

III. TATA CARA PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian telah dilaksanakan dari bulan Januari sampai bulan Maret 2018. Penelitian telah dilaksanakan di Laboratorium Agrobioteknologi dan lahan percobaan.

B. Bahan dan Alat Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah: Legin, Isolat bakteri *Filosfer* fiksasi Nitrogen, media NA, NC, Jensen's Agar, desinfektan, cat gram A, B, C, D, aquades, alkohol, benih kedelai varietas Gema dari Balitkabi dengan potensi hasil 3,06 ton/h, pupuk kandang, pupuk Urea, pupuk SP-36, pupuk KCl, pasir vulkanik, kapur, kertas payung, kertas filter, kapas, dan pestisida.

Alat yang digunakan untuk penelitian ini adalah: tabung reaksi, tabung ukur, *beaker glass*, cawan petri, *colony counter*, *rotary shaker*, *erlenmeyer*, mikro pipet, timbangan analitik, jarum ose, *driglasky*, pinset, pipet ukur, *blue and yellow tip*, autoklaf, oven, mikroskop, *Leaf Area Meter* (LAM), lampu bunsen, pH stik, label, spidol, cutter, stapler, gunting, karet gelang, plastik klep, timbangan (max 10 kg), penggaris, polibag ukuran 10 kg, karung plastik, cetok, gembor plastik, nampan, ayakan pasir, penyemprot air, dan plastik sungkup.

C. Metode Percobaan

Penelitian dilaksanakan menggunakan metode eksperimen dengan metode percobaan faktor tunggal dengan 4 perlakuan, yang disusun dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan perlakuan sebagai berikut:

A: tanpa inokulum *Rhizobium* sp. + tanpa semprot bakteri filosfer fiksasi Nitrogen

B: tanpa inokulum *Rhizobium* sp. + disemprot bakteri filosfer fiksasi Nitrogen

C: inokulum *Rhizobium* sp. + tanpa semprot bakteri filosfer fiksasi Nitrogen

D: inokulum *Rhizobium* sp. + disemprot bakteri filosfer fiksasi Nitrogen

Terdapat 4 perlakuan yang masing-masing diulang sebanyak 3 kali, dengan demikian diperoleh 12 unit perlakuan. Setiap unit perlakuan terdapat 3 tanaman sampel, 3 tanaman korban, dan 1 tanaman cadangan sehingga terdapat 84 tanaman. *Layout* penelitian disajikan pada lampiran 1.

D. Cara Penelitian

Tahap 1. Isolasi dan identifikasi bakteri filosfer fiksasi Nitrogen.

1. Sterilisasi alat

Alat-alat yang terbuat dari logam dan kaca dicuci bersih kemudian setelah kering dibungkus menggunakan kertas payung dan plastik klep, untuk alat yang berbentuk tabung ditutup menggunakan kapas. Alat-alat dari logam dan kaca yang telah terbungkus kemudian disterilkan dengan autoklaf pada temperatur 121° C bertekanan 1 atm selama 30 menit.

2. Pembuatan media pertumbuhan bakteri filosfer fiksasi Nitrogen

Media pertumbuhan yang digunakan adalah Yeast Manitol Agar dan Jensen's Agar. Seluruh bahan untuk membuat media dilarutkan dengan aquadest dalam Erlenmeyer, kemudian dipanaskan hingga mendidih agar seluruh bahan larut dengan air. Tingkat pH yang dikehendaki antara 6,5-7,2. Media yang telah siap kemudian disterilkan menggunakan autoklaf pada temperatur 121° C tekanan 1 atm selama 15 menit. Media kemudian dimasukkan dalam erlenmeyer.

3. Isolasi bakteri filosfer fiksasi Nitrogen

Isolasi bakteri filosfer fiksasi Nitrogen dilakukan dengan cara menggojok daun kedelai pada aquades steril untuk diisolasi pada media Jensen's Agar dengan metode *streak* dan *surface*, kemudian diinkubasi selama 48 jam. Koloni tunggal yang tumbuh pada media Jensen's diisolasi pada media agar miring untuk didapatkan kultur murni bakteri filosfer fiksasi Nitrogen (lampiran 7.1).

4. Identifikasi koloni isolat bakteri filosfer fiksasi Nitrogen

Identifikasi koloni dilakukan dengan cara menumbuhkan isolat bakteri filosfer fiksasi Nitrogen pada media Jensen's Agar. Pada tahap ini yang perlu diamati adalah warna, diameter, bentuk koloni, bentuk tepi, elevasi, dan struktur dalam bakteri bakteri filosfer fiksasi Nitrogen (lampiran 7.2), dan dilakukan juga uji cat gram untuk mengetahui sifat gram dan bentuk sel bakteri filosfer fiksasi Nitrogen (lampiran 7.3).

5. Pembuatan *starter* bakteri filosfer fiksasi Nitrogen

Pembuatan *starter* menggunakan isolat bakteri filosfer fiksasi Nitrogen yang sudah diperbanyak menggunakan 10 ml media NC dan diinkubasi selama 48 jam.

Setelah inkubasi, inokulum bakteri filosfer fiksasi Nitrogen diambil dari media *starter*, dimasukkan pada erlenmeyer yang berisi 100 ml media NC pada erlenmeyer untuk di-*shaker* selama 48 jam (lampiran 7.4), kemudian dihitung jumlah bakteri yang hidup menggunakan metode TPC (*Total Plate Count*) pada media NA.

Tahap 2. Aplikasi pada tanaman

1. Persiapan tanam

Persiapan tanam dilakukan dengan memasukkan media pasir vulkanik Merapi pada polibag sesuai dengan perhitungan (lampiran 3). Untuk tempat media tanam digunakan polibag ukuran 10 kg, dan ditambah dengan pupuk dengan dosis Urea 100 kg/h, SP-36 75 kg/h, dan KCl 100 kg/h, serta pupuk kandang 15 ton/h (lampiran 7.7) (BPTP, 2014) menggunakan metode *placement*, yaitu dengan dimasukkan ke dalam lubang di sisi kanan dan kiri lubang tanam sedalam 5 cm (lampiran 7.8).

2. Aplikasi Legin pada benih

Pemberian inokulum dilakukan dengan melumuri benih kedelai yang akan ditanam dengan legin (inokulum *Rhizobium* sp.) dengan dosis 7,5 gram/kg benih yang sebelumnya sudah direndam aquades, agar legin dapat melekat pada benih. Benih yang telah dibasahi dicampur dengan legin sampai melekat rata dan segera ditanam (lampiran 7.9) (Rafiastuti dkk., 2012).

3. Penanaman

Benih yang sudah diberi perlakuan ditanam di dalam polibag pada sore hari untuk mengurangi resiko stres pada benih, dengan cara membuat lubang tanam pada polibag, setiap lubang tanam diisi 2 benih kedelai untuk mengurangi resiko jika ada tanaman yang mati (lampiran 5) (lampiran 7.10).

4. Pemeliharaan

a. Penyiraman intensif

Penyiraman dilakukan secara intensif dilakukan pada saat perkecambahan (0-5 hst), stadium awal vegetatif (15-20 hst), masa pembungaan (25-35 hst) dan pengisian polong (35-65 hst).

b. Pemupukan susulan

Pemupukan susulan menggunakan pupuk Urea sebanyak 0,094 g/polibag pada umur tanaman 6 minggu setelah tanam. Pupuk diberikan menggunakan metode *placement*, yaitu dimasukkan ke dalam lubang di sekitar tanam sedalam 5 cm.

c. Penyiangan

Penyiangan gulma dilakukan setiap ada tumbuhan yang tidak dikehendaki tumbuh pada media tanam. Pengendalian gulma dilakukan secara manual, yakni dengan cara mencabut langsung karena area tanam yang tidak terlalu luas.

d. Aplikasi penyemprotan inokulum bakteri filosfer fiksasi Nitrogen

Penyemprotan bakteri filosfer fiksasi Nitrogen sesuai perlakuan dengan dua kali pemberian, yaitu pada umur 22 hst dan 42 hst. Dosis

penyemprotan yang digunakan adalah 200 ml untuk semua perlakuan. Penyemprotan dilakukan sampai inokulum bakteri filosfer fiksasi Nitrogen merata pada permukaan daun (lampiran 7.15).

e. Pengendalian hama dan penyakit

Pengendalian hama dan penyakit yang dilakukan adalah pada hama belalang hijau (*Dissosteira carolina*), menyerang polong dan biji sehingga mengempis dan kering dan biji bagian dalam atau kulit polong berbintik coklat. Pengendaliannya dengan menyemprot Azodrin 15 WCS.

5. Pemberian sungkup

Pemberian sungkup di lahan perlu dilakukan jika tempat penelitian berada pada lahan terbuka agar tanaman tidak rusak atau tidak efektif karena hujan, mengingat tanaman kedelai tidak suka terhadap banyak air dan untuk mencegah serangan hama yang ada di lahan.

6. Panen

Kedelai dapat dipanen setelah sebagian besar daun sudah menguning, buah mulai berubah warna dari hijau menjadi kuning kecoklatan dan retak-retak, atau polong sudah kelihatan tua, batang berwarna kuning agak coklat. Umur kedelai yang dipanen adalah 12 minggu setelah tanam. Panen kedelai dilakukan apabila sebagian besar daun sudah menguning, tetapi bukan karena serangan hama atau penyakit, lalu gugur, buah mulai berubah warna dari hijau menjadi kuning kecoklatan dan retak-retak atau polong sudah kelihatan tua, batang berwarna kuning agak coklat.

E. Parameter yang Diamati

1. Dinamika bakteri filofser fiksasi Nitrogen

Perhitungan populasi bakteri filofser fiksasi Nitrogen dilakukan pada sebelum aplikasi menggunakan metode *Total Plate Count* (TPC) pada media NA dengan cara 1 ml sampel inokulum cair diencerkan pada aquades steril sampai pada seri pengenceran 10^{-6} , 10^{-7} , dan 10^{-8} . Setiap 0,1 ml pada masing-masing seri pengenceran ditanam pada cawan petri berisi media NA, sehingga didapatkan seri pengenceran 10^{-7} , 10^{-8} , dan 10^{-9} , kemudian diinokulasikan dengan metode *surface plating*, dan diulang sebanyak 3 kali. Hasil perhitungan dinyatakan dalam satuan *colony forming unit for mililiter* (CFU/ml) menggunakan rumus:

$$JB = JK \times FP$$

Keterangan: JB: jumlah bakteri (CFU/ml)

JK: jumlah koloni tunggal

FP: faktor pengenceran

Syarat koloni yang dihitung yaitu:

- (1) jumlah koloni tiap cawan petri adalah 30-300 koloni;
- (2) tidak ada koloni yang menutup lebih besar dari setengah luas cawan petri (tidak ada *spreader*);
- (3) perbandingan jumlah bakteri dari hasil pengenceran yang berturut-turut antara pengenceran sebelumnya, jika sama atau lebih kecil dari 2 hasilnya dirata-rata, tetapi jika lebih besar dari 2, maka yang digunakan jumlah bakteri dari pengenceran sebelumnya;
- (4) jika dengan ulangan telah memenuhi syarat, maka hasilnya dirata-rata.

Dinamika bakteri filofser fiksasi Nitrogen pada daun kedelai dihitung dengan melakukan *surface plating* atau mengisolasi air dari daun kedelai pada setiap perlakuan dan diulang sebanyak 3 kali. Hasil perhitungan dinyatakan dalam satuan CFU/ml.

2. Nodulasi akar tanaman

a. Jumlah nodul (buah)

Jumlah nodul dihitung secara manual setelah tanaman dicabut, akar dibersihkan lalu dihitung jumlah nodul seluruhnya, dan dinyatakan dalam satuan buah.

b. Bobot nodul (g)

Semua nodul yang sudah dihitung, ditimbang dengan timbangan analitik. Hasil timbangan dinyatakan dengan satuan gram.

c. Efektivitas nodul (%)

Jumlah nodul efektif dihitung dengan rumus:

$\frac{\text{Jumlah nodul efektif}}{\text{Jumlah nodul yang diamati}} \times 100\%$, dan dinyatakan dalam satuan persen,

dengan cara diambil 20 nodul secara acak, lalu dipotong dengan *cutter*, diamati warna nodul. Bila berwarna merah berarti efektif, dan bila berwarna hitam tidak efektif. Pengamatan dilakukan 3 kali ulangan.

d. Diameter nodul (cm)

Diameter nodul diukur dengan menggunakan jangka sorong setelah tanaman dipanen, dengan cara mengambil 20 sampel nodul secara acak dan hasil pengukuran dirata-rata setiap perlakuan (gambar 7.13).

3. Perakaran tanaman

a. Panjang akar (cm)

Pengukuran panjang akar tanaman menggunakan penggaris dari pangkal batang hingga ujung akar terpanjang, dinyatakan dalam satuan cm.

b. Bobot segar akar (g)

Pengamatan bobot segar akar dilakukan dengan cara mencabut tanaman, kemudian membersihkan akar dari sisa bahan tanam yang masih menempel. Pengukuran bobot segar akar menggunakan timbangan analitik dan dinyatakan dalam satuan gram.

c. Bobot kering akar (g)

Setelah bobot segar akar diukur, selanjutnya akar dikeringanginkan selama 24 jam, kemudian dibungkus dengan kertas amplop pada masing-masing perlakuan dan dioven dengan temperatur 80° C selama 2-3 hari, kemudian ditimbang menggunakan timbangan analitik dan dinyatakan dalam satuan gram, sampai didapatkan bobot konstan.

4. Pertumbuhan tanaman**a. Tinggi tanaman (cm)**

Tinggi tanaman diukur menggunakan mistar dinyatakan dalam satuan centimeter dan diukur setiap satu minggu sekali sampai panen. Bagian tanaman yang diukur adalah bagian diantara pangkal batang sampai ujung pertumbuhan batang.

b. Jumlah daun (helai)

Jumlah daun dihitung secara manual dinyatakan dalam satuan helai daun, dan dihitung setiap satu minggu sekali sampai panen. Daun yang dihitung adalah daun yang sudah terbuka secara sempurna, daun yang masih kuncup tidak masuk dalam perhitungan.

c. Luas daun (cm²)

Luas daun diukur dengan menggunakan LAM (*Leaf Area Meter*) (gambar 7.14). Daun yang akan diukur, dipotong terlebih dahulu, lalu diukur menggunakan LAM dan dinyatakan dalam satuan cm².

d. Bobot segar tajuk (g)

Pengamatan bobot segar tajuk dilakukan dengan cara mencabut tanaman, kemudian dipotong bagian pangkal batang dan menimbang bagian batang, daun dan polong. Pengukuran bobot segar akar menggunakan timbangan analitik dan dinyatakan dalam satuan gram.

e. Bobot kering tajuk (g)

Setelah bobot segar tajuk diukur, selanjutnya tajuk dikeringanginkan selama 24 jam, kemudian dibungkus dengan kertas amplop pada masing-masing perlakuan dan dioven dengan temperatur 80° C selama 2-3 hari, kemudian ditimbang menggunakan timbangan analitik dan dinyatakan dalam satuan gram, sampai didapatkan bobot konstan.

5. Hasil Tanaman**a. Bobot biji per tanaman (g)**

Pengukuran bobot biji per tanaman dilakukan setelah panen dengan menimbang total biji yang terdapat pada setiap tanaman menggunakan timbangan analitik, dan dinyatakan dalam satuan gram (gambar 7.22).

b. Bobot 100 biji (g)

Pengamatan bobot 100 biji dilakukan setelah panen dengan menimbang bobot biji kedelai sebanyak 100 biji kering matahari dari setiap sampel tanaman, kemudian mengukur kadar air biji dan bobot keringnya dikonversikan pada kadar air 12% dengan rumus:

$$a = \frac{(100-Ka)}{100-12\%} \times b$$

Keterangan:

a : bobot 100 biji pada kadar air 12% (gram)

b : bobot 100 biji pada kadar air terukur (gram)

Ka : kadar air terukur (%)

c. Hasil panen (ton/h)

Pengamatan dilakukan setelah panen dari tanaman sampel hasil perlakuan yaitu dengan mengeringkan biji kedelai kemudian ditimbang diukur kadar airnya kemudian dikonversikan dalam ton/ha pada kadar air 12% dengan rumus:

$$H = \frac{A}{B} \times \frac{(100-Ka)}{100-12\%} \times C$$

Keterangan:

H : Hasil kedelai pada kadar air 12% (ton/h)

A : Luas lahan (h)

B : Luas petak hasil (m²)

C : Bobot biji per tanaman (kg)

Ka : Kadar air biji terukur (%)

F. Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan pengujian menggunakan sidik ragam (*Analysis of Variance*) dengan α 5%. Apabila hasil yang diperoleh menunjukkan signifikan (beda nyata) antar perlakuan, maka dilakukan uji lanjut dengan menggunakan uji *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT) pada taraf nyata 5% untuk mengetahui perlakuan terbaik. Apabila pada saat analisis data didapatkan hasil yang tidak valid, maka dilakukan transformasi data. Data ditampilkan dalam bentuk tabel dan gambar.