

## **BAB III METODOLOGI PENELITIAN**

### **3.1 Waktu dan tempat**

Penelitian ini dilakukan pada tanggal 01 Februari – 31 Juni 2011 di Laboratorium Mikrobiologi, Bioteknologi, Kultur Jaringan dan Rumah Kaca Balai Penelitian Tanaman Kacang-kacangan dan Umbi-umbian (BALITKABI) JL. Raya Kendalpayak, Malang, Jawa Timur.

### **3.2 Alat dan bahan**

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah tabung reaksi, rak tabung, petridis, tabung elemeyer, autoclave, timbangan analitik, shaker, gelas ukur, pengaduk kaca, gembor, ose, gunting, penggaris, cetok, nampan, saringan tanah dan inkubator.

Sedangkan bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah kedelai varietas Anjasmoro, tanah Lampung yang sudah ditaruh kedalam 135 pot sebanyak 5 kg, bakteri pelarut Fosfat multi isolat M1 yaitu multi isolat terbaik I dari penelitian sebelumnya dan multi isolat M2 yaitu multi isolat terbaik 2 dari penelitian sebelumnya, M(1+2) perlakuan kombinasi dari multi isolat terbaik I dan multi isolat terbaik 2 dari penelitian sebelumnya, dan bakteri pelarut Fosfat komersial, pupuk SP 36, pupuk KCl, NaCl, Mannitol,  $K_2HPO_4$ ,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , Yeast Extract, agar, Glukosa,  $(NH_4)_2 SO_4$ , KCl,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $Ca_3PO_4$ ,  $MnSO_4 \cdot H_2O$ , Aquades, kertas label, kertas manila, tali rafia, bambu untuk ajir tanaman dan plastik.

### 3.3 Metode pelaksanaan

Penelitian ini disusun menggunakan rancangan RAK Faktorial, dengan dua faktor dan menggunakan ulangan sebanyak 3 kali. Dengan faktor pertama adalah faktor inokulasi multi isolat bakteri pelarut Fosfat (P) dan faktor kedua adalah pupuk P yaitu pemberian SP 36.

Faktor I terdiri dari beberapa perlakuan inokulasi bakteri pelarut Fosfat:

- I1 : Tanpa inokulasi bakteri pelarut P (Kontrol)
- I2 : Inokulasi bakteri pelarut P multi isolat I (M1)
- I3 : Inokulasi bakteri pelarut P multi isolat II (M2)
- I4 : Inokulasi bakteri pelarut P multi isolat M(I+2)
- I5 : Inokulasi bakteri pelarut P komersial

Faktor II terdiri atas beberapa perlakuan konsentrasi pemberian pupuk anorganik (SP 36) yaitu:

- P1 = Tanpa SP 36 (Kontrol)
  - P2 = 3 gram/pot atau setara dengan 100 kg SP 36/ ha
  - P3 = 6 gram/pot atau setara dengan 200 kg SP 36/ ha
- Konversi pupuk SP 36 (Lampiran 6. )

Kombinasi yang diperoleh dari ketiga perlakuan ini adalah :

- |         |          |          |
|---------|----------|----------|
| 1. P1I1 | 6. P2I1  | 11. P3I1 |
| 2. P1I2 | 7. P2I2  | 12. P3I2 |
| 3. P1I3 | 8. P2I3  | 13. P3I3 |
| 4. P1I4 | 9. P2I4  | 14. P3I4 |
| 5. P1I5 | 10. P2I5 | 15. P3I5 |

Denah kombinasi penelitian adalah:

5	8	12	14	3	10	4	7	13
2	6	15	11	1	7	2	9	14
3	10	11	13	4	6	5	8	12
1	9	13	12	5	8	1	10	15
4	7	14	15	2	9	3	6	11

Keterangan denah (Lampiran 7. )

### 3.4 Pelaksanaan Penelitian

Penelitian ini dilakukan di laboratorium dan rumah kaca. Kegiatan laboratorium untuk menyiapkan inokulum bakteri pelarut Fosfat (P), membuat media Pikovskaya untuk menghitung populasi bakteri pelarut Fosfat (P) dalam 1 ml inokulum dan menghitung populasi bakteri pelarut Fosfat (P) dalam sampel tanah.

Kegiatan di rumah kaca untuk pemilihan benih yang akan ditanam, aplikasi media tanah, pemupukan, penanaman, menginokulasikan multi isolat bakteri, pemeliharaan, penyulaman, pembuangan batang tanaman yang disisakan 2 batang saja, pemanenan dan pengamatan

#### 3.4.1. Kegiatan di Laboratorium

##### 3.4.1.1 Menyiapkan inokulum bakteri pelarut Fosfat (P)

Media untuk inokulum adalah media NA Broth. Komposisi NA Broth antara lain : Pepton 15 gram, Yeast ekstrak 5 gram, NaCl 6 gram, Glukosa 1 gram, 1 liter aquades.

Semua bahan diatas 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 suhu  $120^{\circ}\text{C}$  selama 20 menit.

Mengambil 1 ml dengan mikropipet biakan multi isolat bakteri pelarut Fosfat dari media NA Broth, dimasukkan kedalam tabung elemeyer yang berisi NA Broth sebanyak 15 ml. . Diberi label pada permukaan tabung, dengan huruf K (kontrol), M1, dan M2. Digojok selama 7 hari dan dihitung populasi bakteri pelarut Fosfat dan diinokulasikan pada tanaman.

#### **3.4.1.2 Menghitung populasi bakteri pelarut Fosfat (P) dalam 1 ml inokulum**

Media untuk menghitung populasi bakteri pelarut Fosfat (P) di dalam 1 ml inokulum adalah media Pikovskaya. Komposisi atau bahan-bahan media pikovskaya yaitu: Glukosa 5 gram,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,05 gram, Yeast Extract 0,25 gram, Agar 10 gram,  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  0,25 gram, KCl 0,1 gram,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,002 gram,  $\text{Ca}_3\text{PO}_4$  2,5 gram, NaCl 0,1 gram,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  kira-kira 3 butir, aquades 500 ml. Disterilkan ke dalam autoclaf dengan suhu  $120^{\circ}\text{C}$  selama 20 menit. Setelah disterilisasi media baru dituang ke dalam petridish.

Menghitung populasi bakteri pelarut Fosfat pada isolat yang diinokulasikan pada tanaman bertujuan agar dapat mengetahui jumlah koloni yang terdapat pada 1 ml isolat tersebut. Dengan cara pengenceran. Caranya dengan di dalam laminar flow dan didekatkan dengan api bunsen. Pada tabung elemeyer yang berisi isolat 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 tarik sampai 3 kali pada mikropipet, ganti tups setiap kali pengenceran dan seterusnya sampai pengenceran kelima. Pada

pengenceran keempat dan kelima, dimasukkan kedalam petridish yang berisi media pikovskaya. Sampai 3 kali ulangan. Diamati pada hari 1 sampai hari 5 dan dihitung koloni yang mempunyai zona bening (halozone) disekitarnya. Dan diketahui populasinya sebesar 229.66/1 ml inokulum.

### **3.4.1.3 Menghitung populasi bakteri pelarut Fosfat (P) dalam sampel tanah**

Media untuk menghitung populasi bakteri pelarut Fosfat (P) di dalam sampel tanah yaitu media Pikovskaya. Komposisi atau bahan-bahan media pikovskaya yaitu: Glukosa 5 gram,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,05 gram, Yeast Extract 0,25 gram, Agar 10 gram,  $(NH_4)_2 SO_4$  0,25 gram, KCl 0,1 gram,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0,002 gram,  $Ca_3PO_4$  2,5 gram, NaCl 0,1 gram,  $MnSO_4 \cdot H_2O$  kira-kira 3 butir, aquades 500 ml. Disterilkan ke dalam autoclaf dengan suhu  $120^{\circ}C$  selama 20 menit. Setelah disterilisasi media baru dituang ke dalam petridish.

Menghitung populasi bakteri pelarut Fosfat pada sampel tanah bertujuan agar dapat mengetahui jumlah koloni yang terdapat pada sampel tanah. Dengan cara pengenceran. Caranya 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 kedalam tabung elemeyer yang berisi 90 ml larutan aquades steril dan ditutup kembali ujung tabung dengan kapas dan digojok kira-kira 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 petridish yang berisi media pikovskaya. Sampai 3 kali ulangan. Diamati pada hari 1 sampai hari 5 dan dihitung koloni yang mempunyai zona bening.

Setelah diamati selama 5 hari, populasi bakteri pelarut Fosfat didalam tanah diketahui sebagai berikut :

$$\begin{aligned}
 &= \frac{1}{0,98} \times 121 \\
 &= 123,4 \times 10^2 \\
 &= 12300 \text{ SPK (Satuan Pembentuk Koloni) /1 gram tanah}
 \end{aligned}$$

### **3.4.2 Di Rumah Kaca**

#### **3.4.2.1 Pemilihan benih kedelai**

Benih yang digunakan pada penelitian adalah varietas Anjasmoro, karena varietas ini tahan masam, ketahanannya pada rebah, serta moderat pada penyakit karat daun. Selain itu, varietas ini 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**

Menimbang tanah (5 kg) dan memasukkan tanah kedalam masing-masing kaleng sebanyak 45 kaleng dan menatanya menurut denah percobaan dan ulangannya.

#### **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 di kawat kaleng tanah yang akan ditanami kedelai. Contoh: P1I1, P2I2 dan seterusnya.

#### **3.4.2.4 Pemupukan**

Pemupukan dilakukan dengan cara menimbang pupuk SP 36 dengan takaran 3 dan 6 gram. Pupuk KCl 2 gram, dan pupuk Urea 2 gram yang digunakan sebagai pupuk dasar. Pemupukan dilakukan dengan cara membuat lubang disekitar tanaman lalu dimasukkan pupuk-pupuk tersebut sesuai pada label tanaman. Dan ditutupi kembali lubang tanahnya.

#### **3.4.2.5 Penanaman**

Penanaman ini dilakukan di dalam rumah kaca pada kaleng-kaleng berukuran 5 kg. cara penanaman kedelai yaitu media tanah yang sudah disiapkan dan telah dicampur kapur dan pupuk kandang, benih dimasukkan 3 butir kedalam satu lubang tanah dengan tanah tipis lalu dipupuk dengan masing-masing perlakuan pada lubang lain (tidak boleh dalam 1 lubang). Dan disiram dengan air secukupnya.

#### **3.4.2.6 Inokulasi bakteri pelarut Fosfat pada tanaman**

Inokulasi ini dilakukan pada tanaman berusia 10 hari. Inokulasi bakteri pelarut Fosfat (P) yang sudah disiapkan di laboratorium, dengan cara: mengambil 2 ml inokulan dengan menggunakan mikropipet. Kemudian diteteskan ke tanah disamping tanaman. Dan inokulasi dilakukan pada semua perlakuan inokulasi sesuai dengan label.

#### **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 dan tali rafia agar tanaman dapat berdiri tegak, penyemprotan dengan pestisida untuk melindungi tanaman dari hama dan penyakit.

#### **3.4.2.8 Penyulaman**

Penyulaman yaitu mananami kembali dengan benih baru, dilakukan saat tanaman berumur satu minggu setelah tanam, yaitu terhadap tanaman yang mati atau pertumbuhannya yang kurang bagus.

#### **3.4.2.9 Penjarangan**

Penjarangan dilakukan dengan cara batang tanaman kedelai didalam pot yang berisi lebih dari 2 batang, dan disisakan 2 batang tanaman kedelai agar tidak terdapat kompetisi antar tanaman dalam memperoleh nutrisi.

#### **3.4.2.10 Pemanenan**

Pemanenan dilakukan pada saat tanaman kedelai berusia 60 hari. Caranya dengan mengambil polong-polong yang sudah kering atau masak fisiologis.

#### **3.4.2.11 Pengamatan**

Pengamatan meliputi:

1. Tinggi tanaman

Mengukur tinggi tanaman dilakukan pada saat panen kira-kira tanaman berusia 62 hst, mengukur tinggi tanaman ini dengan menggunakan penggaris.

2. Berat kering tanaman

Menimbang tanaman setelah dipanen dengan menggunakan timbangan analitik.

### 3. Berat biji total

Menimbang biji total tanaman setelah dipanen dengan menggunakan timbangan analitik.

### 4. Berat seratus biji

Menghitung konversi seratus biji dengan rumus:

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

### 3.5 Analisis Data

Data yang telah diperoleh akan dianalisis dengan analisis ragam (uji F) pada taraf 5% untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap peubah pengamatan, dan Uji Duncan taraf 5 % jika ada perbedaan.