

### **III. METODELOGI PENELITIAN**

#### **A. Tempat dan Waktu Penelitian.**

Penelitian Observasi dilaksanakan di tanah Mediteran, Desa Simo, Kecamatan Simo, Kabupaten Boyolali dan penelitian eksplorasi eksperimen dilaksanakan di Laboratorium Agrobioteknologi dan Laboratorium Tanah Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Penelitian dilaksanakan pada bulan September – Desember 2015.

#### **B. Bahan dan Alat.**

Bahan yang digunakan berupa tanah dan tanaman kedelai yang dipanen dari lahan Mediteran, Simo, Boyolali dengan kondisi cekaman kekeringan, medium YMA, medium LB+NaCl. Sublimat, alkohol, cat Eritrosin, cat alkohol asam, NaOH, HCl, cat acid Fuhsin, air steril.

Alat yang digunakan adalah timbangan, meteran, tabung reaksi, petridis, erlenmeyer, autoklaf, pisau tajam, pipet steril, mikroskop, *haemocytometer*, saringan spora mikoriza, cat gam, oven, otoklaf, lampu busen, *shaker*, penggaris, dan jarum ose.

#### **C. Metode Penelitian.**

##### **1. Jenis Penelitian**

Penelitian dilakukan menggunakan **Metode Observasi dan Eksplorasi Eksperimen**. Metode Observasi dilakukan pada budidaya kedelai tahan kering di tanah Mediteran, daerah Simo, Boyolali dan metode eksplorasi eksperimental untuk mengkaji karakteristik tanah dan asosiasi *Rhizobium* sp, *Rhizobakteri* dan

Mikoriza dengan tanaman kedelai lahan kering. Observasi dilakukan untuk mendapatkan informasi tentang kondisi eksisting wilayah yang menggambarkan keadaan awal kawasan tersebut. Pemilihan lokasi observasi dengan cara *purposive* yaitu pengambilan sampel yang secara sengaja dipilih berdasarkan tujuan penelitian (Masri Singarimbun, 1989 *dalam* Rosdiana R. 2015).

- a. Diobservasi kondisi lahan, meliputi: batas lahan, vegetasi sekeliling, irigasi, kondisi tanah dan tanaman.
- b. Penentuan Tanaman Korban

Sampel tanaman diambil dari beberapa titik di lokasi pengambilan sampel. Hal ini agar sampel mewakili tanaman yang akan diamati. Kemudian akan diidentifikasi dari pertumbuhan dan hasil tanaman setiap tanaman kedelai.

## **2. Metode Penetapan Lokasi**

Penelitian dilakukan di lahan Mediteran daerah Simo, Boyolali yang terdapat tanaman kedelai tahan terhadap cekaman kekeringan selama 8 minggu tanpa adanya penyiraman ataupun pengairan (berdasarkan informasi dari Ir. Mulyono MP.)

## **3. Metode Penetapan Sampel**

Dalam 1 petak lahan ditentukan 3 blok, dengan luasan 20 x 25 meter. Pada setiap bloknya diambil 10 tanaman sampel dengan metode undian. Setiap tanaman sampel diamati pertumbuhan dan hasilnya serta dilakukan: a) Isolasi *Rhizobakteri* yang tahan cekaman kekeringan, b) Karakteristik nodulasi dan efektivitas *Rhizobium* sp. c) Karakteristik Mikoriza dan efektivitasnya.

## **D. Cara Penelitian.**

### **1. Penelitian obsrvasi**

Teknis Penelitian dilakukan dengan mengobservasi kondisi tanah dan kondisi tanaman pada lahan Mediteran, di Simo, Boyolali. Serta menggunakan data-data yang diperlukan. Data dalam penelitian ini berupa data primer dan data sekunder, yang mana data primer merupakan data yang diperoleh dari hasil observasi secara langsung dan hasil wawancara langsung di lapangan. Data sekunder merupakan data yang diperoleh dari hasil studi pustaka dan penelusuran ke berbagai instansi terkait dengan penelitian (Adhi Sudiby, 2011). Nurliasari (2006) menyatakan data-data yang mendukung dalam penelitian ini meliputi:

#### **a. Data Primer**

Data primer adalah data yang diperoleh secara langsung baik melalui penyelidikan di lapangan maupun di laboratorium.

#### **b. Data Sekunder**

Data sekunder adalah data yang diperoleh melalui studi literatur sebagai pendukung dan pelengkap dari data-data primer. Berupa kondisi lapangan saat pengambilan sampel, ketentuan-ketentuan dari standard pengukuran, hasil percobaan-percobaan sebelumnya dan buku-buku literatur lainnya.

#### **a. Lokasi Pengamatan**

- i.** Menentukan lahan batasan, ukuran lahan, serta letak lahan yaitu dengan cara mengukur, mendeskripsikan dan menggambarkan kondisi lahan.
- ii.** Menentukan vegetasi yang terdapat di sekeliling lahan tersebut

- iii. Mengetahui kondisi lahan untuk mendapatkan pengairan baik berupa irigasi dan sebagainya dengan wawancara dengan petani setempat

## **2. Penelitian Eksperimen**

### **a. Penentuan dan Pengamatan Tanah**

Pada setiap blok diambil dari 3 dengan 3 lapisan yaitu lapisan dengan kedalaman 0-10 cm<sup>2</sup>, 10-20 cm<sup>2</sup>, dan 10-30 cm<sup>2</sup>, sehingga total tanah 27 sampel tanah. Masing-masing sampel akan diamati dari Kadar Lengas, kandungan Bahan Organik, pH, N, dan N/C rasio.

### **b. Penentuan blok tanaman Sampel**

- i. Lahan sudah berbentuk blocking, yaitu terdapat 3 blok yang mana 2 terletak di tepi dan 1 terletak di tengah.
- ii. Penentuan persentase luasan blok yang diteliti yaitu dengan mengukur luasannya total keseluruhan luasan blok dikompersikan dan dipresentasikan dari total keseluruhan luasan lahan. ( Lampiran I)

### **c. Penentuan tanaman sampel**

- i. Menghitung keseluruhan populasi pada setiap blok.
- ii. Sampel menggunakan 30 tanaman, diambil dari kedelai yang hidup ditanah Mediteran. 30 sampel terdiri dari 10 tanaman pada blok A, 10 tanaman pada blok B, dan dan 10 tanamn pada blok C. Penentuan lokasi 1-10 tanaman sampel ditentukan dengan metode undian (Lampiran II).

**d. Pengamatan Tanaman sampel**

Untuk mengetahui bagaimana pertumbuhan kedelai dan hasil dari tanaman tersebut. Pengamatan meliputi: Tinggi tanaman (cm), Berat segar tanaman (g), Berat kering tanaman (g), Panjang akar (cm), Berat segar akar (g), Berat kering akar (g), Proliferasi akar, Jumlah polong, Berat polong (g), dan Hasil kedelai (g/tanaman), Jumlah biji, Berat Biji (g), dan Berat Biji 100 (g).

**e. Sterilisasi Alat**

Sterilisasi alat bertujuan untuk membunuh mikroba yang tidak diinginkan pada alat sehingga terjaga dari kontaminasi pada saat proses. Tahap pertama yaitu merebus semua alat yang akan digunakan sampai mendidih, lalu ditiriskan, setelah penerisan alat di cuci lalu ditiriskn dan kemudian penyeterilan dengan menggunakan autoclaf dengan suhu  $121^{\circ}\text{C}$ , dan dengan tekanan 1 atm selama 20 menit.

**f. Pembuatan Medium**

Medium adalah bahan yang terdiri dari zat makanan yang digunakan untuk menumbuhkan mikrobia. Media digunakan untuk isolasi, perbanyakan sel, dan pengujian sifat fisiologi. Untuk pembuatan media LBA dan YMA langkah yang dilakukan sama hanya bahan yang berbeda. Langkah pertama siapkan bahan, timbang, panaskan dalam pemanas air, tambahkan agar larutan dijadikan 100 ml, atur pH 6,5-6.8, masukan dalam tabung reaksi atau erlemeyer, sterilkan dengan autoklaf dengan suhu  $121^{\circ}\text{C}$  dengan tekanan 1 atm selama 15 menit.

**g. Isolasi *Rhizobakteri***

Akar tanaman kedelai disemprot-semprot dengan perlahan dengan aquades yang airnya ditampug di petridis 1 ml yang akan diisolasi di media LBA pada uji pendahuluan dengan cekaman NaCl dengan konsentrasi 0,17 N, 1 N, 1,5 N, 2 N kemudian diterapkan pada sampel dengan kondisi kemampuan pada cekaman tertinggi.

Untuk mengisolasi *Rhizobakteri* yaitu dengan cara mencairkan medium LBA (*Luria Bertani Agar*) dan dimasukkan ke dalam petridis dan didiamkan sampai padat, lalu membuat suspensi bakteri dan ambil dari air semprotan perakaran yang diambil 1 ml dengan pengenceran  $10^2$ ,  $10^4$ , dan  $10^6$  dan kemudian diambil 0,1 ml lalu diinokulasikan ke permukaan media padat cawan petri dengan metode *surface* dan *streak*, selanjutnya diinkubasikan secara terbalik pada suhu kamar, setelah tumbuh koloni yang terpisah dengan zona jernih di sekitarnya menunjukkan bakteri dapat diisolasi. Isolasi dapat dilakukan dengan mengambilnya dengan cara aseptik dengan ose satu koloni yang dikehendaki dan suspensi dalam air steril. Memeriksa morfologi sel dengan mikroskop, dilanjutkan dengan pengecatan gram dan menggambar.

**h. Isolasi dan karakterisasi *Rhizobium* sp.**

Karakteristik nodulasi diamati baik dari sebaran nodulasi, jumlah, berat, dan diameter nodul. Dalam efektivitas sebaran nodulasi dilakukan dengan mengamati letak dan sebaran nodul pada akar tanaman. Jumlah nodul didapatkan dari menghitung jumlah nodul pada setiap tanaman, lalu menimbanginya. Untuk

diameter nodul diukur dengan menggunakan jangka sorong, 20 nodul setiap tanaman, kemudian nodul dibelah untuk uji efektivitas nodul dilanjutkan dengan menumbuk nodul setiap tanaman. Nodul yang digunakan merupakan nodul masih segar dibersihkan dengan sublimat atau alkohol 70% dalam cawan selama 2-6 menit, lalu dicuci 3-5 kali dan ditumbuk hingga keluar cairan berwarna merah, kemudian diambil 1 ose nodul akar dan dibuat goresan pada media YMA di petridish. Pada bekas goresan akan tertinggal sedikit suspensi *Rhizobium* sp. lalu digoreskan lagi ke medium dengan ose yang telah dibakar. Kemudian cawan petri yang telah diberi Eriket di letakan dalam posisi terbalik, diinkubasikan pada suhu temperatur kamar. Koloni yang terpisah dan berwarna merah jambu dan kemudian diidentifikasi dari bentuk koloni, struktur dalam, bentuk tepi dan elevasi kemudian ambil dengan ose 1 koloni dan suspensikan dengan air steril kemudian untuk diperiksa morfologinya di bawah mikroskop dengan pengecatan gram. Kemudian digambar bentuk selnya.

#### **i. Karakteristik Mikoriza**

##### **i. Pengamatan**

Mengamati jumlah arbuskul, vesikel, hifa dan efektivitasnya serta jumlah sporanya. Karakterisasi Mikoriza diambil dari akar tanaman sebanyak 20 buah minimalnya 10 buah, selanjutnya dimasukkan ke dalam petridis yang diisi dengan air aquades. Selanjutnya akar diambil lalu dimasukkan ke dalam tabung dan direndam dengan KOH 10 % selama 24 jam, setelah itu cairan KOH dibuang dan akar dibilas dengan aquades sebanyak 3 kali, lalu akar direndam

dengan HCl 1 % selama 1 jam yang dilanjutkan dengan pemberian cat Acid Fuhsin. Lalu diamati jumlah vesikel, arbuskul, presentase infeksi MVA.

ii. jumlah spora dan karakterisasi spora

Cara mengamati jumlah spora yaitu tanah dari tanaman diambil sebanyak 250 gram, kemudian direndam dengan air 1 L, lalu saring dengan penyaring Mikoriza. Pengambilan koloid pada cairan menggunakan 0,1 ml diletakan diatas preparat kemudian diamati di bawah mikroskop jumlah dan karakteristik spora Mikoriza.

### **E. Parameter Yang Diamati.**

#### **1. Penelitian Survei :**

##### **a. Lokasi Penelitian**

Survei lokasi meliputi :

- i. letak lahan batas lahan dan ukuran luasannya
- ii. vegetasi apa saja yang berada di lokasi dan sekelilingnya
- iii. Bagaimana lahan mendapatkan air salah satunya mungkin bagaimana dengan pengirannya seperti irigasi dll.
- iv. kondisi tanah dan tanaman pada lahan Mediteran tersebut

##### **b. Tanah Mediteran Simo, Boyolali**

##### **i. Kadar Lengas, dengan rumus:**

$$K = \frac{B-C}{C-a}$$

##### **Keterangan:**

- K: Kadar Lengas Tanah
- A: Bobot Wadah/Cawan
- B: Bobot Tanah Awal
- C: Bobot Akhir Tanah (hasil ovenan 24 jam, dengan suhu 105<sup>0</sup>C)



## ii. pH Tanah

Pengukuran pH tanah merupakan pengukuran sifat keasaman dan kebasaan tanah atau aktivitas konsentrasi ion hidrogen ( $H^+$ ) diukur dengan menggunakan kertas ukur.

## iii. Kadar Bahan Organik

Kadar bahan organik ditentukan menggunakan metode Walkley dan Black yaitu dengan rumus

$$\text{Kadar C} = \frac{(B - A) \times n_{\text{FeSO}_4} \times 3}{100 + \text{KL}} \times 10 \times \frac{100}{77} \times 100\%$$

$$\text{Kadar Bahan Organik (BO)} = \text{Kadar C} \times \frac{100}{58} \%$$

Keterangan:

A = Banyaknya  $\text{FeSO}_4$  yang digunakan dalam titrasi baku

B = Banyaknya  $\text{FeSO}_4$  yang digunakan dalam titrasi blangko

## iv. Kandungan N dalam tanah

Kandungan N total tanah diukur melalui tahapan Destruksi, Destilasi, dan Titrasi, untuk perhitungannya menggunakan rumus sebagai berikut

$$\text{Kadar N} = \frac{(B - A) \times n_{\text{NaOH}} \times 14}{100 + \text{KL}} \times 100\%$$

Keterangan:

A = Banyaknya  $\text{NaOH}$  0,1 N yang digunakan dalam titrasi baku

B = Banyaknya  $\text{NaOH}$  0,1 N yang digunakan dalam titrasi blangko

KL = Kadar lengas sampel tanah

## v. Kandungan C/N Rasio

Kandungan C/N rasio dihitung dengan hasil perhitungan C dibagi dengan hasil hitung N tanah pada setiap sampel tanah.

**c. Tanaman korban****i. Tinggi tanaman (cm)**

Tinggi tanaman diukur dari pangkal tanaman yaitu batas akar sampai dengan ujung titik tumbuh, dinyatakan dalam satuan cm.

**ii. Berat segar tanaman (g)**

Dengan cara ditimbang menggunakan timbangan elektrik, dinyatakan dalam gram. Bagian yang ditimbang adalah keseluruhan tanaman, dari akar dan keseluruhan tanaman kecuali hasil dari tanaman kedelai.

**iii. Berat kering tanaman (g)**

Dengan mengeringkan keseluruhan bagian tanaman yang telah ditimbang berat segarnya dibawah sinar matahari selama 24 jam, lalu dioven dengan suhu  $60^{\circ}\text{C}$ . Penimbangan dilakukan berulang-ulang sehingga diperoleh berat kering tanaman secara konstan, dinyatakan dalam gram.

**iv. Panjang akar (cm)**

Dengan mengukur akar setiap tanaman kedelai dengan menggunakan penggaris dari pangkal tanaman hingga akar terpanjang pada pengamatan tanaman sampel.

**v. Berat segar akar (g)**

Dengan cara mencabut tanaman, memotong akarnya kemudian ditimbang menggunakan timbangan elektrik, dinyatakan dalam gram

**vi. Berat kering akar (g)**

Dengan mengeringkan akar yang telah ditimbang berat segarnya di bawah sinar matahari selama 24 jam, lalu dioven  $60^{\circ}\text{C}$ . Penimbangan dilakukan

berulang-ulang sehingga diperoleh berat kering akar secara konstan, dinyatakan dalam gram.

**vii. Proliferasi akar dan ketebalan akar**

Pengamatan dilakukan dengan melihat penyebaran perakaran tanaman pada saat pemanenan kedelai dengan cara mengambil gambar akar dan pengamatan ada tidaknya penebalan lapisan kulit akar dengan melihat irisan akar.

**viii. Jumlah Polong**

Menghitung jumlah polong dalam setiap tanamannya

**ix. Berat polong (g)**

Jumlah polong setiap tanamannya ditimbang dan dibagi keseluruhan sehingga diperoleh rata-rata berat polong pertanaman.

**x. Jumlah Biji**

Perhitungan biji dengan cara menghitung semua biji pada setiap tanamannya, biji sudah dipisahkan dengan polongnya.

**xi. Berat Biji (g)**

Keseluruhan biji pada setiap tanaman sampel ditimbang, Berat biji ditimbang dengan menggunakan timbangan elektrik, dinyatakan dalam gram.

### xii. Berat biji 100

Pengamatan berat 100 biji dilakukan dengan cara menimbang berat kedelai 100 biji dari masing-masing blok yang telah dikeringkan, kemudian mengukur kadar airnya dengan dikonversikan pada kadar air 11% dengan rumus :

$$\text{gram} = \frac{(100-Ka)}{100-14\%} \times b$$

a = berat 100 biji pada kadar air 11 %

b = berat 100 biji pada kadar air terukur

### xiii. Hasil kedelai ( ton/ha)

Hasil tanaman kedelai dinyatakan dalam gram. Pengamatan dilakukan pada saat panen dari tiap unit hasil perlakuan yaitu dengan mengeringkan biji kemudian ditimbang diukur kadar airnya kemudian dikonversikan dalam ton/ha pada kadar air 11% dengan rumus :

$$H = \frac{A}{B} \times \frac{(100-Ka)}{100-11\%} \times C \text{ kg}$$

Keterangan:

H = hasil panen/ha pada kadar air 11%

A = luas lahan dalam satuan ha (10.000 m<sup>2</sup>)

B = Luas Petak hasil (m<sup>2</sup>)

C = Berat biji per blok hasil (Kg/m<sup>2</sup>)

Ka= kadar air biji terukur.

## **2. Penelitian Eksperimen**

### **a. *Rhizobium* sp**

#### **i. Diameter nodul**

Diameter diukur dengan jangka sorong, nilai dari keseluruhan nodul pada setiap tanaman dipersentasekan sehingga menghasilkan nilai rata-rata dari ukuran diameter nodul. Satuan dalam pengukuran diameter adalah cm.

#### **ii. Sebaran nodul**

Sebaran nodul diamati bagaimana sebarannya, dan diambil gambar, untuk mengetahui seberapa luasan sebarannya

#### **iii. Jumlah nodul**

Jumlah nodul ditentukan dengan cara menghitung semua nodul yang terdapat pada akar pada setiap tanaman sampel

#### **iv. Berat nodul (gram)**

Berat nodul diketahui dari menimbang keseluruhan nodul yang ada pada setiap tanaman sampel.

#### **v. Nodul efektif (%)**

Nodul efektif ditentukan dengan mengukur keefektifitasannya dalam persen, dari 20 nodul pada setiap tanaman dihitung berapa nodul yang efektif dengan kriteria berwarna merah atau coklat pada belahan nodul.

Isolasi dan karakterisasi *Rhizobium* sp: hasil isolasi akan mengidentifikasi *Rhizobium* sp., baik dari bentuk koloni, struktur dalam, bentuk tepi, elevasi serta morfologi selnya.

**a. *Rhizobakteri***

- i. Isolasi *Rhizobakteri* dan *screening* osmotoleran NaCl
- ii. Karakterisasi *Rhizobakteri*: Isolat yang paling tahan cekaman NaCl dengan tingkatan Molaritas yang berbeda dikarakterisasi koloni, sifat gram, bentuk sel, sifat fisiologi.

**b. Mikoriza**

- i. Persentase infeksi MVA diukur dengan (%)

$$\frac{A}{B} \times 100 \%$$

Keterangan :

A= Jumlah akat yang trifeksi  
B=jumlah total akar yang diamati.

- ii. Jumlah vesikel, arbuskul  
  
Jumlah vesikel dan arbuskul dengan menghitung berapa jumlah akar yg terinfeksi vesikel atau arbuskul, diamati dengan mikroskop.
- iii. Jumlah spora dan karakterisasi spora  
  
Jumlah spora dihasilkan dari menghitung jumlah keseluruhan spora yang terlihat pada mikroskop

## F. Analisis Data

Analisis data pada penelitian ini dengan menggunakan *eksploratif*, yaitu mencocokkan serta mengevaluasi data karakteristik tanah, *Rhizobium sp*, *Rhizobakteri*, dan Mikoriza. Analisis dilakukan di laboratorium dengan kriteria kesesuaian secara deskriptif. Analisis deskriptif digunakan untuk memberikan gambaran, penjelasan, dan uraian hubungan antara tanah, tanaman kedelai meliputi pertumbuhan dan hasil, dengan asosiasi *Rhizobium sp*, *Rhizobakteri*, dan Mikoriza berdasarkan data dan informasi kemudian dibuat dalam bentuk tabel atau foto.