

III. METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Pelaksanaan

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran dan Rumah Kaca Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya Malang pada bulan Maret sampai dengan Agustus 2017.

3.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah gelas ukur, timbangan, penggaris, pisau, cawan Petri, gelas ukur, labu Erlenmeyer, labu ukur, corong, jarum ose, stik L, bunsen, timbangan analitik, autoclave, sentrifuge, pipet tetes, batang pengaduk, tub 15 ml, sentrifuge, kaca preparat, kaca penutup, pinset, sprayer, cawan petri, mikroskop, *hand counter*, *Laminar Air Flow Cabinet* (LAFC), spektrofotometer UV-Vis, polibag, sekop, cangkul, gembor dan kamera.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanah, PGPR yang terdiri atas *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Azospirillum* sp., dan *Azotobacter* sp. koleksi jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan, aquades, media *Nutrient Agar* (NA), *Nutrient Broth* (NB), media tanah, dan empat macam herbisida yang terdiri dari herbisida paraquat 1 (berbahan aktif paraquat diklorida 276 g/l), herbisida glifosat 1 (berbahan aktif isopropil amina glifosat 486 g/l), herbisida paraquat 2 (berbahan aktif paraquat diklorida 310 g/l), dan herbisida glifosat 2 (berbahan aktif isopropil amina glifosat 531 g/l).

3.3 Pelaksanaan Penelitian

Kerangka pelaksanaan penelitian dapat ditampilkan pada diagram alur (Gambar 2).

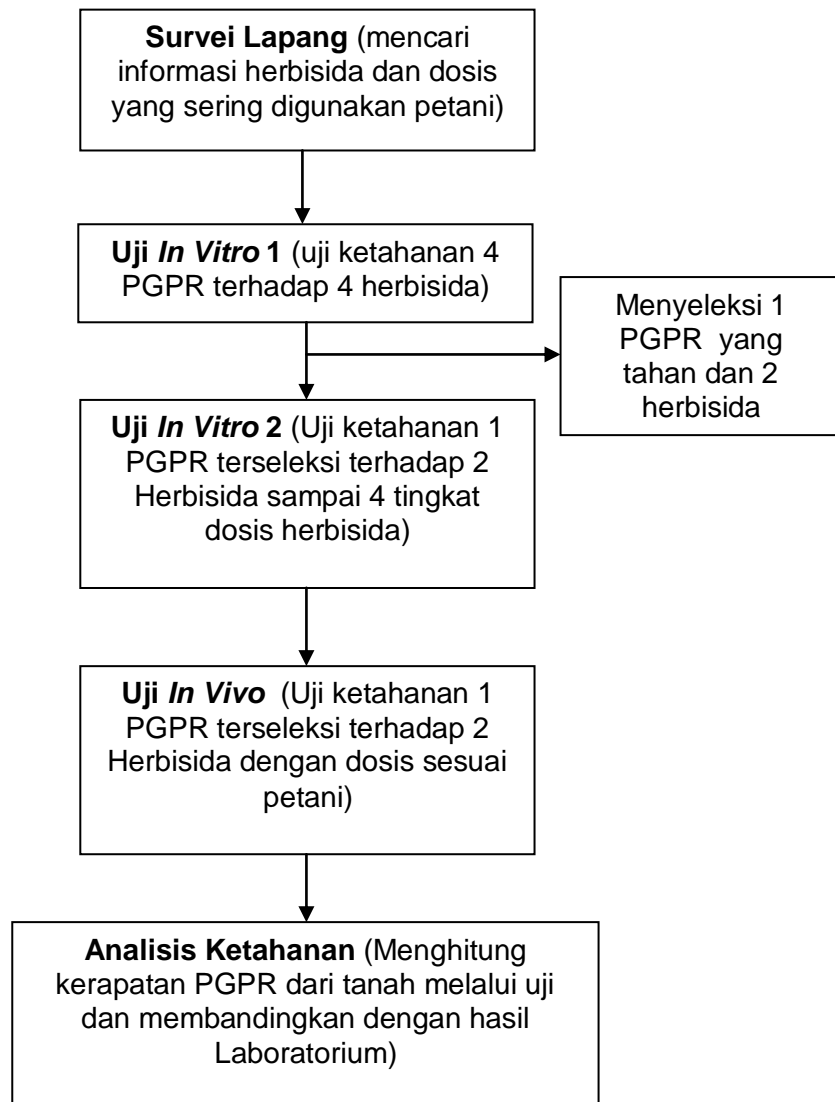
3.3.1 Survei Lapang

Survei lapang dilakukan di Desa Punten Kota Batu Jawa Timur. Survei lapang dilakukan dengan tujuan untuk memperoleh informasi herbisida yang sering digunakan oleh petani sebanyak 4 herbisida dalam suatu lahan.

3.3.2 Uji *In Vitro* 1

Uji *in vitro* 1 ini dilakukan dengan tujuan untuk menseleksi 1 bakteri yang paling tahan terhadap aplikasi 4 herbisida. Uji *in vitro* 1 diawali dengan membuat media NA dan NB, dan meremajakan isolat PGPR koleksi jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan. Pembuatan media NA yaitu dengan cara mencampurkan bubuk NA sebanyak 20 gram dalam 1000 ml aquades kemudian dihomogenkan.

Sedangkan pembuatan media NB yaitu dengan cara mencampurkan bubuk NB sebanyak 8 gram dalam aquades sebanyak 1000 ml kemudian dihomogenkan. Setelah homogen, larutan media tersebut di autoclave dengan suhu 121°C dan tekanan 1 atm selama 15 menit. Pada tahap peremajaan PGPR, dilakukan dengan cara, mengambil masing-masing bakteri sebanyak 1 ose diisolasi dalam media NA dengan metode agar miring. bakteri yang telah diremajakan selanjutnya diperbanyak pada media NB sampai kerapatan 10^9 cfu/ml.



Gambar 1. Kerangka Penelitian

Pelaksanaan uji *in vitro* 1 selanjutnya yaitu mencampurkan setiap bakteri dalam media *nutrient broth* (NB) yang telah mengandung herbisida sesuai perlakuan dengan perbandingan bakteri dan herbisida 1:1. Setelah itu, mengukur kerapatan bakteri pada masing-masing suspensi dengan alat spektrofotometer

dan mengamati tingkat kerapatan bakteri dengan menguji nilai *Optical Density* (OD) menggunakan panjang gelombang 625 nm pada waktu 0, 24, 48, dan 72 jam.

PGPR yang digunakan untuk uji adalah *B. subtilis* (BS), *P. fluorescens* (PF), *Azospirillum* sp. (AS), dan *Azotobacter* sp. (AT). Herbisida yang digunakan adalah herbisida yang terdiri dari 4 jenis herbisida yang sering digunakan oleh petani. Dua jenis herbisida mengandung bahan aktif paraquat dan dua jenis yang lain mengandung bahan aktif glifosat. Konsentrasi herbisida paraquat 1 adalah sebanyak 0,276 gr, herbisida glifosat 1 sebanyak 0,486 gr, herbisida paraquat 2 sebanyak 0,31 gr, dan herbisida glifosat 2 0,531 gr/100 ml aquades. Perlakuan dan ulangan yang digunakan adalah terdiri dari 16 perlakuan dan 3 ulangan tanpa menggunakan rancangan percobaan. Perlakuan yang digunakan pada metode penelitian ini terdiri atas:

1. BS (*B. subtilis*)+ Paraquat 1
2. BS + Glifosat 1
3. BS + Paraquat 2
4. BS+ Glifosat 2
5. PF (*P. fluorescens*) + Paraquat 1
6. PF+ Glifosat 1
7. PF+ Paraquat 2
8. PF+ Glifosat 2
9. AZ (*Azotobacter* sp.) + Paraquat 1
10. AZ+ Glifosat 1
11. AZ+ Paraquat 2
12. AZ+ Glifosat 2
13. AS (*Azospirillum* sp.)+ Paraquat 1
14. AS+ Glifosat 1
15. AS+ Paraquat 2
16. AS+ Glifosat 2

3.3.3 Uji *In Vitro* 2

Uji *in vitro* 2 dilakukan dengan tujuan menguji ketahanan PGPR yang paling tahan atau bakteri hasil seleksi pada uji *in vitro* 1 terhadap 2 herbisida hasil seleksi pada uji *in vitro* 1. Bakteri hasil seleksi dari uji *in vitro* 1 adalah bakteri *Azospirillum* sp., dan dua herbisida hasil seleksi dari uji *in vitro* 1 adalah

herbisida paraquat 2 dan glifosat 2. Perbedaan uji *in vitro* 1 dan 2 adalah pada uji *in vitro* 2 meningkatkan konsentrasi dua herbisida dari konsentrasi anjuran sebanyak empat kali tingkatan dengan selisih 0,25 gr/100 ml aquades. Konsentrasi herbisida untuk aplikasi uji *in vitro* 2 dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Konsentrasi herbisida pada uji *in vitro* 2

Jenis Herbisida	Konsentrasi Herbisida (gr/100ml)			
	K1	K2	K3	K4
Paraquat 2 (0,31 gr/100 ml)	0,388 gr	0,465 gr	0,543 gr	0,62 gr
Glifosat 2 (0,531 gr/100 ml)	0,664 gr	0,797 gr	0,929 gr	1,062 gr

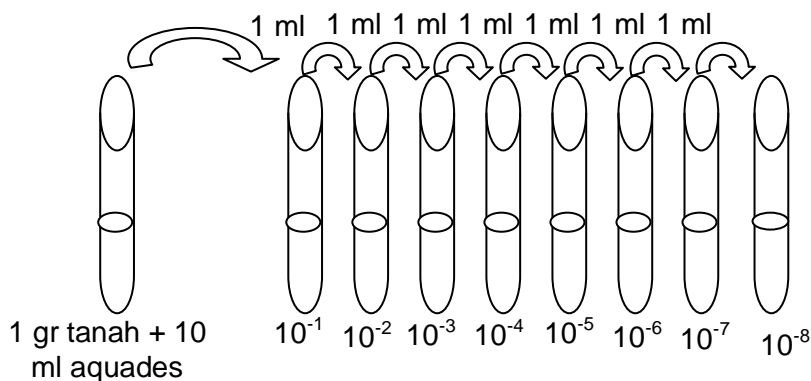
Pengujian *in vitro* 2 sama dengan uji *in vitro* 1 yaitu dengan mencampurkan bakteri pada media NB dengan kerapatan 10^9 cfu/ml dan larutan herbisida sesuai perlakuan dengan perbandingan jumlahnya yaitu 1:1. Setelah itu, mengukur kerapatan bakteri atau *Optical Density* (OD) pada masing-masing suspensi menggunakan alat spektrofotometer dengan panjang gelombang 625 nm pada waktu 0, 24, 48, dan 72 jam. Metode yang digunakan dalam uji *in vitro* 2 adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan delapan perlakuan dan empat ulangan. Perlakuan pada uji *in vitro* 2 terdiri atas:

1. A+ P2_{K1} (*Azospirillum* sp. + Paraquat 2 Konsentrasi 1)
2. A+ P2_{K2} (*Azospirillum* sp. + Paraquat 2 Konsentrasi 2)
3. A+ P2_{K3} (*Azospirillum* sp. + Paraquat 2 Konsentrasi 3)
4. A+ P2_{K4} (*Azospirillum* sp. + Paraquat 2 Konsentrasi 4)
5. A+ G2_{K1} (*Azospirillum* sp. + Glifosat 2 Konsentrasi 1)
6. A+ G2_{K2} (*Azospirillum* sp. + Glifosat 2 Konsentrasi 2)
7. A+ G2_{K3} (*Azospirillum* sp. + Glifosat 2 Konsentrasi 3)
8. A+ G2_{K4} (*Azospirillum* sp. + Glifosat 2 Konsentrasi 4)

3.3.4 Uji *In Vivo*

Uji *in vivo* dilakukan dengan tujuan mengetahui tingkat ketahanan PGPR dan mikroba terhadap aplikasi herbisida dalam tanah. Uji *in vivo* dilakukan dengan cara menyiapkan tanah dalam polibag sebanyak 9 polibag, dua herbisida yaitu paraquat 2 dan glifosat 2, dan bakteri *Azospirillum* sp. Perbedaan uji *in vivo* dengan uji *in vitro* 2 adalah pada dosis yang digunakan. Dosis yang digunakan pada uji *in vivo* adalah dosis yang sering digunakan oleh petani yaitu sebanyak 200 ml/ 16 lt air/ 200 m². Setelah menyiapkan tanah dalam 9 polibag, bakteri *Azospirillum* sp. disiram dalam tanah sesuai dosis yaitu 111 ml dengan kerapatan 10^8 cfu/ml/polibag, dan selanjutnya mengaplikasikan herbisida sesuai dosis yang

digunakan petani yaitu 0,23 ml/polibag. Tanah yang sudah diaplikasikan bakteri dan herbisida selanjutnya dihomogenkan dengan cara membalik tanah sampai homogen, setelah itu mengambil sampel tanah sebanyak 100 gr. Selanjutnya sampel tanah tersebut diuji menggunakan metode *dilution plate* bertingkat sampai tingkat 10^{-8} seperti pada gambar 2.



Gambar 2. Ilustrasi metode *dilution plate*

Setelah melalui pengenceran sampai tingkat 10^{-8} , selanjutnya mengukur nilai kerapatan mikroba atau *Optical Density* (OD) menggunakan alat spektrofotometer dengan panjang gelombang 625 nm. Kegiatan tersebut dilakukan secara berulang selama tiga hari, sehingga diperoleh nilai OD pada waktu 0, 24, dan 48 jam. Metode yang digunakan pada uji *in vivo* adalah Rancangan Acak Kelompok (RAK) dengan 3 perlakuan dan 3 ulangan. Perlakuan pada uji *in vivo* ini terdiri dari:

1. Kontrol
2. *Azospirillum* sp. + Paraquat 2
3. *Azospirillum* sp. + Glifosat 2

3.4 Parameter Pengamatan

Parameter pengamatan pada uji *in vitro* 1 dan 2 adalah kerapatan PGPR yang tumbuh pada media NB yang mengandung herbisida. Parameter pengamatan yang dilihat dari uji *in vivo* ini adalah menghitung kerapatan PGPR dan mikroba yang ada pada tanah pertanian.

3.5 Analisis Data

Analisis yang digunakan pada uji *in vitro* 1 adalah menggunakan analisis deskriptif terhadap tingkat ketahanan PGPR dan herbisida yang berdampak

negatif dengan menggunakan data tabel hasil pengamatan. Pada uji *in vitro* 2, dan *in vivo* dianalisis secara statistik menggunakan analisis ragam (ANOVA), dan apabila diperoleh pengaruh nyata pada perlakuan selanjutnya dilakukan uji lanjut dengan menggunakan uji DMRT dengan taraf 5%.