanan 15 psi selama 15 menit. Untuk medium Pikovskaya cair dibuat dengan tanpa penambahan agar (Goenadi *et al.*, 2000).



B. Uji aktivitas pelarut fosfat pada aktinomisetes

Masing-masing aktinomisetes diuji aktivitasnya menggunakan medium Pikovskaya agar dan diinkubasi pada suhu kamar selama 7 hari. Aktinomisetes yang mempunyai zona bening disekeliling pertumbuhan koloninya dianggap mampu melarutkan fosfat.

4.4 Uji antagonis aktinomisetes terhadap jamur patogen dan bakteri

Aktinomisetes dilakukan uji antifungal terhadap *R. Solani*, *Fusarium sp.*, *Sclerotium rolfsii* menggunakan medium Dextrose Agar (PDA) dengan metoda Dikin *et al.* (2006). Setiap jamur patogen ditumbuhkan di tengah-tengah secara memanjang di atas medium PDA. Masing-masing bakteri dan aktinomisetes ditumbuhkan pada sisi nya. Dilakukan pengamatan selama 3-7 hari melihat interaksi antagonisnya. Selain itu juga dilakukan uji antagonis terhadap bakteri *B.subtilis*, *S.aureus*, *E.coli*, *Pseudomonas sp.*

4.5 Uji asam indol asetat (IAA)

Kemampuan bakteri dan aktinomisetes menghasilkan IAA di tes dengan menggunakan metode yang dijelaskan oleh Patten dan Glick (2002). Bakteri di tumbuhkan di medium Kings'B dilengkapi dengan triptofan 0.5 mM selama 48 jam. Pengukuran IAA dilakukan dengan spectrophotscopy pada 520 nm menggunakan Salkowsky reagen (150 mL H₂SO₄, 7,5 mL FeCl₃. 6H₂O 0,5 M dan 250 mL kuades). Deteksi IAA ditentukan oleh perkembangan warna pink. Konsentrasi IAA dari masing-masing sampel diperkirakan dengan dibandingkan dengan IAA kurva standar.

4.6 Uji Perkecambahan biji (*Germination seeds*)

Uji perkecambahan untuk biji padi dan cabe dilakukan berdasarkan metode yang dijelaskan oleh (Dey *et al.*, 2004). Masing-masing Bakteri dan aktinomisetes yang terpilih (potensi pelarut fosfat, antipatogen terhadap jamur, produksi IAA) di tumbuhkan dalam medium NB dan SC agar. Biji padi dan cabe di bersihkan dg chlorox dengan cara direndam selama 10 menit. Bakteri dan aktinomis setelah itu di bilas dengan air suling steril. Masing-masing 5 biji padi dan cabe di rendamkan ke dalam kultur masing-masing selama 24 jam.

Untuk control, masing-masing biji cabe dan padi di rendam di dalam air suling steril. Tanah yang telah di sterilisasi ditempatkan dalam bak plastik yang berukuran 10x8x7 cm. Tuangkan kultur dan biji di di atas bak plastik. Pengamatan dilakukan selama 3-7 hari. Masing-masing dibuat ulangan sebanyak 3 ulangan. Parameter perkecambahan termasuk: jumlah yang berkecambah, panjang akar primer, skunder.

Untuk kesempurnaan hasil yang diperoleh dirasa perlu dilakukan pengujian pupuk cair "konsorsium mikroba ini pada tanaman cabe di sekala rumah kaca/lapangan. Adapun rencana secara garis besarnya yang akan dilakukan pada tahun berikutnya (2016) adalah:

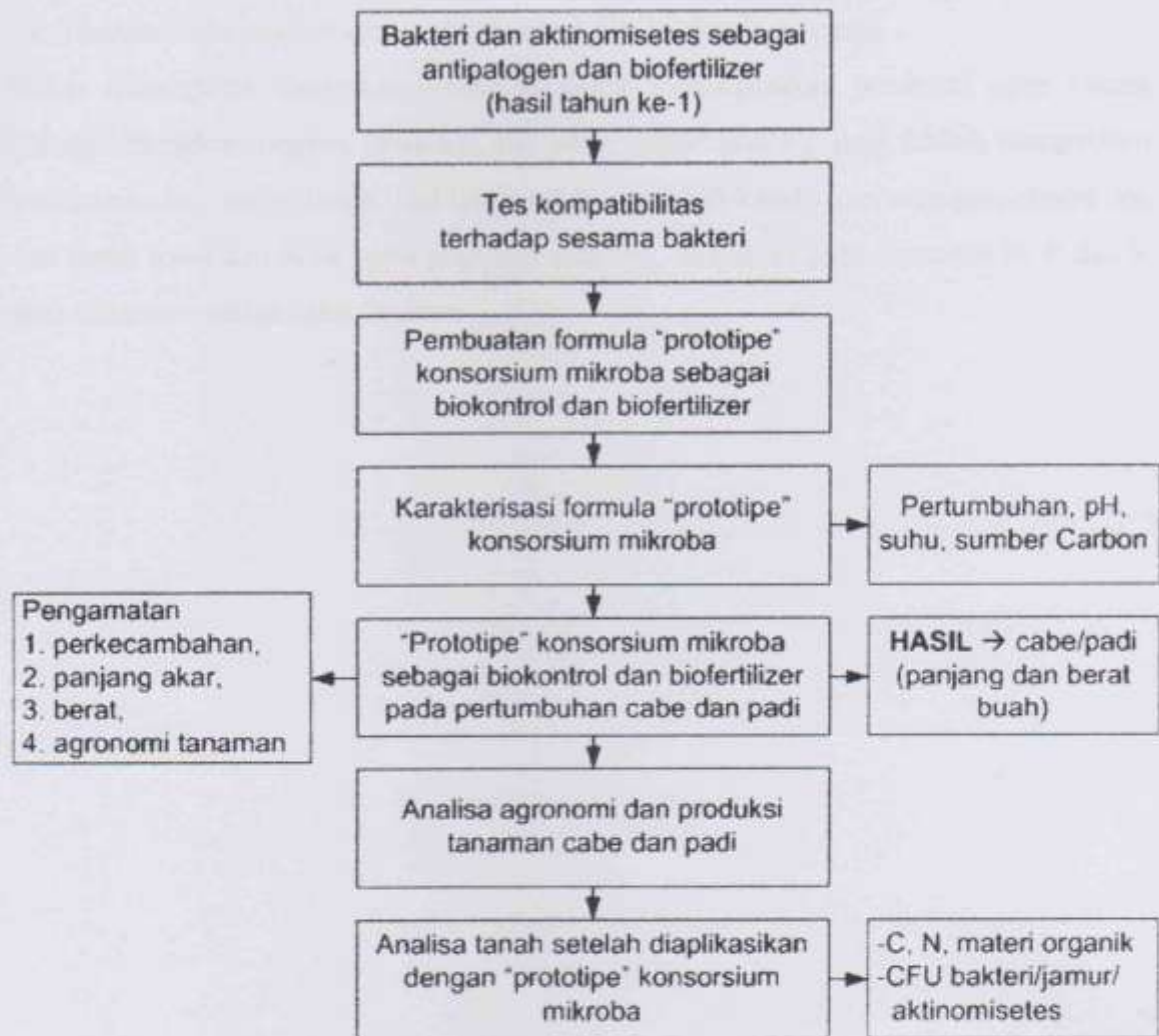
1. Pengembangan konsorsium biokontrol dan biofertilizer

Dipilih bakteri dan aktinomisetes dengan karakteria: pelarut fosfat, antifungal dengan jamur uji, memproduksi IAA, menunjukkan respon positif terhadap perkecambahan dan respon negatif terhadap uji sensitivitas. Bakteri dan aktinomisetes selanjutnya diseleksi lagi dengan uji kompatibiliti terhadap sesama isolat. Mikroba yang dapat hidup bersama selanjutnya di buat konsortium untuk di jadikan sebagai biokontrol dan biofertilizer. Konsortium yang dibuat selanjutnya dilakukan pengujian terhadap cabe di rumah kaca.

2 Uji Kompatibilitas terhadap sesama mikroba

Bakteri dan aktinomistes yang terpilih sebagai prototype konsorsium mikroba biokontrol dan biofertilizer di tumbuhkan bersamaan. Setiap mikroba yang tidak menunjukkan daya hambat (sensitivitas) terhadap sesamanya di kategorikan mereka bisa tumbuh bersama. Selain itu juga dilakukan kemampuan tumbuh masing-masing bakteri pada pH 5, 6, 7 dan 8 dan suhu yang berbeda yaitu 28, 30 dan 35°C.

Mikroba yang terpilih selanjutnya di buat kultur konsorsium. 1 ml masing-masing mikroba di campurkan ke dalam 1 liter nutrient cair. Pertumbuhan mikroba diamati selama 3 hari dengan menghitung populasi mikroba dengan sistem pengenceran. Selain itu setiap hari juga dilakukan mengukur pH media. Pengamatan ini dilakukan dengan membuat 3 ulangan. Rincian Penelitian untuk tahun kedua ada pada Gambar 2.



Gambar 2. Bagan alir penelitian rencana tahun kedua (2016)

3. Uji efek "Prototype" pupuk cair konsorsium mikrob sebagai biokontrol dan biofertilizer pada tanaman

Bakteri dan aktinomisetes yang terpilih selanjutnya dibuat suatu formula yang dapat diaplikasikan ke tanaman uji. Formula tersebut akan dilihat efeknya terhadap persen perkecambahan, anakan, masa vegetatif dan hasil produksi dari tanaman cabe seperti bagan alir pada Gambar 2.

4. Uji efek " konsorsium mikrob sebagai biokontrol dan biofertilizer tanah

Selain diharapkan konsorsium mikrob dapat meningkatkan produksi cabe ramah lingkungan dan menekan ongkos produksi, hal yang sangat penting juga adalah mengetahui pengaruhnya terhadap nutrisi tanah. Hal ini dapat diamati dari kandungan nitrogen, posfat dan kalium dari tanah awal dan akhir serta populasi mikroba. Selain itu juga dianalisa N, P dan K pada bagian tanaman setelah cabe dipanen.

No	Uraian	Uraian	Uraian
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			
18			
19			
20			
21			
22			
23			
24			
25			
26			
27			
28			
29			
30			
31			
32			
33			
34			
35			
36			
37			
38			
39			
40			
41			
42			
43			
44			
45			
46			
47			
48			
49			
50			