

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada tanggal 01 Februari sampai 31 Mei 2011 di Laboratorium Mikrobiologi Tanah dan Rumah Kaca Balai Penelitian Tanaman Kacang- kacang dan Umbi-umbian (BALITKABI) Kendalpayak Malang Jawa Timur.

3.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan di rumah kaca adalah kaleng (ember), poly bag, spidol, kertas karton sebagai label. Untuk alat-alat dalam laboatorium diperlukan timbangan analitik, autoclave, oven, vortex orbital shaker, laminar flow, tabung reaksi, gelas ukur, beacker glass, mikropipet, bunsen, tabung erlenmeyer.

Bahan-bahan yang digunakan meliputi benih kedelai varietas Anjasmoro, tanah masam, air, pupuk N (Urea), pupuk P (SP 36), pupuk organik (santap), multi isolat bakteri *Rhizobium*, isolat bakteri pelarut fosfat M₁ dan isolat bakteri pelarut fosfat M₂, media YMA (Yeast Manittol Agar) Broth dan media YMA padat, media Pikovskaya Broth dan media Pikovskaya padat, media NA broth dan padat. Adapun bahan yang digunakan untuk media YMA (Yeast Manittol Agar) Broth sebagai media inokulum bakteri multiisolat *Rhizobium* meliputi Mannitol, K₂HPO₄, MgSO₄, NaCl, Yeast Extract, Distilled Water. Apabila media yang digunakan padat, maka hanya menambah agar pada larutan terakhir. Untuk media Pikovskaya Broth sebagai media inokulum bakteri pelarut fosfat diperlukan bahan-bahan seperti Glukosa, (NH₄)₂SO₄, MgSO₄.7H₂O, KCl, Yeast Extract, NaCl, FeSO₄. 7H₂O, Ca₃PO₄, MnSO₄.H₂O, Distilled Water. Apabila media yang

diinginkan padat, hanya menambah agar pada larutan terakhir. Media untuk inokulum *Rhizobium* dan bakteri pelarut fosfat saat menginokulasikan pada tanaman adalah media NA Broth. Komposisi NA (Nutrient Agar) Broth antara lain: Pepton, Yeast ekstrak, NaCl, Glukosa, dan aquades.

3.3 Rancangan Penelitian

Rancangan yang digunakan dalam penelitian ini yakni menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) faktorial dengan 2 faktor 6 ulangan. Tiga ulangan untuk sampel destruktif (melihat bintil akar) sampai fase vegetatif akhir/mulai berbunga, tiga ulangan lainnya (melihat hasil biji) sampai masak fisiologis.

Faktor I : Inokulasi Multi Isolat

I_1 = Kontrol (tanpa inokulasi)

I_2 = *Rhizobium*

I_3 = *Rhizobium* dan Inokulasi Bakteri Pelarut P Multi Isolat 1 (M_1)

I_4 = *Rhizobium* dan Inokulasi Bakteri Pelarut P Multi Isolat 2 (M_2)

I_5 = *Rhizobium* dan Inokulasi Bakteri Pelarut P Multi Isolat 1 (M_1)

+ pupuk organik (santap)

I_6 = *Rhizobium* dan Inokulasi Bakteri Pelarut P Multi Isolat 2 (M_2)

+ pupuk organik (santap)

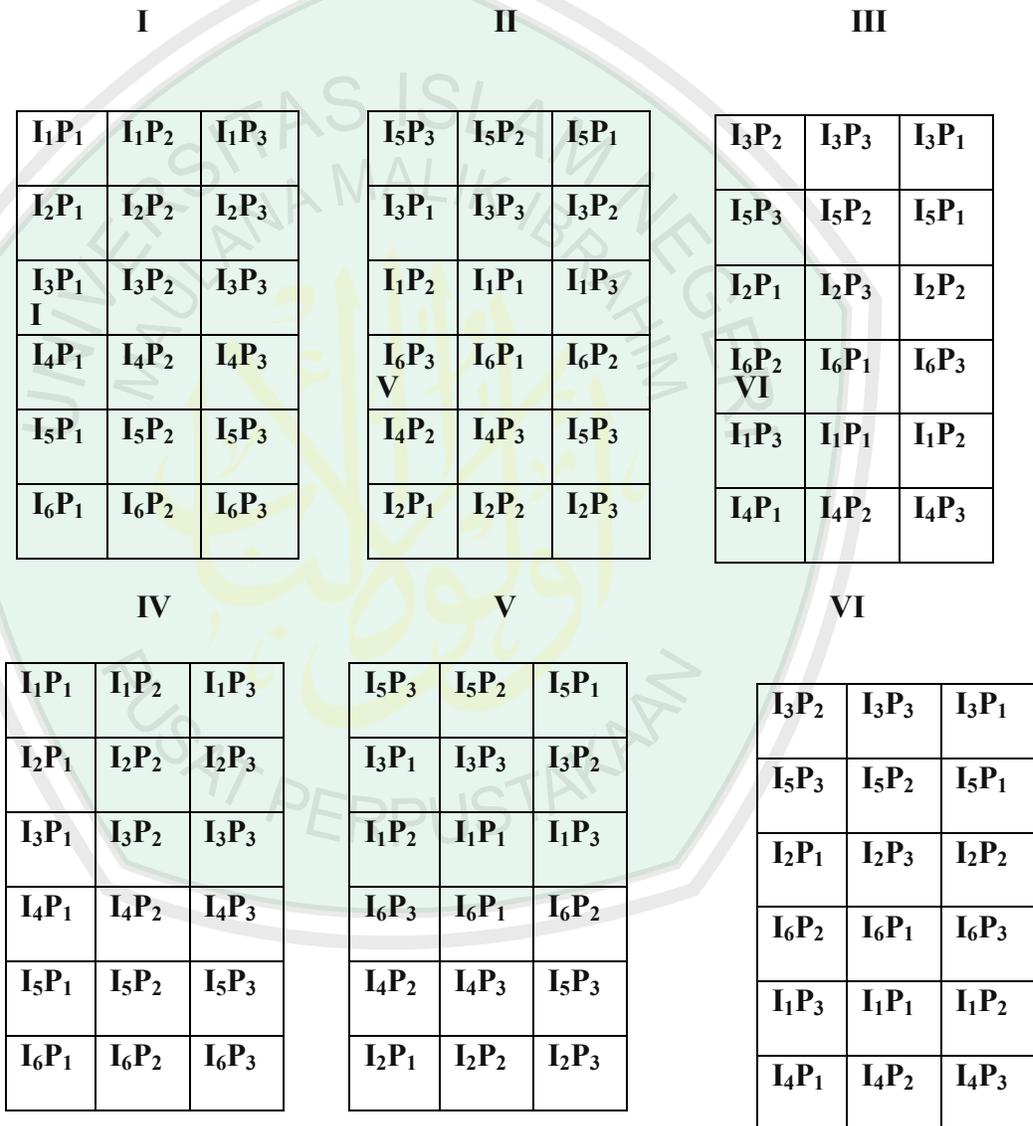
Faktor II : Pemupukan

P₁ = Tanpa Pupuk

P₂ = 100 kg Urea/ha setara dengan (0.25 g Urea/pot).

P₃ = 100 kg Urea/ha+200 kg SP 36/ha setara dengan (0.25 g Urea/pot + 0.5 g SP 36/pot).

Dengan demikian diperoleh 18 kombinasi yang ada pada denah dibawah ini:



Keterangan :

I_1P_1 = Tanpa inokulasi, tanpa pupuk

I_1P_2 = Tanpa inokulasi + pupuk N

I_1P_3 = Tanpa inokulasi + pupuk NP

I_2P_1 = *Rhizobium*, tanpa pupuk

I_2P_2 = *Rhizobium* + pupuk N

I_2P_3 = *Rhizobium* + pupuk NP

I_3P_1 = *Rhizobium* + Bakteri Pelarut P Multi Isolat 1 (M_1), tanpa pupuk

I_3P_2 = *Rhizobium* + Bakteri Pelarut P Multi Isolat 1 (M_1) + pupuk N

I_3P_3 = *Rhizobium* + Bakteri Pelarut P Multi Isolat 1 (M_1) + pupuk NP

I_4P_1 = *Rhizobium* + Bakteri Pelarut P Multi Isolat 2 (M_2), tanpa pupuk

I_4P_2 = *Rhizobium* + Bakteri Pelarut P Multi Isolat 2 (M_2) + pupuk N

I_4P_3 = *Rhizobium* + Bakteri Pelarut P Multi Isolat 2 (M_2) +pupuk NP

I_5P_1 = *Rhizobium* + Bakteri Pelarut P Multi Isolat 1 (M_1) + Santap, tanpa pupuk

I_5P_2 = *Rhizobium* + Bakteri Pelarut P Multi Isolat 1 (M_1) + Santap+ pupuk N

I_5P_3 = *Rhizobium* + Bakteri Pelarut P Multi Isolat 1 (M_1) + Santap + pupuk NP

I_6P_1 = *Rhizobium* + Bakteri Pelarut P Multi Isolat 2 (M_2) + Santap, tanpa pupuk

I_6P_2 = *Rhizobium* + Bakteri Pelarut P Multi Isolat 2 (M_2) + Santap + pupuk N

I_6P_3 = *Rhizobium* + Bakteri Pelarut P Multi Isolat 2 (M_2) + Santap + pupuk NP

1.4 Cara Kerja

Penelitian ini dilakukan di 2 tempat yaitu di laboratorium dan rumah kaca. Kegiatan laboratorium untuk menyiapkan inokulum bakteri multiisolat *Rhizobium* dan inokulum bakteri

pelarut fosfat, membuat media NA Broth sebagai media inokulum *Rhizobium* dan bakteri pelarut fosfat yang akan diinokulasikan pada tanaman kedelai, media YMA digunakan sebagai media menghitung populasi bakteri *Rhizobium* dalam sampel tanah dan media Pikovskaya untuk menghitung populasi bakteri pelarut fosfat dalam sampel tanah.

Kegiatan di rumah kaca untuk pemilihan benih yang akan ditanam, aplikasi media tanah, pemupukan, penanaman, pemeliharaan, menginokulasikan multi isolat bakteri *Rhizobium* dan bakteri pelarut fosfat, penyulaman, pembuangan batang tanaman (disisakan 2 batang), pemanenan dan pengamatan. Berikut kegiatan-kegiatan yang dilakukan secara terperinci:

3.4.1 Laboratorium

3.4.1.1 Menyiapkan inokulum bakteri multiisolat *Rhizobium*

Langkah awal untuk menyiapkan inokulum bakteri multiisolat *Rhizobium* yakni membuat media YMA cair sebagai media isolasi bakteri *Rhizobium* dengan komposisi sebagai berikut : Mannitol 5 gram, K_2HPO_4 0,25g gram, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,1 gram, NaCl 0,05 gram, Yeast Extract 0,25 gram, Distilled Water (Aquades) sebanyak 500 cc. Kemudian dimasukkan kedalam 3 tabung erlenmeyer sebanyak 15 ml dan diberi label A, B dan C. Ujung mulut tabung ditutup dengan kapas. Disterilkan ke dalam autoclave dengan tekanan 120^0C selama 20 menit.

Mengambil 1 ose biakan bakteri multiisolat *Rhizobium* dari media agar miring. Dimasukkan masing-masing jenis kedalam media YMA cair yang telah dibuat label A, B, C dan K (kontrol), diinkubasi diatas shaker orbital selama 4 hari berkecepatan 90 rpm pada suhu kamar.

Media untuk inokulum bakteri *Rhizobium* adalah media NA (Nutrient Agar) Broth. Komposisi NA (Nutrient Agar) Broth antara lain : Pepton 15 gram, Yeast ekstrak 5 gram, NaCl 6 gram, Glukosa 1 gram, 1 liter aquades. Semua bahan dicampur menjadi satu. Kemudian

dimasukkan ke dalam 4 tabung elemeyer masing-masing sebanyak 15 ml. Ujung mulut tabung ditutup dengan kapas. Disterilkan ke dalam autoclave dengan tekanan 120°C selama 20 menit. Kemudian 4 tabung erlenmeyer yang telah disterilkan diberi label A, B, C dan K (kontrol).

Multi isolat *Rhizobium* yang telah diinkubasi dimasukkan kedalam tabung erlenmeyer yang berisi NA Broth masing-masing sebanyak 2 ml pada label A, B, C dan K (kontrol) yang telah dibuat. Untuk mengatasi adanya kontaminasi maka aktivitas ini menggunakan laminar flow dan didekat bara api (bunsen). Kemudian dishaker \pm 15 menit untuk menghomogenkan dan diinokulasikan pada tanaman kedelai.

3.4.1.2 Menyiapkan inokulum Bakteri Pelarut Fosfat

Media isolasi bakteri pelarut fosfat yang sesuai adalah media Pikovskaya. Komposisi untuk membuat media tersebut yaitu: Glukosa 5 gram, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,25 gram, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05 gram, KCl 0,1 gram, Yeast Extract 0,25 gram, NaCl 0,1 gram, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,002 gram, Ca_3PO_4 2,5 gram, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, dan Distilled Water (Aquades) 500 cc. Kemudian dimasukkan kedalam 3 tabung erlenmeyer sebanyak 15 ml dan diberi label A, B dan K (kontrol). Ujung mulut tabung ditutup dengan kapas. Disterilkan ke dalam autoclave dengan tekanan 120°C selama 20 menit.

Mengambil 1 ose biakan bakteri pelarut fosfat dengan jenis M_1 dan M_2 dari media agar miring. Dimasukkan masing-masing jenis kedalam media Pikovskaya cair, diberi label A, B dan K (tidak diberi perlakuan atau sebagai kontrol), A dimasukkan bakteri pelarut fosfat jenis M_1 , dan B dimasukkan bakteri pelarut fosfat jenis M_2 , diinkubasi diatas shaker orbital selama 4 hari berkecepatan 90 rpm pada suhu kamar.

Media untuk inokulum bakteri pelarut fosfat adalah media NA (Nutrient Agar) Broth. Komposisi NA Broth antara lain : Pepton 15 gram, Yeast ekstrak 5 gram, NaCl 6 gram, Glukosa

1 gram, 1 liter aquades. Semua bahan dicampur menjadi satu. Kemudian dimasukkan ke dalam 3 tabung elemeyer masing-masing sebanyak 15 ml. Ujung mulut tabung ditutup dengan kapas. Disterilkan ke dalam autoclaf dengan 120°C selama 20 menit.

Multi isolat bakteri pelarut fosfat yang telah diinkubasi dimasukkan ke dalam tabung erlenmeyer yang berisi NA Broth masing-masing sebanyak 2 ml. Diberi label A dimasukkan bakteri pelarut fosfat jenis M_1 , B dimasukkan bakteri pelarut fosfat jenis M_2 , dan K sebagai kontrol. Kemudian dishaker ± 15 menit untuk menghomogenkan dan diinokulasikan pada tanaman kedelai.

3.4.1.3 Menghitung populasi bakteri *Rhizobium* dalam sampel tanah

Populasi bakteri *Rhizobium* dalam sampel tanah dilakukan untuk mengetahui berapa banyak bakteri yang ada dalam sampel tanah yang digunakan dalam penelitian ini. Dengan menggunakan metode pengenceran dengan cara mengambil sampel tanah, lalu diayak dan ditimbang sebanyak 10 gram. Di dalam laminar flow dan didekatkan dengan api bunsen, dimasukkan 10 gram sampel tanah ke dalam tabung elemeyer yang berisi 90 ml larutan aquades steril dan ditutup kembali ujung tabung dengan kapas dan dishaker ± 1 jam. Pada tabung elemeyer ini diberi label 10^{-1} . Setelah itu diambil 1 ml dengan mikropipet dari pengenceran 10^{-1} dan dimasukkan pada tabung reaksi yang berisi larutan steril sebanyak 9 ml dan diberi label 10^{-2} , lepas dan tarikkan sampai 3 kali pada mikropipet, ganti tups setiap kali pengenceran dan seterusnya sampai pengenceran kelima. Pada pengenceran keempat dan kelima, dimasukkan ke dalam cawan petri yang berisi media YMA padat sampai 3 kali ulangan. Diamati dan dihitung koloni yang terbentuk dengan ciri bakteri *Rhizobium* berwarna putih keruh dan berbentuk bulat dalam media YMA.

Berikut hasil pengamatan jumlah populasi bakteri *Rhizobium* didalam tanah :

$$\frac{1}{0,98} \times 400 = 408.16 \times 10^{-4}$$
$$= 4.081.632/ 1 \text{ gram tanah}$$

3.4.1.4 Menghitung populasi Bakteri Pelarut Fosfat dalam sampel tanah

Menghitung populasi bakteri pelarut fosfat pada sampel tanah bertujuan agar dapat mengetahui jumlah koloni yang terdapat pada sampel tanah. Dengan mengambil sampel tanah, lalu diayak dan ditimbang sebanyak 10 gram, dimasukkan kedalam tabung elemeyer yang berisi 90 ml larutan aquades steril dan ditutup kembali ujung tabung dengan kapas dan dishaker \pm 1 jam. Pada tabung elemeyer ini diberi label 10^{-1} . Setelah itu diambil 1 ml dengan mikropipet dari pengenceran 10^{-1} dan dimasukkan pada tabung reaksi yang berisi larutan steril sebanyak 9 ml dan diberi label 10^{-2} , lepas dan tarikkan sampai 3 kali pada mikropipet, ganti tups setiap kali pengenceran dan seterusnya sampai pengenceran kelima. Pada pengenceran keempat dan kelima, dimasukkan kedalam cawan petri yang berisi media pikovskaya padat sampai 3 kali ulangan selama 4 hari. Setelah diamati selama 4 hari berturut-turut ternyata bakteri pelarut fosfat memiliki potensi untuk melarutkan fosfat tidak tersedia secara kualitatif dicirikan oleh zona bening (holozone) disekitar koloni mikroorganisme yang tumbuh pada media Pikovskaya.

Berikut hasil pengamatan jumlah populasi bakteri pelarut fosfat didalam tanah :

$$\frac{1}{0,98} \times 87 = 88.77 \times 10^{-4}$$
$$= 887.000/ 1 \text{ gram tanah}$$

3.4.2 Rumah Kaca

3.4.2.1 Pemilihan Benih Kedelai

Benih yang digunakan pada penelitian ini adalah varietas Anjasmoro, yang merupakan varietas toleran masam, tahan rebah, moderat pada penyakit karat daun serta memiliki sifat

polong yang tidak mudah pecah. Benih-benih ini dipilih benih yang terbaik dan tidak terkena penyakit dan hama.

3.4.2.2 Persiapan Media Tanah

Media tanah yang digunakan adalah tanah masam yang berasal dari Lampung. Tanah dikeringkan dan dihaluskan menggunakan pengayak, kemudian tanah ditimbang sebanyak 5 Kg/pot.

3.4.2.3 Pembuatan Label Tanaman

Label tanaman dibuat dari kertas karton dan ditulis dengan spidol permanen dan dimasukkan kedalam plastik. Lalu label disteples menurut perlakuan dikawat kaleng tanah yang akan ditanami kedelai. Contoh: P₁I₁, P₂I₂, dan seterusnya.

3.4.2.4 Pemupukan

Pemupukan dilakukan dengan cara menimbang pupuk N (Urea) 0.25 g dan pupuk P (SP 36) 0.5 g. Hal ini bertujuan untuk memperbaiki produktivitas tanah. Pemupukan dilakukan dengan cara membuat lubang disekitar tanaman lalu dimasukkan pupuk-pupuk tersebut sesuai pada label tanaman kemudian ditutup kembali lubang tanahnya.

Untuk memperbaiki kondisi fisik, kimia dan biologi tanah pemberian pupuk organik (santap) juga diaplikasikan. Pemupukan dilakukan dengan mencampur tanah dengan pupuk sampai homogen. Pupuk santap diberikan pada label bertanda khusus.

3.4.2.5 Penanaman

Penanaman ini dilakukan di dalam rumah kaca, dengan cara memasukkan 4 butir benih kedelai pada media tanah yang sudah disiapkan. Tanah yang sudah digali harus terpisah-pisah dalam tiap butirnya, dan saat menggali tidak boleh terlalu dalam $\pm 1,5$ cm dari permukaan tanah.

Tanah ditutup kembali kemudian mengaplikasikan pupuk anorganik kepermukaan pot dan disiram dengan air secukupnya.

3.4.2.6 Pemberian inokulasi multiisolat *Rhizobium* dan Bakteri Pelarut Fosfat pada tanaman

Inokulasi ini dilakukan pada tanaman berumur 10 hari. Inokulasi bakteri multi isolat *Rhizobium* dan Bakteri Pelarut Fosfat yang sudah disiapkan di laboratorium diinokulasikan dengan cara: mengambil 2 ml inokulan dengan menggunakan mikropipet. Kemudian ditetaskan pada tanah yang mengelilingi permukaan tanaman. Inokulasi dilakukan pada semua perlakuan sesuai denah rancangan penelitian yang telah dibuat.

3.4.2.7 Pemeliharaan

Pemeliharaan tanaman dilakukan dengan cara penyiraman yang dilakukan dua hari sekali atau dilakukan sesuai kebutuhan, penyiangan dilakukan dengan mencabut rumput-rumput yang tumbuh disekitar tanaman, mengikat batang tanaman pada ajir (bambu) dan tali rafia agar tanaman dapat berdiri tegak, penyemprotan dengan pestisida digunakan untuk melindungi tanaman dari hama dan penyakit.

3.4.2.8 Penyulaman

Penyulaman yaitu menanam kembali benih baru apabila benih yang ditanam tidak tumbuh, pertumbuhannya kurang bagus atau mati. Penyulaman ini dilakukan saat tanaman berumur satu minggu setelah tanam (ST).

3.4.2.9 Penjarangan

Penjarangan dilakukan saat tanaman berumur 7 hari (1 minggu) dengan cara memotong batang tanaman kedelai didalam pot yang berisi 4 batang, dan disisakan 2 batang tanaman yang

paling bagus pertumbuhannya agar tidak terjadi kompetisi antar tanaman dalam memperoleh nutrisi.

3.4.2.10 Pemanenan dan Pengamatan

Pemanenan dilakukan 2 kali yaitu panen pada umur 45 hari dan panen masak fisiologis. Pada panen 45 hari, parameter yang diamati adalah bintil akar dan berat kering tanaman yang dilakukan dengan merusak sampel destruktif pada pot dengan cara mencabut akar tanaman dan mencuci sampai bersih dan kering (diusahakan bintil akar tidak terlepas dari akarnya). Setelah itu menghitung jumlah bintil akar per pot dan setelah dihitung, tanaman dioven selama 3 hari untuk mengetahui berat kering tanaman kedelai tersebut. Sedangkan pada panen masak fisiologis, dilakukan pada saat tanaman kedelai berumur 90 hari. Parameter yang diamati meliputi tinggi tanaman, berat biji dan berat 100 biji. Sebelum mengambil polong, tinggi tanaman diukur terlebih dahulu. Tanaman yang telah diukur, lalu diambil polong yang sudah kering atau masak secara fisiologis dan dimasukkan kedalam kantong yang telah diberi label atau tanda tiap perlakuan.

4.2.11 Parameter Pengamatan (Data Pengamatan)

Data yang diambil dalam penelitian ini antara lain:

1. Tinggi Tanaman

Tinggi tanaman diamati dengan cara diukur dari atas permukaan tanah sampai titik tumbuh tanaman setiap perlakuan menggunakan penggaris.

2. Jumlah Bintil Akar

Tanaman yang telah dipanen pada 45 hari, dibersihkan dari tanah, bintil akar dipisah dari akar dengan cara diambil dari akar kemudian dihitung jumlah bintil akar efektifnya. Ciri-ciri bintil akar efektif yaitu bulat berwarna kemerahan.

3. Berat Kering

Tanaman yang telah dipisahkan dari bintil akar kemudian dioven selama 3x24 jam pada suhu 75°C setelah itu ditimbang berat kering tanamannya.

4. Berat Biji

Polong yang telah dipanen kemudian dikupas kulitnya dan diambil semua biji dan ditimbang dengan menggunakan timbangan analitik.

5. Berat 100 Biji

Untuk mengetahui berat /100 biji, dapat dihitung dengan rumus:

$$\frac{100}{\text{Jumlah biji total}} \times \text{Berat biji total}$$

3.5 Analisis Data

Data yang telah diperoleh kemudian dianalisis dengan Analysis Of Variance (ANOVA) menggunakan program SPSS versi 16, untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap variabel pengamatan. Kemudian dilanjutkan dengan uji Duncan taraf 5% untuk mengetahui pengaruh terbaik atau perbandingan antar kombinasi perlakuan.

3.6 Diagram Kerja

