

## BAB IV. METODE PENELITIAN

### 4.1 Uji Potensi Aktinomisetes dan Bakteri

#### 4.1.1 Potensi Aktinomisetes dalam Melarutkan Fosfat menjadi Fosfat Tersedia

Kemampuan aktinomisetes dalam melarutkan fosfat dilakukan dengan cara menotolkan isolat Aktinomisetes yang telah murni ke dalam cawan petri yang berisi medium Pikovskaya agar dan diinkubasi selama 3 hari pada suhu ruang. Uji positif ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekitar isolat. Pengukuran yang dilakukan berupa diameter zona bening dan rasio zona bening dengan cara membandingkan diameter zona bening dan diameter koloni yang dihitung menggunakan jangka sorong (Nurkanto 2007) dengan rumus :

$$R =$$

Keterangan :

R = Rasio

Z = Zona bening yang terbentuk

K = Diameter koloni jamur yang tumbuh

### 3.5.5 Uji Kelarutan P Secara Kuantitatif Pada Medium Pikovskaya Cair

#### 3.5.5.1 Uji Kelarutan P tersedia Isolat Aktinomisetes pada Media Pikovskaya Cair Dengan Metode *Stannous Chloride* Secara Spektrofotometer

Masing-masing isolat aktinomisetes dengan populasi  $10^6$  cfu/ml diambil 1 ml dan dimasukkan ke dalam masing-masing erlenmeyer yang berisi 100 ml medium Pikovskaya cair dan diinkubasi selama 7 hari di dalam *shaker* dengan kecepatan 150 rpm pada suhu ruang.

Kultur fermentasi setelah 7 hari, selanjutnya disentrifuse dengan kecepatan 5000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang terbentuk diambil sebanyak 25 ml, kemudian ditambahkan 1 ml ammonium molibdat (Lampiran 1.1) dan 2 tetes larutan *stannous chloride* (Lampiran 1.2), kemudian diinkubasi selama 5-15 menit dan dibaca absorbansinya menggunakan

spektrofotometer pada panjang gelombang ( $\lambda$ ) = 650 nm (Raharjo *et al.* 2007). Hal yang sama dilakukan untuk blanko.

### 3.5.5.2 Penentuan Kurva Standar

Penentuan kurva kalibrasi larutan standar dilakukan dengan cara mengambil larutan standar 10 ppm (Lampiran 1.3) sebanyak 2, 4, 6, 8, 10 ml. Masing-masing larutan standar dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan diencerkan sampai volumenya masing-masing 10 ml untuk mendapatkan larutan standar 2, 4, 6, 8 dan 10 ppm. Hal yang sama dilakukan untuk blanko. Larutan standar dalam tabung reaksi ditambahkan 1 ml larutan ammonium molibdat (Lampiran 1.2) dan 2 tetes larutan *stannous chloride* (Lampiran 1.3). Larutan diaduk dan divortex sehingga tercampur sempurna. Masing-masing larutan diinkubasi selama 5-15 menit dan kemudian diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang ( $\lambda$ ) = 650 nm (Raharjo *et al.* 2007). Hal yang sama dilakukan untuk blanko.

Absorbansi dari larutan standar yang didapatkan kemudian dicari persamaan linearnya untuk mendapatkan konsentrasi dari larutan sampel. Adapun rumus dari persamaan linear yaitu:

Keterangan: Y= absorbansi

$$Y = aX + b$$

X= konsentrasi

Konsentrasi sampel yang didapat merupakan konsentrasi dari fosfat yang sudah terlarut. Hal ini dikarenakan metode *Stannous Chloride* merupakan metode yang digunakan untuk menentukan fosfat yang sudah terlarut (Jagessar & Alleyne 2012).

### 4.1.2 Potensi Bakteri Dalam Menghasilkan Hormon IAA

Isolat yang positif pada uji konfirmasi melarutkan fosfat, selanjutnya dilakukan uji kemampuannya dalam memproduksi IAA secara kualitatif dan kuantitatif. Satu ml inokulum bakteri dengan populasi  $10^8$  CFU/ml diambil dan dimasukkan ke dalam 4 ml medium NB dengan dan tanpa diperkaya L-triptofan 500  $\mu$ g/ml (Pattern & Glick 2002). Kemudian diinkubasi selama 3 hari dengan kecepatan 150 rpm pada suhu ruang (Mu'minah *et al.* 2015). Masing-masing perlakuan dilakukan dengan 3 ulangan.

Inokulum bakteri disentrifus pada kecepatan 3000 rpm selama 30 menit. Satu ml supernatan hasil sentrifus dipindahkan ke dalam tabung reaksi steril dan ditambahkan 4 ml

pereaksi *Salkowski*, kemudian diinkubasi selama 30 menit dalam keadaan gelap (Pattern & Glick 2002). Indikasi adanya produksi IAA oleh isolat bakteri ditandai dengan perubahan warna campuran supernatan dan pereaksi menjadi warna merah muda. Perubahan warna menjadi merah muda mengindikasikan isolat tersebut mampu memproduksi IAA. Secara kualitatif warna dibandingkan dengan kertas *Munsell color* (Lampiran 1) dan secara kuantitatif diukur nilai absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 535 nm (Pattern & Glick 2002). Kuantitas IAA ditentukan dengan menggunakan larutan standar IAA.

Larutan standar IAA dibuat dengan cara melarutkan 2,5 mg IAA sintetis (konsentrasi 50 ppm) ke dalam 50 ml metanol. Larutan IAA sintetis dipipet ke dalam tabung reaksi masing-masing 100  $\mu$ l (5 ppm), 200  $\mu$ l (10 ppm), 300  $\mu$ l (15 ppm), 400  $\mu$ l (20 ppm), 500  $\mu$ l (25 ppm) dan 600  $\mu$ l (30 ppm). Ditambahkan metanol sehingga volume masing-masing tabung reaksi menjadi 1000  $\mu$ l, kemudian ditambahkan sebanyak 4 ml pereaksi *Salkowski* pada masing-masing tabung reaksi selanjutnya dihomogenkan dan diinkubasi selama 60 menit dalam keadaan gelap sehingga larutan akan berubah menjadi warna merah muda. Larutan standar IAA diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 535 nm (Pattern & Glick 2002). Dari hasil spektrofotometri dibuat kurva larutan standar IAA yang menunjukkan hubungan antara larutan standar IAA (x) dan absorbansinya (y) sehingga diperoleh persamaan (Lampiran 2):

$$y = ax + b$$

Keterangan: a = Intersep  
b = Slope (Koefisien regresi)  
y = Absorbansi  
x = Konsentrasi

## 4.2 Uji Perkecambahan Cabe Menggunakan Isolat Tunggal Penghasil IAA

### 4.2.1. Persiapan Media Semai

Media semai yang digunakan adalah campuran tanah kebun dan pasir. Tanah kebun dan pasir diayak dengan menggunakan ayakan kawat berukuran 25 mesh. Selanjutnya dilakukan pencampuran antara tanah kebun dan pasir dengan perbandingan 1:1, kemudian dilakukan sterilisasi media semai dengan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 15 psi

selama 15 menit (Wuriesyliané *et al.* 2013). Media semai yang telah di sterilisasi ditempatkan dalam bak perkecambahan yang berukuran 10x8x7 cm.

#### 4.2.2. Pemilihan Benih dan Pemberian Perlakuan

Benih yang digunakan yaitu benih yang tenggelam saat direndam dengan air. Benih yang dipilih selanjutnya didesinfeksi dengan menggunakan natrium hipoklorit 2% selama 5 menit, dicuci 3 kali dengan akuades steril dan dikering-anginkan dalam cawan petri. Benih yang telah steril tersebut direndam dalam 50 ml inokulum bakteri ( $10^8$  CFU/ml) sesuai perlakuan dan dalam akuades sebagai kontrol selama 24 jam pada suhu ruang (Sutariati *et al.* 2006).

#### 4.2.3. Penyemaian Benih dan Pemeliharaan

Sisa inokulum bakteri perendaman benih disemprotkan pada media semai selanjutnya ditugal. Enam butir benih cabai merah hasil perendaman selama 24 jam disemai dengan kedalaman sekitar 0,5 cm dari permukaan dengan jarak semai 2 x 2 cm (Lesilolo *et al.* 2013). Pemeliharaan dilakukan dengan menyemprotkan akuades steril pada media untuk menjaga kelembaban tanah.

### 4.3 Uji Perkecambahan Cabe Menggunakan Konsortium Actibar

Potensi isolat aktinomisetes dalam melarutkan fosfat dan memiliki daya hambat terhadap jamur patogen dan bakteri yang memiliki potensi dalam menghasilkan IAA maka dibuat konsorsium dari lima mikroba iaitu 3 isolat aktinomisetes (L1.2.1, L2.2.3 dan SM1.1.3) yang memiliki kemampuan melarutkan fosfat dan sekali gus sebagai biokontrol pada *F. oxysporum* dan *C. capsici* dan 2 isolat bakteri GGO1 mampu menyediakan fosfat pada tanah podsolik dengan persentasi tertinggi 0,4736% serta mengandung IAA sebanyak 18,74 µg/ml dan isolat GGO2 menyediakan fosfat pada tanah podsolik 0,3461% dan IAA sebanyak 24,51 µg/ml, masing-masing pada medium NB. Ke lima isolat compatible satu sama lainnya. Ke lima isolat tersebut disebut sebagai Actibar (Actinomicetes bakteri Riau).

### 4.3.1 Uji Perkecambahan cabe berdasarkan lama perendaman Actibar

#### A. Persiapan Aktibar

Isolat aktinomisetes dan bakteri yang telah ditumbuhkan pada kultur SCB dan NB dengan total populasi  $10^8$  CFU/ml, masing-masing diambil sebanyak 10 ml kemudian di konsorsiumkan. Volume Aktibar yang digunakan adalah 50 ml/tanaman (Rosaidah *et al.* 2015).

#### B. Uji Aktibar pada perkecambahan benih cabai

Persiapan bahan media tanah dan benih yang digunakan sama dengan pengujian dengan isolat tunggal. Benih yang digunakan yaitu benih yang tenggelam saat direndam dalam air selama 5 menit. Variasi waktu perendaman dilakukan selama 6, 12, dan 24 jam serta kontrol (tanpa perendaman). Benih direndam dalam 50 ml konsorsium, kemudian sisa inokulum setelah perendaman dituangkan dalam media tanam secara merata Rosaidah *et al.* (2015). Penanaman benih dilakukan dengan membuat tiga tugal pada media tanah kemudian memasukkan satu benih cabai pada setiap tugal. Benih cabai yang telah berkecambah setelah 15 hari kemudian dilakukan penjarangan, dengan menyisakan satu tanaman yang pertumbuhannya sama secara morfologi (Ramadani *et al.* 2015).

### 4.4. Uji Pertumbuhan Tanaman Cabai Pada Variasi Media Tanam dengan Pemberian Actibar

#### A. Persiapan Media Tanam

Media tanam menggunakan 3 jenis tanah yaitu tanah kebun, tanah gambut, dan tanah PMK. Tanah gambut diperoleh dari Rimbo Panjang dan tanah PMK diperoleh dari Kulim, Pekanbaru. Tanah gambut dan tanah PMK memiliki pH tanah yang rendah, sehingga perlu peningkatan pH tanah dengan pemberian dolomit sebanyak 21 g (Hakim *et al.* 1986). Pupuk dasar berupa sumber N diperoleh dari pemberian urea sebanyak 0,5 g dan KCl 0,25 g sebagai sumber K (Noor 2003), kemudian tanah dimasukkan ke dalam polibag yang berukuran 30 x 45 cm sebanyak 10 kg/polibag. Pemupukan ulang N dan K (15:15) sebanyak 50 ml per tanaman diberikan pada umur 30 HST (Salim 2013; Alex 2016).

Penetapan pH dilakukan dengan mengambil sampel tanah pada saat persiapan media tanam dan pengukuran dilakukan setiap 1 minggu sekali setelah perlakuan, dengan cara mengambil sampel tanah dari setiap ulangan pada masing-masing perlakuan kemudian dikompositkan. Pengukuran pH tanah menggunakan pH meter elektroda. Penetapan P awal dan P akhir dilakukan dengan menggunakan metode *Olsen* (Sulaeman *et al.* 2009).

#### **B. Pemilihan, Perlakuan dan Penanaman Benih**

Pemilihan dilakukan dengan merendam benih dalam air dan yang digunakan adalah benih yang tenggelam. Benih selanjutnya diberi perlakuan dengan perendaman dalam inokulum selama 30 menit (Datta *et al* 2011) dengan kerapatan  $10^8$ . Benih ditanam pada 3 lubang dengan masing-masing ditugal pada kedalaman 0,5 cm dari permukaan tanah (Sepwanti *et al* 2016). Penyiraman inokulum sebanyak 50 ml/tanaman di sekitar lubang tugal (Lestari *et al* 2011; Rosadiah *et al* 2015).

Penjarangan dilakukan 2 minggu setelah tanam dengan meninggalkan 1 tanaman/polibag (Marliah *et al* 2011). Parameter lingkungan yang diperhatikan adalah suhu lingkungan. Suhu diukur dengan menggunakan termometer setiap pagi dan sore.

#### **C. Pemeliharaan**

Pemeliharaan dilakukan dengan penyiraman setiap pagi dan sore sampai keadaan lembab. Penyiangan gulma dilakukan secara manual. Pengendalian serangan hama dan penyakit dilakukan dengan penyemprotan insektisida Decis 2,5 EC untuk mencegah serangan hama serta fungisida Dithane M-45 untuk mengendal

#### **D. Penyiraman dan Penyiangan**

Cara pemeliharaan tanaman cabai salah satunya adalah penyiraman yang dilakukan setiap hari pada sore hari. Penyiraman tanaman sampai tanah menjadi lembab. Penyiangan tanaman lain (gulma) dilakukan dengan cara menggunting gulma yang hidup disekitar tanaman. Penyiangan penyiangan dilakukan setiap terlihat gulma mulai muncul pada polibag.

#### 4.4. Pengamatan

##### A. Waktu Muncul Kecambah (Hari Setelah Penyemaian/HSP)

Waktu muncul diamati setelah benih disemai hingga benih berkecambah dan muncul ke permukaan media perkecambahan. Pengamatan saat muncul kecambah hanya berdasarkan pada waktu munculnya kecambah tanpa memperhatikan jumlah benih yang berkecambah. Waktu berkecambah diamati setiap hari setelah benih disemai hingga 15 hari pengamatan.

##### B. Persentase Perkecambahan

Perhitungan persentase perkecambahan benih dilakukan setelah 15 hari pengamatan dengan menggunakan rumus (Lesilolo *et al.* 2013):

$$DK = JK/JC \times 100\%$$

Keterangan:

DK = Persentase perkecambahan (%)

JK = Jumlah benih yang berkecambah

JC = Jumlah benih yang diuji

##### C. Panjang Kecambah dan Akar (cm)

Panjang kecambah diukur dari permukaan tanah sampai titik tumbuh kecambah, sedangkan panjang *root* diukur dari pangkal leher akar primer sampai dengan ujung akar primer (Zahrok 2007). Pengukuran dilakukan setelah 15 hari pengamatan.