III. TATA CARA PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Agrobioteknologi, Laboratorium Penelitian dan lahan percobaan Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Yogyakarta pada bulan September 2015 sampai Juni 2016.

B. Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu : inokulum *Rhizobium* sp. (Legin) (lampiran 13.e), *Rhizobacteri indigenous* Merapi isolat MB dan MD (koleksi Ir. Agung Astuti, M.Si.) (lampiran 13.f), mikoriza dari perbanyakan rhizosfer tanaman jagung, benih jagung, benih kedelai varietas Grobogan (lampiran 13.a), varietas Petek (lampiran 13.c), varietas Detam-1 (lampiran 13.b), alkohol, *Acidfuchin*, KOH 10%, HCl 1%, media *platting* LBA (Luria Bertani Agar), media perbanyakan isolat LBC (Luria Bertani Cair), aquades, cat gram A, cat gram B, cat gram C, cat gram D, kapur, kertas payung, kertas filter, kapas, tanah pasir pantai, pupuk kandang, pupuk Urea, SP-36, KCl dan pestisida.

Alat yang digunakan adalah tabung reaksi, tabung ukur, bekerglas, cawan petri, *colonicounter*, *rotary shaker*, *haemacytometer*, 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), timbangan analitik, penggaris, meteran, polibag ukuran 3 kg dan 8 kg, karung

plastik, cetok, gembor plastik, nampan, ayakan pasir, *sprayer* pestisida, dan plastik naungan.

C. Metode Penelitian

Penelitian dilakukan dengan metode percobaan lapangan, menggunakan rancangan perlakuan faktorial (4 x 3) yang disusun dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL).

Faktor pertama adalah macam inokulum yang terdiri dari 4 aras yaitu:

A : *Rhizobium* sp.- mikoriza

B : *Rhizobium* sp.-*Rhizobacteri indigenous* Merapi,

C : *Rhizobium* sp.- mikoriza -*Rhizobacteri indigenous* Merapi dan

D : Tanpa Inokulum (kontrol).

Faktor kedua adalah varietas kedelai yang terdiri dari 3 aras yaitu:

P : varietas Grobogan,

Q : varietas Detam-1, dan

R : varietas Petek.

Dari kedua faktor, diperoleh 12 kombinasi perlakuan yang diujikan yaitu:

AP : *Rhizobium* sp.- mikoriza pada kedelai varietas Grobogan,

AQ : *Rhizobium* sp.- mikoriza pada kedelai varietas Detam-1,

AR : *Rhizobium* sp.- mikoriza pada kedelai varietas Petek,

BP : *Rhizobium* sp.-*Rhizobacteri indigenous* Merapi pada kedelai varietas Grobogan,

BQ : *Rhizobium* sp.-*Rhizobacteri indigenous* Merapi pada kedelai varietas Detam-1,

BR : *Rhizobium* sp.-*Rhizobacteri indigenous* Merapi pada kedelai varietas Petek,

CP : *Rhizobium* sp.- mikoriza -*Rhizobacteri indigenous* Merapi pada kedelai varietas Grobogan,

CQ : *Rhizobium* sp.- mikoriza -*Rhizobacteri indigenous* Merapi pada kedelai varietas Detam-1,

CR : *Rhizobium* sp.- mikoriza -*Rhizobacteri indigenous* Merapi pada kedelai varietas Petek,

DP : Tanpa Inokulum pada kedelai varietas Grobogan,

DQ : Tanpa Inokulum pada kedelai varietas Detam-1 dan

DR : Tanpa Inokulum pada kedelai varietas Petek.

Masing-masing kombinasi perlakuan diulang 3 kali, sehingga diperoleh 36 unit percobaan. Setiap unit percobaan digunakan 7 tanaman, meliputi 3 tanaman sampel, 3 tanaman korban dan 1 tanaman cadangan, dengan demikian terdapat 252 polibag. *Lay out* penelitian terlampir pada lampiran 4.

D. Tahapan Penelitian

Dalam penelitian ini, terdiri dari beberapa tahapan, yakni tahapan pembuatan inokulum, tahap aplikasi dan penanaman, tahap pemeliharaan tanaman dan tahap panen dan pengamatan.

1. Tahap pembuatan inokulum

Sesuai dengan perlakuan, inokulum yang diperlukan adalah inokulum mikoriza, *Rhizobium* sp. dan *Rhizobacteri indigenous* Merapi.

a. Perbanyakan inokulum mikoriza

Perbanyakan inokulum mikoriza dilakukan dengan cara kultur pot jagung dengan media tanah 3 kg (lampiran 13.g) sebanyak 6 polibag dan dipelihara selama 4 minggu. Setelah itu tanah dibongkar untuk diuji persentase infeksi mikoriza dan jumlah sporanya.

1. Pengamatan Persentase Infeksi Mikoriza

Pengamatan dilakukan dengan metode pengecatan *Acid fuchsin* yakni mengamati akar tersier yang dipotong 1 cm sebanyak 3 x 20 potong per tanaman, kemudian direndam dengan larutan KOH 10% selama 24 jam, setelah 24 jam akar dicuci dan direndam larutan HCl 1% selama 1 jam, dicuci dan direndam *acid fuchsin* selama 5 menit. Pengamatan ditujukan pada vesikula, hifa luaran, dan arbuskula dengan mikroskop perbesaran 40-400 kali (lampiran 13.i).

2. Pengamatan Jumlah Spora

Pengamatan dilakukan dengan mengambil tanah per polibag sebanyak 250 g, dilarutkan dalam 1 l aquades (1:4) (lampiran 13.h). Larutan dituang pada saringan, kemudian hasil saringan diamati dengan *haemacytometer* di bawah mikroskop. Berikut rumus penghitungan jumlah spora:

$$S = \frac{1000\ ml}{0{,}0025 mm^2 \times 0{,}01\ mm} \times a \times f$$

Keterangan:

S: jumlah spora (spora/ml)
a: jumlah spora yang teramati pada *haemacytometer*
f: faktor pengenceran

Kemudian tanah dan akar jagung setiap polibag dikering anginkan selama 7 hari dan dapat digunakan sebagai *crude* inokulum mikoriza. Inokulum mikoriza dalam bentuk *crude* (campuran dari akar, tanah dan spora mikoriza) (lampiran 13.j) diberikan bersamaan waktu tanam sebanyak 40 gram apabila jumlah spora didapatkan 50-60 spora atau lebih/ml dan persentase infeksi lebih dari 80%. Apabila didapatkan kurang dari 50-60 spora, maka diinokulasikan 80 gram *crude*/lubang tanam (Lukiwati and Simanungkalit, 2002). Hasil uji pendahuluan terhadap persentase infeksi mikoriza pada akar tanaman jagung sebesar 67% dengan jumlah spora terhitung sebesar $30{,}67 \times 10^6$ pada *crude* inokulum yang digunakan, sehingga digunakan *crude* inokulum mikoriza sebanyak 80 gram/polibag.

b. Perbanyakan isolat *Rhizobacteri indigenous* Merapi:

Isolat *Rhizobacteri indigenous* Merapi perlu dilakukan perbanyakan untuk aplikasi. Skema perbanyakan isolat terlampir pada lampiran 5. Dalam perbanyakan isolat, terdapat beberapa tahapan yakni:

i. Sterilisasi alat dan bahan (lampiran 13.k), setiap sebelum dilakukan tahapan perbanyakan *Rhizobacteri*, seluruh alat yang akan digunakan disterilkan dengan menggunakan autoklaf bertemperatur 121ºC tekanan 1 atm selama 30 menit. Untuk bahan yang digunakan dalam pembuatan inokulum juga perlu disterilisasi dengan autoklaf 121ºC tekanan 1 atm selama 15 menit,

ii. Pembuatan Media LBA (Luria Bertani Agar) dan LBC (Luria Bertani Cair) (lampiran 13.l), dibutuhkan bahan-bahan berupa Aquades 1000 ml

Trypton 10 g, *Yeast extract* 5 g, NaCl 5 g dan Agar 15 g (khusus untuk LBA) untuk media 1000 ml. Seluruh bahan dicampur dengan aquades, kemudian keasaman media dicek dengan menggunakan pH stik (pH 6,5-7,2) dan dipanaskan hingga homogen. Setelah itu, masukkan media LBA pada Erlenmeyer steril, media LBC dimasukkan ke dalam tabung reaksi steril sebanyak 10 ml kemudian sterilisasi selama 15 menit. Untuk membuat LB miring, masukkan LBA pada tabung reaksi sebanyak 10 ml setiap tabung reaksi dan diletakkan dengan kemiringan 30-45º. Untuk *platting*, media disimpan di Erlenmeyer dan apabila akan digunakan, media padat dipanaskan hingga cair lalu dimasukkan petridish sesuai kebutuhan.

i. Peremajaan isolat, dibutuhkan 2 stok isolat MB dan MD serta 4 LBA miring. Peremajaan isolat dilakukan dengan menginokulasi isolat stok MB dan MD *Rhizobacteri indigenous* Merapi pada LBA miring. Masing-masing diulang 2 kali, artinya setiap isolat diinokulasi pada dua LBA miring. Setelah inokulasi, inkubasi selama 48 jam.

ii. *Screening* pada media stres 2,75 M NaCl (lampiran 13.r), dilakukan setelah peremajaan. *Screening* ini dilakukan dengan metode *streak platting.* Setelah tumbuh, koloni tunggal di*platting* kembali pada media standar, dan dilakukan identifikasi. Pada tahap ini didapatkan isolate MB dan MD tahan cekaman NaCl 2,75 M.

iii. Identifikasi koloni isolat *Rhizobacteri indigenous* Merapi, dilakukan dengan menginokulasi isolat MB dan MD hasil *screening* diinokulasi

pada LBA dalam petridish dengan metode permukaan (*surface platting method*) dan goresan (*streak platting method*) dari pengenceran 10^{-6} serta arbobisitas pada media LBC (lampiran 13.m). Dalam inokulasi ini dilakukan dua kali ulangan setiap isolat. Kemudian inkubasi selama 48 jam hingga didapatkan koloni tunggal. Dari koloni tunggal tersebut, diamati karakteristiknya dengan menggunakan mikroskop. Pengamatan yang dilakukan terhadap warna, diameter, bentuk koloni, bentuk tepi, elevasi, struktur dalam koloni (lampiran 13.n dan 13.o), bentuk sel dan sifat gram *Rhizobacteri indigenous*. Bentuk sel dan sifat gram diamati dengan pengecatan gram.

iv. Identifikasi sel isolat *Rhizobacteri indigenous* Merapi (pengecatan gram) dilakukan dengan mengambil dari masing-masing isolat tunggal sebanyak 1 ose dan diinokulasi pada media LBC serta diinkubasi selama 48 jam. Setelah 48 jam, ambil kultur sebanyak 1 ose dan dimasukkan ke dalam aquades steril 9 ml pada tabung reaksi dan kemudian dilakukan cat gram. Cat gram diawali dengan membuat tanda pada kaca preparat untuk isolat MB dan isolat MD serta memberi lingkaran pada belakang kaca, kemudian kaca preparat disemprot alkohol dan dikeringkan di atas Bunsen. Setelah itu, tepat di tengah lingkaran yang dibuat, teteskan aquades yang telah diberi isolat. Kemudian dikeringanginkan, diberi larutan cat gram A selama 1 menit, dicuci dan dikeringkan. Kemudian tetesi dengan larutan cat gram B selama 2 menit, dicuci dan dikeringkan. Ditetesi larutan cat gram C selama 30 detik, dicuci dan dikeringkan. Yang

terakhir ditetesi cat gram D selama 2 menit, dicuci, dikeringkan dan diamati di bawah mikroskop. DIdapatkan bahwa MB berbentuk bacil negatif (lampiran 13.p) dan MD berbentuk *coccus* negatif (lampiran 13.q). Hasil identifikasi terdapat pada tabel 4.

v. Pembuatan biakan murni isolat *Rhizobacteri indigenous* Merapi untuk kultur stok (lampiran 13.s), dilakukan dengan cara mengambil satu ose isolat hasil identifikasi. Masing-masing isolat MB dan MD diinokulasikan pada dua LBA miring kemudian diinkubasi selama 48 jam. Hasil inkubasi masing-masing isolat di*platting* pada dua media LBA secara *surface platting method* dari pengenceran 10^{-6} dan diinkubasi 48 jam. Apabila sudah seragam hasilnya, maka dianggap murni. Kemudian dibuat kultur murninya pada LBA miring sebanyak 2 ulangan dari koloni tunggal. Selanjutnya inokulasikan kultur murni pada LBC (10 ml tiap tabung reaksi) dan diinkubasi selama 48 jam.

vi. Perbanyakan dan pembuatan *starter* campuran isolat, dilakukan dengan mengambil 10 ml biakan murni dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer steril berukuran 250 ml yang berisi 100 ml LBC (lampiran 13.t) kemudian diinkubasi pada *rotary shaker* selama 48 jam untuk pengaktifan fase *mid log* bakteri. Selanjutnya kedua starter dicampur (lampiran 13.u) dan diperlukan uji viabilitas *starter* campuran. Uji viabilitas ini dilakukan dengan metode *Total Plate Count* (TPC) (lampiran 13.v).

vii. Uji viabilitas, dilakukan dengan mengencerkan 1 ml sampel pada botol suntik (10^{-2}; 10^{-4}; 10^{-6}) dan 2 tabung reaksi (10^{-7};10^{-8}), sehingga didapat seri pengenceran hingga 10^{-8}. Setiap 0,1 ml pada seri 10^{-6};10^{-7};10^{-8} diinokulasikan dengan metode permukaan atau *surface platting method* dan setiap seri pengenceran yang diujikan (10^{-7};10^{-8};10^{-9}) dengan seri pengenceran 10^{-7}; 10^{-8}; 10^{-9} sebanyak 3 kali ulangan. Uji kemampuan hidup mikroba berdasarkan daya viabilitas dan jumlah koloni populasi bakteri. Penghitungan populasi bakteri ini dengan metode *Total Plate Count* (TPC). Jumlah bakteri per mL dapat ditentukan dengan menghitung koloni yang tumbuh dari masing-masing pengenceran. Penentuan jumlah bakteri per mililiter dengan menggunakan rumus :

$$\text{Jumlah bakteri per ml sampel (CFU/ml)} = \frac{\text{Jumlah koloni}}{\text{Faktor pengenceran}}$$

Penentuan jumlah jumlah bakteri per mililiter dengan menggunakan cara TPC harus memenuhi syarat sebagai berikut:

i. Jumlah koloni tiap cawan petri antara 30 – 300 koloni

ii. Tidak ada koloni yang menutup lebih besar dari setengah luas cawan petri *(Spreader)*

iii. Perbandingan jumlah koloni dari pengenceran yang berturut-turut antara pengenceran yang lebih besar dengan pengenceran sebelumnya. Jika sama atau lebih kecil dari 2 maka hasilnya dirata-rata, dan jika lebih besar dari 2 maka yang dipakai adalah jumlah koloni dari hasil pengenceran sebelumnya

iv. Jika dengan ulangan setelah memenuhi syarat hasilnya dirata-rata (Agung_Astuti dkk, 2014).

Dari hasil uji viabilitas *Rhizobacteri indigenous* Merapi, didapatkan populasi *Rhizobacteri* sebesar 8,45 x 10^8 CFU/ml, sehingga bisa dilanjutkan untuk aplikasi.

c. Inokulum *Rhizobium* sp.

Inokulum *Rhizobium* sp. yang digunakan adalah inokulum komersial dagang Legin. Legin merupakan pupuk bio-hayati yang bermanfaat dalam meningkatkan penyediaan Nitrogen bagi tanaman melalui pengikatan N udara oleh *Rhizobium* sp., memperbaiki kesuburan dan keseimbangan hara dalam tanah. Dosis pemberian Legin untuk benih kedelai adalah 3 gram/1 kg benih (Ramadhani, 2015).

2. Tahap aplikasi inokulum dan uji efektifitasnya terhadap pertumbuhan kedelai

a. Pembuatan Naungan

Pemberian naungan di lahan perlu dilakukan mengingat tanaman kedelai tidak suka terhadap banyak air sementara penelitian dilakukan ketika musim penghujan serta pemberian air harus sama. Naungan dibuat dengan bambu dan dilapisi plastik PE pada bagian atapnya.

b. Penyiapan media tanam dan pemupukan dasar

Penyiapan media tanam (lampiran 13.w dan 13.x) dilakukan 2 minggu sebelum penanaman dengan mengering anginkan tanah terlebih dahulu kemudian dibersihkan dan mengisi polibag dengan tanah pasir pantai 7,5 kg

dan pupuk kandang sebanyak 70,75 gram (perhitungan terlampir pada lampiran 6). Kemudian seluruh polibag diberi air hingga kapasitas lapang. Penghitungan kebutuhan air kapasitas lapang terlampir pada lampiran 7.

c. Uji perkecambahan

Pengujian dilakukan dengan cara mengambil 100 benih setiap varietas secara acak kemudian benih disemai pada *petridish* yang sudah diberikan kapas atau kertas saring yang telah dibasahi (lampiran 13.d). Pengujian dilakukan 3 kali ulangan dan diamati selama 7 hari. Rumus daya kecambah (DK):

$$DK = \frac{\text{jumlah biji berkecambah}}{\text{jumlah biji yang dikecambahkan}} \times 100\%$$

Dari hasil uji perkecambahan didapatkan daya berkecambah varietas Grobogan sebesar 98%, varietas Detam-1 sebesar 81,6% dan varietas Petek sebesar 93,3%.

d. Aplikasi inokulum pada berbagai varietas sesuai perlakuan

Kebutuhan benih varietas Grobogan 30,24 gram, varietas Detam-1 24,93 gram dan varietas Petek 13,94 gram (penghitungan kebutuhan benih terlampir pada lampiran 8).

i. Aplikasi *Rhizobacteri indigenous* Merapi (lampiran 13.y), dilakukan dengan merendam benih pada starter campuran sebelum tanam selama 10 menit, dilanjutkan dengan aplikasi inokulum *Rhizobium.*

ii. Aplikasi inokulum *Rhizobium* sp. (lampiran 13.z), dengan cara mencampur dengan Legin dengan dosis 3 gram/kg benih hingga merata setelah direndam dengan *Rhizobacteri*. Untuk benih varietas Grobogan

22,68 gram diberi Legin 0,07 gram, varietas Detam-1 18,69 gram diberi Legin 0,03 gram dan varietas Petek 10,44 gram diberi Legin 0,06 gram (penghitungan terlampir pada lampiran 10). Kemudian dikering anginkan, lalu benih ditanam pada lubang tanam (masing-masing 2 benih) yang sebelumnya telah diinokulasi mikoriza.

iii. Aplikasi *crude* inokulum mikoriza (lampiran 13.aa) dengan cara memasukkan *crude* mikoriza sebanyak 80 gram/polibag ke dalam lubang tanam sebelum dilakukan penanaman. Kebutuhan *crude* mikoriza adalah 10.080 gram (penghitungan terlampir pada lampiran 9).

e. Penanaman

Penanaman dilakukan dengan cara tanam 2 benih dalam 1 lubang untuk mengurangi resiko jika ada tanaman yang tidak tumbuh. Cara aplikasi dan penanaman yaitu pertama inokulasi *Rhizobacteri* kemudian inokulum *Rhizobium* sp. pada benih, kemudian inokulasi mikoriza pada lubang tanam. Penanaman dilakukan dengan cara membuat lubang tanam yang ada di polibag (*lay out* penanaman terlampir pada lampiran 4). Pada saat penanaman juga dilakukan pemupukan yang pertama (penghitungan terlampir pada lampiran 6).

3. Tahap pemeliharaan tanaman

Pemeliharaan tanaman yang dilakukan yakni penyiraman, penyiangan, pemupukan dan pengendalian hama dan penyakit.

a. Penyiraman

Penyiraman kapastitas lapang dilakukan setelah pemupukan dasar dengan pupuk kandang 7 hari sebelum tanam dan sehari sebelum tanam. Penghitungan kebutuhan air pada kondisi kapasitas lapang terlampir pada lampiran 7. Setelah penanaman, penyiraman dilakukan sesuai kebutuhan (kelembaban tanah rendah) dan volume penyiraman diusahakan sama.

b. Pemupukan susulan

Pemupukan (lampiran 13.ab) dilakukan 2 kali yakni pada saat penanaman (Urea 0,12 g; SP-36 0,18 g; dan KCl 0,23 g) dan 2 minggu setelah tanam yakni Urea 0,12 (penghitungan dosis pemupukan terlampir pada lampiran 6) dengan cara *ring placement*.

c. Penyiangan

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

d. Pengendalian hama dan penyakit

Pengendalian hama belalang, ulat daun dengan menggunakan pestisida sistemik dan penyakit yang disebabkan oleh cendawan, pengendalian dengan fungisida kontak dan sistemik (lampiran 13.ac).

4. Tahap kelima: panen dan pengamatan

Kedelai dipanen setelah sebagian besar daun sudah menguning, buah mulai berubah warna dari hijau menjadi kuning kecoklatan, atau polong sudah kelihatan tua, batang berwarna kuning agak coklat. Kedelai dipanen secara bertahap sesuai

dengan masak morfologis tanaman. Setelah dipanen, kemudian kedelai dikering mataharikan hingga kering.

E. Variabel Pengamatan

Dalam penelitian ini variabel pengamatan yang diamati meliputi pertumbuhan bakteri, pertumbuhan vegetatif dan generatif. Pengamatan parameter pertumbuhan dan hasil tanaman dilakukan mulai dari minggu pertama hingga minggu ke 6 setelah tanam.

1. Viabilitas total *Rhizobacteri indigenous* Merapi pada starter

Pengamatan dilakukan pada starter campuran isolat MB dan MD sebelum tanam dengan cara mengambil 1 ml starter campuran, kemudian dimasukkan pada botol suntik (10^{-2}; 10^{-4}; 10^{-6}) dan 2 tabung reaksi (10^{-7};10^{-8}), sehingga didapat seri pengenceran hingga 10^{-8}. Setiap 0,1 ml pada seri 10^{-6};10^{-7};10^{-8} diinokulasikan dengan metode permukaan atau *surface platting method* dan setiap seri pengenceran yang diujikan (10^{-7};10^{-8};10^{-9}) dengan seri pengenceran 10^{-7}; 10^{-8}; 10^{-9} sebanyak 3 kali ulangan. Dinamika *Rhizobacteri indigenous* Merapi didasarkan pada populasi koloni bakteri dengan menggunakan metode TPC *(Total Plate Count),* dengan syarat:

i. Jumlah koloni tiap cawan petri antara 30 – 300 koloni

ii. Tidak ada koloni yang menutup lebih besar dari setengah luas cawan petri *(Spreader)*

iii. Perbandingan jumlah koloni dari pengenceran yang berturut-turut antara pengenceran yang lebih besar dengan pengenceran sebelumnya. Jika sama

atau lebih kecil dari 2 maka hasilnya dirata-rata, dan jika lebih besar dari 2 maka yang dipakai adalah jumlah koloni dari hasil pengenceran sebelumnya

iv. Jika dengan ulangan setelah memenuhi syarat hasilnya dirata-rata (Agung_Astuti dkk., 2014).

2. Pengamatan Pertumbuhan Tanaman

a. Tinggi tanaman (cm)

Tinggi tanaman sampel diukur dari permukaan tanah sampai dengan titik tumbuh tanaman. Alat yang digunakan adalah penggaris atau meteran dengan satuan cm. Pengamatan dilakukan setiap minggu hingga masa vegetatif maksimal dimulai satu minggu setelah tanam.

b. Jumlah daun

Jumlah daun dihitung untuk menentukan tingkat kemampuan tanaman untuk berfotosintesis. Pengamatan dilakukan setiap satu minggu sekali hingga masa vegetatif maksimal dimulai satu minggu setelah tanam.

3. Pengamatan tanaman korban Minggu ke-3, ke-6 dan ke-9

a. Dinamika populasi total bakteri selama masa tanam (cfu/ml)

Pengamatan dilakukan pada minggu ke-3, 6 dan 9 setelah tanam dengan cara membuat suspensi rhizosfer tanaman dengan aquades, diencerkan pada botol suntik (10^{-2}; 10^{-4}; 10^{-6}) dan 2 tabung reaksi (10^{-7};10^{-8}). Setiap 0,1 ml pada seri 10^{-6};10^{-7};10^{-8} diinokulasikan dengan metode permukaan atau *surface platting method* dan setiap seri pengenceran yang diujikan (10^{-7};10^{-8};10^{-9}) dengan seri pengenceran 10^{-7}; 10^{-8}; 10^{-9} sebanyak 3 kali ulangan. Dinamika *Rhizobacteri indigenous* Merapi didasarkan pada populasi koloni

bakteri dengan menggunakan metode TPC *(Total Plate Count),* dengan syarat:

i. Jumlah koloni tiap cawan petri antara 30 – 300 koloni

ii. Tidak ada koloni yang menutup lebih besar dari setengah luas cawan petri *(Spreader)*

iii. Perbandingan jumlah koloni dari pengenceran yang berturut-turut antara pengenceran yang lebih besar dengan pengenceran sebelumnya. Jika sama atau lebih kecil dari 2 maka hasilnya dirata-rata, dan jika lebih besar dari 2 maka yang dipakai adalah jumlah koloni dari hasil pengenceran sebelumnya

iv. Jika dengan ulangan setelah memenuhi syarat hasilnya dirata-rata (Agung_Astuti dkk., 2014).

b. Pengaruh inokulasi *Rhizobium* sp.

1. Jumlah nodul akar total

Jumlah nodul akar dihitung secara manual setelah tanaman dicabut, akar dibersihkan lalu dihitung jumlah nodul seluruhnya, baik efektif maupun tidak efektif.

2. Bobot nodul (g)

Setelah nodul dihitung, maka nodul ditimbang dengan timbangan analitik. Hasil timbangan dinyatakan dengan satuan gram.

3. Diameter nodul akar (mm)

Pengamatan ini dilakukan dengan cara mengukur diameter nodul akar dengan menggunakan jangka sorong dan dinyatakan dalam satuan mm. Caranya 20

nodul diambil secara acak, lalu diukur dengan menggunakan jangka sorong. Pengamatan dilakukan 3 kali ulangan.

4. Persentase keefektifan nodul (%)

Persentase nodul efektif dihitung dengan rumus

$\frac{\text{Jumlah nodul efektif}}{Jumlah\ nodul\ yang\ diamati} \times 100\%$ dan dinyatakan dalam satuan persen. Caranya 20 nodul diambil secara acak, lalu dipotong dengan cutter, dan mengamati warna nodul. Bila berwarna merah berarti efektif, dan bila berwarna hitam tidak efektif. Pengamatan dilakukan 3 kali ulangan.

c. Pengaruh inokulasi mikoriza

1. Persentase infeksi mikoriza (%)

Pengamatan infeksi mikoriza dilakukan dengan metode pengecatan *Acid fuchsin* yakni:

i. Mengambil sampel akar sesuai perlakuan, kemudian dibersihkan dari kotoran kemudian akar halus dipotong 0,5-1 cm sebanyak 3 x 20 potong per tanaman
ii. Akar yang telah terpotong, dimasukkan ke dalam botol kecil dan direndam dengan KOH 10% sebanyak 2 ml selama 24 jam. Setelah itu dibilas dengan air hingga bersih
iii. Kemudian akar direndam HCl 1% sebanyak 2 ml selama 1 jam. Selanjutnya dibilas dengan air hingga bersih
iv. Selanjutnya akar direndam *acid fuchsin* selama 5 menit
v. Setelah itu 20 potong akar diambil dan diatur di atas gelas benda dan pengamatan ditujukan pada vesikula, hifa luaran, dan arbuskula dengan mikroskop perbesaran 40-400 kali.

vi. Penghitungan persentase infeksi dilakukan dengan rumus $\frac{\text{Jumlah akar terinfeksi}}{Jumlah\ akar\ total} \times 100\%$ dan dinyatakan dalam satuan persen.

2. Jumlah spora (spora/ml)

Penghitungan spora dilakukan pada minggu ke 9 dengan metode penyaringan basah dan dekantasi, dengan cara:

i. Tanah per perlakuan inokulum mikoriza diambil 250 gram dan dilarutkan dalam 1 liter aquades (1:4) dan biarkan hingga partikel kasar mengendap

ii. Cairan (dekantasi) dituang melalui saringan kasar 90 MM/170 *mesh* hingga 38 MM/400 *mesh*

iii. Bahan yang tertahan pada saringan dipindahkan ke dalam botol dan kemudian diteteskan cairan pada *haemacytometer*

iv. Mengamati jumlah spora yang ada pada kotak sampel *haemacytometer* di bawah mikroskop dengan perbesaran 400 kali. Berikut rumus penghitungan jumlah spora:

$$S = \frac{1000\ \text{ml}}{0{,}0025\text{mm}^2 \times 0{,}01\ \text{mm}} \times a \times f$$

Keterangan:

S: jumlah spora (spora/ml)
a: jumlah spora yang teramati pada *haemacytometer*
f: faktor pengenceran

d. Proliferasi akar

Pengamatan ini bertujuan untuk mengamati percabangan perakaran tanaman kedelai. Pengamatan dilakukan pada tanaman korban pada minggu ke-3, 6 dan 9 setelah tanam. Proliferasi akar dinyatakan secara kualitatif

dengan harkat (++++) untuk perakaran yang memiliki percabangan rumit serta banyak akar horizontal dan vertikal, (+++) untuk perakaran yang memiliki percabangan akar banyak, (++) untuk perakaran yang memiliki percabangan sedang dan (+) untuk perakaran yang memiliki percabangan akar sedikit serta (-) untuk perakaran yang tidak memiliki percabangan.

e. Panjang akar (cm)

Pengukuran panjang akar tanaman menggunakan penggaris dari pangkal batang hingga ujung akar terpanjang. Pengamatan panjang akar dilakukan pada minggu ke-3, 6 dan 9 setelah tanam pada tanaman korban dan hasilnya dinyatakan dalam satuan cm.

f. Bobot segar dan kering akar (gram)

Pengamatan bobot segar akar dilakukan dengan cara mencabut tanaman korban minggu ke-3, 6 dan 9, kemudian potong bagian pangkal batang dan menimbang bagian akar yang telah dibersihkan. Selanjutnya akar dikering anginkan selama 24 jam kemudian dioven dengan temperatur 60°C hingga bobotnya konstan. Pengamatan bobot kering akar dilakukan dengan menimbang akar yang telah kering oven dengan menggunakan timbangan analitik dan dinyatakan dalam satuan gram.

g. Bobot segar dan kering tajuk (gram)

Pengamatan bobot segar tajuk dilakukan dengan cara mencabut tanaman korban minggu ke-3, 6 dan 9, kemudian potong bagian pangkal batang dan menimbang bagian tajuk. Selanjutnya tajuk dikering anginkan selama 24 jam kemudian dibungkus dengan kertas buram untuk masing-masing

perlakuan kemudian dioven dengan temperatur 60°C hingga bobotnya konstan. Pengamatan bobot kering tajuk dilakukan dengan menimbang tajuk yang telah kering oven dengan menggunakan timbangan analitik dan dinyatakan dalam satuan gram.

h. Luas daun (cm^2)

Luas daun diukur dengan menggunakan LAM *(Leaf Area Meter).* Daun yang akan diukur, dipotong terlebih dahulu, lalu diukur menggunakan LAM dan dinyatakan dalam satuan cm^2. Pengamatan dilakukan pada minggu ke-3, 6 dan 9 setelah tanam pada tanaman korban.

4. Pengamatan Tanaman Sampel Menjelang Panen dan Setelah Panen

a. Umur berbunga (HST)

Dalam menentukan umur berbunga dilakukan saat kedelai mulai mengalami pembungaan per tanaman dan dinyatakan dalam satuan HST (hari setelah tanam).

b. Jumlah polong

Polong dihitung jumlahnya per tanaman per perlakuan. Pengamatan dilakukan setelah panen.

c. Bobot kering polong (g)

Polong dijemur hingga kadar air tertentu. Pengamatan bobot kering polong dilakukan dengan menimbang polong yang telah dijemur. Pengamatan dilakukan ketika setelah panen.

d. Bobot biji per tanaman (g)

Bobot biji diamati dengan memisahkan biji dengan polong kering terlebih dahulu, kemudian menimbang biji tanaman sampel tiap unit dan dinyatakan dalam satuan gram dan dilakukan pengukuran kadar airnya. Bobot biji dikonversi pada kadar air 10% dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

Bobot biji = $\frac{(100-Ka)}{100-10\%} xC\ g$

Keterangan:
C : bobot biji per tanaman (g)
Ka : kadar air biji terukur

e. Bobot 100 biji (gram)

Pengamatan bobot 100 biji dilakukan dengan menimbang bobot biji kedelai sebanyak 100 biji kering matahari dari setiap sampel tanaman yang telah diketahui kadar airnya. Kemudian bobot dikonversikan pada kadar air 10% dengan rumus: a = $\frac{(100-Ka)}{100-10\%} xb$

Keterangan:
a : bobot 100 biiji pada kadar air 10%
b : bobot 100 biji pada kadar air terukur
Ka : kadar air terukur

f. Hasil (ton/h)

Pengamatan ini dilakukan dengan mengkonversikan hasil bobot biji per tanaman pada kadar air 10% pada ton/h dengan rumus :

H = $\frac{A}{B} xC\ kg$

Keterangan:
H : hasil kedelai/ha pada kadar air 10% (ton/h)
A : luas lahan dalam satuan ha (10.000 m^2)
B : jarak tanam (m^2)
C : bobot biji per tanaman pada kadar air 10% (kg)

F. Analisis Data

Data hasil pengamatan secara periodik disajikan dalam bentuk grafik dan histogram, sedangkan hasil akhir dianalisis dengan menggunakan sidik ragam (*Analisis of Variance*) pada tingkat α 5%. Untuk perlakuan yang berbeda nyata diuji lebih lanjut dengan uji jarak berganda Duncan (DMRT).