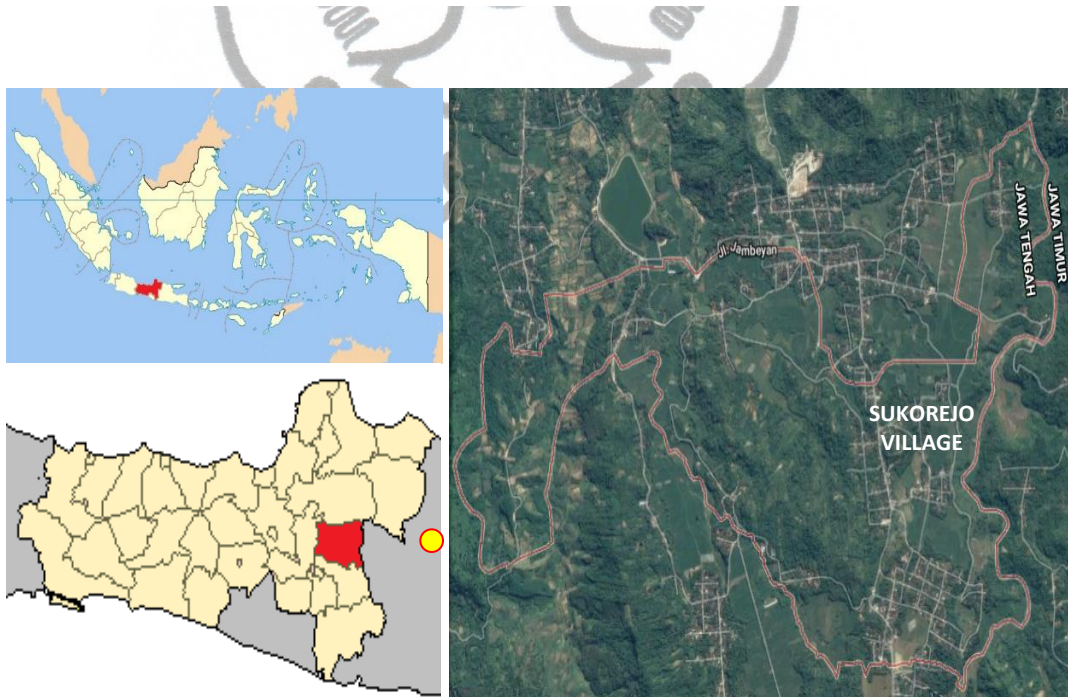


BAB III. METODE PENELITIAN

A. Tempat Penelitian

Penelitian telah dilakukan pada pertanian organik dan anorganik di wilayah Desa Sukorejo, Kecamatan Sambirejo, Kabupaten Sragen. Desa Sukorejo, sebuah daerah berbukit, terletak di ketinggian 376 meter di atas permukaan laut. Tanah di Desa Sukorejo sebagian besar digunakan untuk sektor pertanian, seperti sawah dan perkebunan. Sawah di desa Sukorejo terdiri dari dua jenis, yaitu pertanian organik dan anorganik. Luas pertanian organik di Desa Sukorejo mencakup area seluas 42,19 ha. Lokasi penelitian pertanian organik terletak di lintang $7^{\circ} 30'46.8''$ S dan $111^{\circ} 08'45.9''$ E. Pekerjaan molekuler dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Departemen Pendidikan Biologi, Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan, Universitas Sebelas Maret (UNS) Surakarta, Indonesia (Gambar 2).



Gambar 2. Peta lokasi penelitian di pertanian organik Desa Sukorejo, Kecamatan Sambirejo, Kabupaten Sragen, Provinsi Jawa Tengah, Indonesia

B. Waktu Penelitian

Penelitian dibagi menjadi tiga tahap. Tahap pertama adalah persiapan, tahap kedua adalah pelaksanaan, dan tahap ketiga adalah pengolahan data. Ketiga tahap tersebut disusun pada Tabel 1.

Tabel 1. Jadwal Penelitian

Tahapan	Kegiatan	Bulan (Tahun 2016-2017)															
		6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	
Persiapan penelitian	1. Persiapan	v	v														
	2. Ijin penelitian			v													
	3. Penyusunan instrumen			v													
Pelaksanaan penelitian	1. Pelaksanaan penelitian:				v	v	v	v	v								
	a. Ambil sampel air dan anah.				v	v	v	v	v								
	b. Wawancara petani.				v	v	v	v	v								
	c. Ambil data pertumbuhan dan produk.				v	v	v	v	v								
	d. Persiapan Uji bakteri				v	v	v	v	v								
	e. Persiapan Uji DNA				v	v	v	v	v								
	2. Pengujian data																
	a. Uji air dan tanah.					v	v	v	v								
	b. Uji bakteri																
	c. Uji DNA					v	v	v	v								
Pengolahan data penelitian	1. Pengolahan dan analisis data hasil penelitian					v	v	v	v								
	2. Penyusunan laporan							V	v	v	v	v	v	v	v		

C. Prosedur Penelitian

1. Identifikasi variasi *strain Rhizobacter* isolat lokal pada pertanian organik dan anorganik yang mempunyai potensi dan enzim protein hormon yang menyebabkan kesuburan tanah berdasarkan data Bank Genom atau NCBI.

Bahan-Bahan

Sampel tanah sekitar perakaran padi, aquades, alkohol, *luria agar* (LA), *luria broth* (LB), *aluminium foil*, alkohol 70%, etanol absolut, gliserol (20%), *agarose*, phenol-CHCl₃-*isoamilalkohol* (25:24:1), 1 x TE pH 8.0, buffer TAE, tris HCl, EDTA, 10% SDS, proteinase k (2 mg/ml), fenol, kloroform, *isoamyl* alkohol, iso propanol, *ethidium bromide*, Primer set (untuk bakteri), target fragment \pm 1300 bp, 1 x Ex Taq Buffer, *forward primer*, *reverse primer*, DNA template, air nuclease bebas.

Alat-Alat

Sentrifusi mikro, tabung mikro 1.5 ml, pipet mikro 1 ml dan 200 mikro liter, pipet Mohr 10 ml dan 5 ml, gelas piala, rak tabung, keranjang es, tissue gulung dan kotak, tabung reaksi, *vortex mixer*, autoklaf, *lyophilizer*, UV-transilluminator, kamera polaroid, pH meter, inkubator, cawan petri, jarum ose, erlenmeyer, gelas ukur, beker glass, timbangan analitik, lampu spiritus, fintip kuning dan biru, botol semprot, plastik wrap.

a. Isolasi PGPR dari *Rhizhophera*

Strain bakteri diisolasi dari tanah rhizosfer pertanian organik IR 64 dan anorganik di wilayah Kabupaten Sragen, Indonesia. Sebanyak 5 g tanah diencerkan dengan air suling steril dan pengenceran dilakukan hingga 10^{-9} dan mengambil 100 μ L ekstraksi ketegangan untuk menyebar ke Medium Agar Luria Bertani (LB). Kemudian, Medium Agar LB diinkubasi selama 48 jam pada suhu 28°C (suhu kamar). Jumlah koloni yang diperoleh adalah 10 koloni bakteri dengan variasi morfologi yang berbeda. Koloni bakteri tergores oleh kuadran untuk mendapatkan satu koloni. Setelah mendapatkan koloni tunggal, disimpan dalam larutan gliserol 20% pada -20°C.

b. Isolasi DNA

Mengambil isolat dari kultur gliserol dan ditumbuhkan menggunakan media LB dan diinkubasi 24 jam pada suhu 28°C (suhu kamar). Kultur DNA diresuspensi dengan menggunakan *lysozyme-SDS-phenol-chloroform* (metode Maniatis et al. 1982). DNA diekstraksi dengan fenol-kloroform-isoamil alkohol (25: 24: 1) dan diendapkan dengan isopropanol. DNA yang diekstraksi dibersihkan dengan DNA-free RNase (Sigma Chemical Co. St. Louis. MO. USA) pada konsentrasi akhir 0,2 mg.mL⁻¹ pada 37°C selama 15 menit, diikuti ekstraksi kedua dengan fenol-kloroform-isamilil alkohol dan presipitasi isopropanol. Pelet DNA diresuspensi di TE buffer (10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, pH 8), disimpan pada -20°C, dan digunakan sebagai DNA template pada PCR untuk memperkuat 16S rRNA untuk analisis filogenetik.

c. Amplifikasi PCR dan *Sequencing*

Elektroforesis DNA total genom menggunakan gel *agarose* 0,8% dan divisualisasikan oleh transilluminator UV setelah pewarnaan gel dengan ethidium bromida. Amplifikasi gen 16S rRNA dilakukan menggunakan T1-Thermocycler PCR machine dengan 1387R primer pA (5'-GGGCGGWGTGAACGAG-3') dan 63F primer pH (5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3') dengan target fragment \pm 1300 bp, maka total volume reaksi PCR yang digunakan adalah 50 μ L, Primer digunakan untuk amplifikasi PCR gen 16S rRNA adalah 5 '(Marccesi et al. 1998). Amplifikasi dilakukan dalam volume 25 μ L. Amplifikasi PCR dilakukan dengan 1 μ L (1 x Ex Taq Buffer), 5 μ L *forward primer*, 5 μ L *reverse primer*, 1 μ L DNA *template*, 13 μ L air nuklease bebas. Kondisi PCR sesuai dengan metode Marchesi et al. (1998). Suhu untuk kondisi PCR mulai pra-denaturasi (94°C, 5 menit), denaturasi (94°C, 30 detik), *annealing* (55°C, 45 detik), elongasi (72°C, 1 menit 30 detik), pasca-elongasi (72°C, 10 menit), dan pendinginan (4°C, 5 menit). Fase denaturasi, pelekatan primer, dan elongasi dilakukan selama 35 siklus. Produk PCR dimigrasikan pada 1,5% gel agarosa dengan teknik elektroforesis pada 85 V selama 40

menit. Hasil elektroforesis divisualisasikan menggunakan sinar UV setelah pencelupan menggunakan pewarna ethidium bromide selama 10 menit. Ukuran gen 16S rRNA \pm 1300 bp. Sekuensing DNA dilakukan pada hasil amplifikasi oleh Genetika *Science* Indonesia.

Sepuluh spesies bakteri yang ditemukan pada pertanian organik terdapat genus *Pseudomonas*, *Brevundimonas*, *Bacillus*, *Stenotrophomonas*, *Exiguobacterium*, *Serratianematodiphilla*, dan *Acinetobacter* dikonsultasikan dengan data bank genom atau NCBI. Urutan nukleotida gen 16S rRNA dianalisis menggunakan BLAST online di <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Hasil BLAST menunjukkan kesamaan antara urutan nukleotida gen 16S rRNA dari isolat yang diperoleh dan urutan nukleotida gen 16S rRNA di GenBank. Penyelarasan online dilakukan di <http://expasy.org/tools/> pada masing-masing isolat yang memiliki hubungan kekerabatan dengan beberapa bakteri yang memiliki kesamaan 99% gen 16S rRNA. Pohon filogenetik dibangun pada dataset yang disejajarkan menggunakan metode neighbor-joining (Saitou dan Nei 1987) yang diimplementasikan dalam program MEGA 4.0 (Tamura et al. 2007).

2. Pengukuran Kualitas Pertumbuhan dan Produksi dari Pertanian Organik dan Anorganik Berdasarkan Indikator *Rhizobacter*, BOD, COD, TSS, Pb, Cr, Ph, C/N Rasio, P, K.

a. Kondisi kimiawi Tanah.

Analisis kandungan N, C/N rasio, P, dan K dalam tanah pertanian organik dan anorganik dilakukan di laboratorium Ilmu Tanah Fakultas Pertanian UNS Surakarta. Analisis kandungan N total dilakukan dengan metode Kjeldhal, kandungan C-organik dilakukan dengan metode Curmis, P tersedia dilakukan dengan metode Bray-1 dan K tersedia diukur berdasarkan kandungan K yang terekstrak oleh amonium asetat 1N pada pH 7.0.

b. Kondisi Kimiawi Air Irigasi.

Pengambilan sampel air dilakukan dengan menggunakan botol plastik kira-kira 1,5 liter, kemudian sampel air yang telah diambil diuji kadar TSS, DO, BOD, COD, logam Pb dan ion logam Cr (VI) diujikan di BBTKLP Yogyakarta sesuai dengan pedoman pada Peraturan Pemerintah No. 82 Tahun 2001 tentang Pengelolaan Kualitas Air dan Pengendalian Pencemaran Air. Parameter COD (*Chemical Oxygen Demand*) diuji dengan menggunakan metode APHA (*American Public Health Association*). Parameter BOD (*Biological Oxygen Demand*) diuji dengan metode IKM (Instruksi Kerja Metode). Parameter DO (*Dilluted Oxygen*) diuji dengan metode potensiometri.

Pelaksanaan sesuai dengan ketentuan Pasal 41 Undang-Undang Nomor 7 Tahun 2004 tentang Sumber Daya Air, dan penetapan peraturan pemerintah tentang irigasi Pasal 5 ayat (2) Undang-Undang Dasar Negara Republik Indonesia Tahun 1945 serta Undang-Undang Nomor 7 Tahun 2004 tentang Sumber Daya Air (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2004 Nomor 32).

c. Pengambilan Data Pertumbuhan dan Produksi

Tinggi tanaman: hasil analisis ragam terhadap tinggi tanaman pada umur 42 hst dan pada umur 56 hst. Pada saat tanaman padi berumur 14 hst, secara fisiologis sedang dalam proses adaptasi terhadap lingkungan baru akibat proses pemindahan tanaman. Dua minggu pertama setelah penanaman merupakan saat akhir proses pemulihan (regenerasi) jaringan atau organ-organ yang rusak akibat proses transplanting (tanam pindah), sehingga proses pertumbuhan untuk menambah tinggi tanaman cenderung lambat. Jumlah Anakan: jumlah anakan padi diukur pada umur 14 hst (hari setelah tanam), 28 hst, 42 hst, 56 hst, dan 70 hst. Pertumbuhan tanaman padi dibagi ke dalam 3 fase, yaitu awal pertumbuhan sampai terbentuknya malai, pembentukan malai sampai pembungaan, dan pembungaan sampai gabah matang. Komponen pertumbuhan yang diukur tinggi tanaman (cm), diukur pada minggu ke 7 sesudah pindah tanam tanaman dan jumlah anakan

produktif. Di daerah tropis, fase reproduktif 35 hari dan fase pematangan sekitar 30 hari. Perbedaan masa pertumbuhan ditentukan oleh perubahan panjang waktu fase vegetatif. Varietas IR 64 matang dalam 110 hari mempunyai fase vegetatif 45 hari. Anakan yang banyak belum tentu semuanya menghasilkan malai, dan anakan yang menghasilkan malai itu disebut dengan anakan produktif. Hasil tinggi bila bulir-bulir terisi penuh melalui proses fotosintesis dan laju partisi fotosintat yang tinggi selama fase pengisian biji.

Komponen hasil tanaman diukur dari umur bibit terhadap jumlah anakan produktif per rumpun dan persentase gabah hampa. Pengamatan terhadap komponen hasil meliputi jumlah malai per rumpun, jumlah gabah per malai, persen gabah isi, bobot 1000 butir gabah dan hasil gabah kering panen per petak yang kemudian dikonversi ke gabah kering giling (GKG/ha) dilakukan pada saat panen. Disamping itu, dilakukan pengamatan terhadap serapan unsur hara N,P, dan K pada saat tanaman padi umur 56 hari setelah tanam (HST). Fageria (1992) menambahkan bahwa jumlah anakan produktif per rumpun, yang juga menyatakan jumlah malai per rumpun atau per satuan luas, selain jumlah biji per malai, berat 1000 biji dan persentase gabah berisi.

Komponen hasil meliputi jumlah malai atau anakan produktif per rumpun per satuan luas. Semakin banyak jumlah anakan produktif per satuan luas, maka semakin banyak jumlah malai per satuan luas, dengan bulir-bulirnya yang terbentuk pada malai. Menurut Soemartono *et al.* (1984), jumlah anakan produktif ditentukan oleh jumlah anakan yang tumbuh sebelum mencapai fase primordia. Jumlah gabah per malai, persentase gabah isi, bobot 1000 butir dan hasil gabah kering panen (GKP) kg/luas ubinan serta hasil gabah kering giling GKG (t/ha). Berat 1000 biji dan persentase gabah berisi (Fageria, 1992).

Panen padi dilakukan setelah tanaman padi terlihat matang fisiologis. Pada penelitian ini, tanaman padi baru berumur 106 hari setelah sebar (106 hss). Tanaman padi yang telah siap panen memiliki ciri-ciri seperti buku

sebelah atas berwarna kuning, sedangkan batang malai kering dan isi gabah sukar dipecahkan dengan tangan, pada saat itulah tanaman padi siap untuk di panen. Pemanenan dilakukan selama 2 hari, panen hari pertama yaitu pengambilan sampel 10 rumpun tanaman padi per petak yang dilakukan pada saat tanaman padi berumur 105 hss. Rumpun yang dijadikan sampel dipanen terlebih dahulu untuk menghitung variabel produksi. Hari kedua yaitu pemanenan seluruh tanaman padi tiap petak percobaan kecuali dua baris tanaman yang ada di pinggir (luas ubinan: 6 m x 2 m).

Setelah panen, dilakukan perontokan dengan menggunakan alat perontok tradisional, kemudian hasilnya ditimbang. Setelah ditimbang, dihitung kadar air gabah tersebut dengan menggunakan *moisture tester*. Data hasil gabah per petak di konversikan menjadi gabah kering giling pada kadar air 14 %. Pengamatan utama meliputi pengamatan terhadap variabel pertumbuhan dan variabel produksi. Pengamatan terhadap variabel pertumbuhan meliputi: tinggi tanaman dan jumlah anakan per rumpun dilakukan pada saat tanaman berumur 14, 21, 28, 42, 56 dan 70 hst. Umumnya petani di wilayah Sukorejo, Sambirejo, menggunakan benih IR-64 dengan rata-rata produksi padi 5 ton/ha.

3. Analisis Kultur Sosial Petani pada Pertanian Organik dan Anorganik

Pengambilan data sosial ekonomi dilakukan secara langsung yaitu wawancara dan angket dengan petani termasuk: mata pencaharian, lama usaha tani, pekerjaan utama, umur, pendidikan, modal, benih, pupuk, tenaga kerja, produksi, pendapatan kotor dan bersih.