

III. METODE PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan di Laboratorium Bioteknologi dan Lahan Percobaan Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Waktu pelaksanaan dimulai pada bulan Agustus 2018 sampai dengan Agustus 2019.

B. Bahan dan Alat

1. Bahan

a. Tahap isolasi dan pemurnian

Nodul akar kedelai Edamame, aquadest, air steril, alkohol (desinfektan), medium YMA (Yeast Manitol Agar) + *congo red* 1%, medium miring YMA + *congo red*, isolat *Rhizobium* sp. dan alkohol (desinfektan).

b. Tahap karakterisasi isolat :

Biakan murni *Rhizobium* sp., medium nutrien cair, medium (Glukosa dan Sukrosa), medium Nitrat cair, alkohol, kertas lakmus, asam Sulfanilat, Naphthylamin.

c. Tahap perbanyakkan *Rhizobium* sp. untuk inokulum :

Biakan murni *Rhizobium* sp., medium YMA + *congo red*, medium YMC (Yeast Manitol Cair), air steril,

d. Tahap re-inokulasi

Inokulum *Rhizobium* sp., benih kedelai Edamame, media tanah steril dan non steril, air, tanah gambut, perekat.

2. Alat

a. Tahap isolasi dan pemurnian

Autoklaf, bunsen, mortar, tabung reaksi, petridis, jarum ose, pipet ukur, timbangan analitik, drigalski

b. Tahap karakterisasi isolat :

Mikroskop, tabung reaksi, kaca preparat, pipet ukur, gelas ukur

c. Tahap perbanyakkan *Rhizobium indigenous* untuk inokulum :

Shaker, tabung reaksi, mikropipet, drigalski, petridisk, *colony counter*.

d. Tahap re-inokulasi

Polybag, sekop, ayakan, sekop, cangkul.

C. Metode Penelitian

Penelitian dilakukan dengan menggunakan metode eksperimen dengan rancangan percobaan faktor tunggal yang disusun dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL). Perlakuan yang diujikan adalah macam isolat *Rhizobium* sp. nodul Edamame yang terdiri dari :

A : inokulum isolat B

B : inokulum isolat E

C : inokulum isolat F

D : inokulum campuran isolat B, E dan F.

Terdapat 4 perlakuan yang masing-masing diulang sebanyak 3 kali sehingga diperoleh 12 unit perlakuan. Setiap unit perlakuan terdapat 3 tanaman sampel, 2 tanaman korban serta 1 tanaman cadangan sehingga terdapat 60 tanaman. *Layout* penelitian disajikan pada lampiran 1.

D. Cara Penelitian

Tahap 1 : Karakterisasi nodul akar kedelai Edamame

Karakterisasi nodul akar kedelai Edamame meliputi perhitungan jumlah nodul, pengukuran diameter nodul, penimbangan berat nodul dan menghitung efektifitas nodul.

Karakterisasi nodul nodul akar kedelai Edamame diawali dengan menghitung jumlah nodul pada akar kedelai Edamame. Setelah itu dilakukan pengukuran diameter nodul Edamame menggunakan jangka sorong. pengukuran efektifitas nodul digunakan untuk mengetahui persentase nodul akar yang efektif. Nodul akar yang efektif adalah nodul akar yang berwarna merah pada bagian dalam setelah dibelah. Selanjutnya penimbangan berat nodul dilakukan pada keseluruhan nodul yang efektif.

Tahap 2 : Isolasi *Rhizobium indigenus* dari nodul akar kedelai Edamame dengan metode permukaan dan goresan pada medium selektif YMA + Congo red.

a. Sterilisasi Alat

Sterilisasi alat bertujuan untuk membunuh mikroba yang tidak diinginkan pada alat sehingga tidak terjadi kontaminasi saat proses. Peralatan *glassware* yang akan digunakan direndam menggunakan air yang dicampur dengan *detergen* kemudian direbus selama 10 menit, kemudian dibilas sampai bersih dan dibungkus dengan kertas atau plastik lalu disterilkan dalam *autoklaf* 121°C tekanan 121 atm selama 30 menit (lampiran 8a.1).

b. Pembuatan Media

Medium yang digunakan yaitu media YMA + *congo red*. Bahan untuk membuat medium ini dicampur satu dan dilarutkan dalam aquadest, kemudian dipanaskan dalam penangas air supaya homogen lalu dilakukan pengaturan pH dengan menggunakan pH stik. Setelah itu, medium dimasukkan dalam tabung reaksi lalu ditutup menggunakan kapas dan dibungkus kertas. Sterilisasi medium dilakukan menggunakan autoklaf 121°C tekanan 1 atm selama 15 menit.

c. Isolasi *Rhizobium* sp.

Rhizobium sp. diisolasi dari nodul akar kedelai Edamame di tanah Regosol. Nodul efektif selanjutnya nodul dihaluskan menggunakan mortir. Setelah itu, dibuat suspensi nodul yang telah dihaluskan dilarutkan pada 99 ml air steril (pengenceran 10^{-2}).

Isolasi *Rhizobium* sp. dilakukan menggunakan metode goresan (*streak plate method*) dan metode permukaan (*surface plating method*). Metode goresan dilakukan dengan cara mengambil 1 ose larutan suspensi nodul akar dan digoreskan pada media YMA dengan *congo red* secara aseptis. Sedangkan metode permukaan atau *surface plating method* dilakukan dengan mengambil 0,1 ml larutan suspensi nodul akar menggunakan pipet ukur kemudian diinokulasikan ke permukaan media YMA menggunakan *drigalsky*. Setelah itu, petridis diinkubasi selama 2 x 24 jam secara terbalik pada suhu kamar. Pada tahap *plating* awal digunakan metode permukaan dan goresan masing-masing 2 ulangan. Pada tahap isolasi ini digunakan model pengenceran 10^{-6} , 10^{-7} dan 10^{-8} . Total alat gelas yang digunakan yaitu 12 petridis.

Tahap 3 : Pemurnian isolat *Rhizobium indigenus* dengan metode goresan pada medium YMA dan YMC tanpa *Congo red* sampai murni.

Setelah didapatkan koloni yang terpisah kemudian dilakukan pemurnian ke media YMA miring + *congo red* untuk diperbanyak selama 2 x 24 jam. Selanjutnya dilakukan *re-plating* kembali ke petridis menggunakan metode goresan untuk karakterisasi koloni bakteri tersebut dan memastikan bahwa koloni yang diperoleh berbeda bentuk, warna dan ukurannya. Setelah yakin bahwa koloni tersebut berbeda kemudian dipindahkan dalam medium YMA + *congo red* miring menggunakan metode goresan, sampai diperoleh kultur yang murni.

Tahap 4 : Karakterisasi isolat *Rhizobium indigenus*

a. Karakterisasi koloni bakteri *Rhizobium* sp.

Identifikasi *Rhizobium* sp. dilakukan pada medium YMA + *congo red* dilakukan dengan mengamati : bentuk koloni, elevasi, bentuk tepi, struktur dalam, ukuran dan warnanya.

b. Karakterisasi bentuk sel dan sifat gram

Pengamatan karakterisasi bentuk sel dan sifat gram dilakukan dengan mengambil 1 ose suspensi lalu diletakkan di atas kaca preparat. Setelah itu dilakukan pemanasan di atas api bunsen sampai preparat kering dan ditunggu sampai dingin. Setelah dingin ditetesi dengan cat gram A sebanyak 1-2 tetes dan diamkan selama 1 menit, dicuci dengan air mengalir lalu kering anginkan. Selanjutnya ditetesi lagi menggunakan cat gram B dan biarkan selama 1 menit, dicuci dengan air mengalir lalu kering anginkan. Menetesi lagi dengan larutan gram C selama 30 detik, selanjutnya dicuci dengan air mengalir dan kering anginkan. Kemudian ditetesi dengan cat gram D selama 2 menit, dicuci dengan air mengalir lalu dikeringkan. Setelah kering lalu dilakukan pengamatan dengan mikroskop, apabila terbukti bakteri gram positif maka akan berwarna violet sedangkan bakteri gram negatif berwarna merah. Dan bentuk sel *Rhizobium* sp. adalah batang.

c. Uji Fisiologi dan Biokimia

1. Uji Aerobisitas

Identifikasi pada medium Nutrien cair dengan mengambil sebanyak 1 ml suspensi *Rhizobium* sp. yang diinbasi selama 48 jam pada suhu kamar. Pada

medium ini dilakukan pengamatan pertumbuhan sel yang dihasilkan. Jika koloni tumbuh pada permukaan maka termasuk aerob, jika tersebar maka termasuk fakultatif anaerob, dan jika didasar tabung termasuk anaerob

2. Uji Katalase

Pengujian Katalase dilakukan dengan meneteskan H_2O_2 pada cawan porselen. Setelah itu dilakukan pengambilan 1 ose suspensi *Rhizobium* sp. lalu dicampurkan pada H_2O_2 dan diaduk-aduk secara merata. Hasil positif apabila terdapat gelembung yang muncul.

3. Uji Glukosa dan Sukrosa

Uji ini dilakukan untuk mengetahui kemampuan *Rhizobium* sp. dalam memfermentasi Glukosa dan Sukrosa menjadi menjadi asam dan gas CO_2 . Uji ini dilakukan dengan menyediakan 10 ml Glukosa dan Sukrosa diinkubasikan 1 ml suspensi *Rhizobium* sp. selama 48 jam pada suhu kamar. Jika ditemukan gelembung pada tabung Durham menandakan bakteri tersebut dapat menghasilkan CO_2 , sedangkan apabila warnanya berubah menandakan dapat menghasilkan asam.

4. Uji Pati

Mula-mula dilakukan pengambilan larutan dalam tabung reaksi berisi medium pati cair yang telah diinokulasikan *Rhizobium* sp. selama 48 jam, pada cawan porselen. Lalu dilakukan penetesan larutan iod pada cawan porselen. Setelah itu dilakukan pengamatan warna. Hasil positif apabila setelah pencampuran Iod dengan suspensi media pati cair dengan isolat yang berwarna biru berubah memudar.

d. Uji Perubahan N

1. Uji Nitrat

Pengujian Nitrat ini dilakukan dengan mengambil 1 ml suspensi biakan murni *Rhizobium* sp. dicampurkan pada medium Nitrat Cair diinkubasikan selama 48 jam pada suhu kamar. Kemudian 2 tetes suspensi tersebut diteteskan pada cawan porselen lalu ditambahkan 2 tetes asam Sulfanilat dan α -Naphthylamin. Setelah itu dilakukan pengamatan reaksinya berdasarkan perubahan warna.

2. Uji Ammonia

Uji Ammonia caranya dengan melihat perubahan warna kertas lakmus merah setelah tabung reaksi dipanaskan selama 5 menit. Jika terjadi perubahan warna menjadi biru berarti berbentuk Ammonia.

Tahap 5 : Perbanyak *Rhizobium* sp. untuk inokulum

Pembuatan *starter* menggunakan isolat bakteri *Rhizobium indigenus* Regosol yang sudah diperbanyak menggunakan 10 ml media YMA dan diinkubasi selama 48 jam. Setelah inkubasi, inokulum bakteri *Rhizobium indigenus* Regosol diambil dari media *starter*, dimasukkan pada erlenmeyer yang berisi 100 ml media YMA pada erlenmeyer untuk di-*shaker* selama 48 jam (lampiran 8a.2), kemudian dihitung jumlah bakteri yang hidup menggunakan metode TPC (*Total Plate Count*) pada media YMA.

Tahap 6 : Uji Kompetibilitas menggunakan metode re-inokulasi antara isolat

***Rhizobium* sp. dengan benih kedelai Edamame.**

a. Persiapan tanam

Persiapan tanam dilakukan dengan memasukkan media tanah Regosol pada polibag sesuai dengan perhitungan (lampiran 8b.7). Untuk tempat media tanam digunakan polibag ukuran 10 kg, dan ditambah dengan pupuk dengan dosis SP-36 200 kg/h, serta pupuk kandang 20 ton/h menggunakan metode *placement*, yaitu dengan dimasukkan ke dalam lubang di sisi kanan dan kiri lubang tanam sedalam 5 cm (lampiran 8b.8).

b. Aplikasi inokulum pada benih

Mula-mula benih kedelai Edamame direndam dahulu dengan air sebelum diberikan inokulum *Rhizobium* sp. Setelah itu benih ditiriskan dan dikering anginkan. *Carrier* yang digunakan pada penelitian ini adalah gambut. Dilakukan pengecekan pH gambut terlebih dahulu sebelum diberikan kapur dolomit untuk menetralkan keasaman gambut tersebut (lampiran 8a.4). Gambut dilakukan penimbangan sesuai kebutuhan inokulum (lampiran 8a.5). Pemberian inokulum dilakukan dengan melumuri benih kedelai yang akan ditanam dengan inokulum *Rhizobium* sp. sebanyak 50 ml tiap perlakuan. Untuk merekatkan inokulum dengan gambut serta benih kedelai Edamame digunakan perekat yang

telah diencerkan terlebih dahulu sebelumnya (lampiran 8a.3). Kemudian benih dicampur dengan gambut yang telah diberikan inokulum dan perekat lalu dikering anginkan (lampiran 8.6)

c. Penanaman

Benih kedelai Edamame yang sudah diberi perlakuan ditanam ke dalam polibag pada sore hari untuk mengurangi resiko stres pada benih. Penanam dilakukan dengan cara membuat lubang tanam pada polibag. Setiap lubang tanam diisi dengan 2 benih kedelai Edamame untuk mengurangi resiko jika ada tanaman yang mati (lampiran 8b.9).

d. Pemeliharaan

1. Penyiraman intensif

Penyiraman dilakukan sesuai kebutuhan tanaman kedelai Edamame. Volume penyiraman pada masa perkecambahan (0-5 hst) dan stadium awal vegetatif (15-20 hst). Sedangkan penyiraman intensif dilakukan pada saat masa pembungaan (25-35 hst) dan pengisian polong (35-65 hst).

2. Pemupukan susulan

Pemupukan susulan menggunakan pupuk Urea 200 kg/h, ZA 150 kg/ha dan KCl 150 kg/h pada umur tanaman 10 HST dan 21 HST. Pupuk diberikan menggunakan metode *placement*, yaitu dimasukkan ke dalam lubang di sekitar tanam sedalam 5 cm.

3. Penyiangan

Penyiangan dilakukan setiap ada gulma yang tumbuh pada media tanam. Pengendalian gulma dilakukan secara manual dengan cara mencabut langsung gulma yang tumbuh.

4. Pengendalian OPT

Sasaran pengendalian OPT pada penanaman kedelai Edamame adalah hama belalang hijau (*Dissosteira carolina*) dan ulat grayak yang menyerang polong dan biji sehingga mengempis dan kering serta biji bagian dalam atau

kulit polong berbintik coklat. Pengendaliannya dengan menyemprot Regent 50SC (lampiran 8b.10)

e. Panen

Kedelai Edamame dipanen muda saat sudah memasuki umur 63 - 68 HST (lampiran 8b.11). Panen kedelai dilakukan apabila sebagian besar polong sudah terisi. Waktu panen dilakukan saat pagi hari agar nodul akar tetap segar saat dilakukan karakterisasi.

A. Parameter Pengamatan

1. Tahap identifikasi dan karakterisasi nodul akar kedelai Edamame

- a. Jumlah nodul (buah) : jumlah nodul dihitung secara manual setelah dilakukan pencabutan akar. Akar dicabut secara hati-hati kemudian dibersihkan dengan air lalu dihitung keseluruhan nodulnya. Jumlah nodul dinyatakan dalam satuan buah.
- b. Bobot segar nodul (g) : semua nodul yang telah dihitung kemudian ditimbang menggunakan timbangan analitik. Bobot nodul dinyatakan dalam satuan gram.
- c. Persentase efektifitas nodul (%)

$$\frac{\text{Jumlah nodul akar efektif}}{\text{Jumlah nodul akar total}} \times 100\%$$

Nodul akar dibelah dengan menggunakan *cutter* untuk mengetahui efektifitasnya. Nodul akar efektif adalah nodul yang terlihat berwarna merah pada bagian dalam setelah dilakukan pembelahan. Satuan persentase efektifitas nodul dinyatakan dalam persen.

- d. Diameter nodul (cm) : diameter nodul diukur dengan menggunakan jangka sorong setelah tanaman dipanen. Diameter nodul dinyatakan dalam satuan sentimeter.

2. Tahap identifikasi dan karakterisasi isolat *Rhizobium* sp.

a. Koloni *Rhizobium* sp.

- 1) **Diameter koloni** : dihitung setelah inkubasi selama 48 jam

- 2) **Bentuk koloni** : diamati berdasarkan bentuk koloni, bentuk tepi, elevasi dan struktur dalam pada media YMA padat + *congo red* setelah inkubasi selama 48 jam
- 3) **Warna koloni** : diamati berdasarkan warna setelah inkubasi selama 48 jam
- 4) **Lendir** : diamati berdasarkan lendir yang muncul pada koloni setelah inkubasi selama 48 jam

b. Sel *Rhizobium* sp.

- 1) **Bentuk Sel** : diamati setelah dilakukan pengecatan gram menggunakan mikroskop.
- 2) **Sifat gram** : diamati berdasarkan warna setelah dilakukan pewarnaan gram. Bakteri gram positif akan memberikan warna ungu dan bakteri negatif akan berwarna merah ketika diberikan pewarnaan gram.

c. Uji Fisiologi dan Biokimia

- 1) **Aerobisitas** : diamati berdasarkan pertumbuhan bakteri setelah diinkubasi pada media Nutrien Cair. Jika koloni tumbuh pada permukaan maka termasuk aerob, jika tersebar maka termasuk fakultatif anaerob, dan jika didasar tabung termasuk anaerob
- 2) **Sifat Katalase** : diamati berdasarkan gelembung yang dikeluarkan setelah penyampuran H₂O₂ 3% dengan isolat *Rhizobium* sp. Hasil positif apabila terdapat gelembung yang muncul.
- 3) **Uji Fermentasi Glukosa dan Sukrosa** : diamati setelah inkubasi selama 48 jam. Apabila ditemukan gelembung pada tabung Durham menandakan bakteri tersebut dapat menghasilkan CO₂, sedangkan apabila warnanya berubah menandakan dapat menghasilkan asam.
- 4) **Uji pati** : diamati setelah dilakukan penetesan larutan iod. Hasil positif apabila setelah pencampuran iod dengan suspensi media pati cair dengan isolat yang berwarna biru berubah memudar.

d. Perubahan N

- 1) **Hasil uji Nitrat** : diamati berdasarkan perubahan warna. Untuk uji Nitrat, perubahan warna terjadi setelah dilakukan penambahan asam sulfanilat

dan Naphthylamin. Jika terjadi perubahan warna menjadi merah berarti isolat dapat merubah Nitrat menjadi Nitrit.

- 2) **Hasil uji Ammonia** : uji Amonium, perubahan warna terjadi setelah dipanaskan selama 5 menit (dilihat pada kertas lakmus). Jika terjadi perubahan warna menjadi biru berarti berbentuk Ammonia.

3. Tahap Perbanyakkan *Rhizobium sp.* untuk inokulum

a. Viabilitas *Rhizobium sp.* pada starter

Perhitungan populasi bakteri *Rhizobium sp.* dilakukan pada sebelum aplikasi menggunakan metode *Total Plate Count* (TPC) pada media YMA 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

- a) Jumlah koloni tiap petridis antara 30 – 300 koloni
- b) Tidak terdapat koloni yang menutup lebih besar dari setengah luas petridis/*spreader*.
- c) Perbandingan jumlah koloni dari pengenceran berturut-turut antara pengenceran yang lebih besar dengan pengenceran yang sebelumnya. Jika menemui kesamaan atau lebih kecil dari 2 maka hasilnya dirata-rata dan jika lebih besar dari 2 maka digunakan sebagai koloni dari hasil pengenceran sebelumnya.
- d) Jika menggunakan ulangan setelah memenuhi syarat maka hasilnya dirata-rata.

Dari hasil uji populasi *Rhizobium indigenus* Regosol, didapatkan jumlah *Rhizobium* sp. sebesar $7,0 \times 10^8$ CFU/ml, sehingga bisa dilanjutkan untuk aplikasi.

4. Tahap Re-inokulasi *Rhizobium* sp. pada bibit kedelai

a. Dinamika bakteri *Rhizobium indigenus* Regosol

Pengamatan dinamika jumlah populasi *Rhizobium indigenus* Regosol dilakukan pada minggu ke-3, 6 dan 9 setelah tanam dengan cara membuat suspensi nodul akar kedelai Edamame dengan aquades, diencerkan pada botol suntik (10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} dan 2 tabung reaksi (10^{-7} dan 10^{-8}). Setiap 0,1 ml pada masing-masing seri pengenceran ditanam pada cawan petri berisi media YMA, 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), dengan syarat :

- a) Jumlah koloni tiap petridis antara 30 – 300 koloni
- b) Tidak terdapat koloni yang menutup lebih besar dari setengah luas petridis/*spreader*.
- c) Perbandingan jumlah koloni dari pengenceran berturut-turut antara pengenceran yang lebih besar dengan pengenceran yang sebelumnya. Jika menemui kesamaan atau lebih kecil dari 2 maka hasilnya dirata-rata dan jika lebih besar dari 2 maka digunakan sebagai koloni dari hasil pengenceran sebelumnya.
- d) Jika menggunakan ulangan setelah memenuhi syarat maka hasilnya dirata-rata.

b. Nodul akar kedelai Edamame

- 1) **Jumlah nodul (buah)** : jumlah nodul dihitung secara manual setelah dilakukan pencabutan akar. Akar dicabut secara hati-hati kemudian dibersihkan dengan air lalu dihitung keseluruhan nodulnya. Jumlah nodul dinyatakan dalam satuan buah.
- 2) **Bobot segar nodul (g)** : semua nodul yang telah dihitung kemudian ditimbang menggunakan timbangan analitik. Bobot nodul dinyatakan dalam satuan gram.

3) Persentase efektifitas nodul (%)

$$\frac{\text{Jumlah nodul akar efektif}}{\text{Jumlah nodul akar total}} \times 100\%$$

Nodul akar dibelah dengan menggunakan *cutter* untuk mengetahui efektifitasnya. Nodul akar efektif adalah nodul yang terlihat berwarna merah pada bagian dalam setelah dilakukan pembelahan. Satuan persentase efektifitas nodul dinyatakan dalam persen.

4) Diameter nodul (cm) : diameter nodul diukur dengan menggunakan jangka sorong setelah tanaman dipanen. Diameter nodul dinyatakan dalam satuan sentimeter.

E. Analisis Data

Data yang diperoleh dari penelitian ini dianalisis menggunakan sidik ragam *Analysis of Variance* (ANOVA) dengan taraf nyata $\alpha = 5 \%$. Apabila terdapat pengaruh yang signifikan dari perlakuan yang dicobakan, maka akan dilakukan uji lanjutan menggunakan Uji *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) dengan taraf $\alpha = 5 \%$. Hasil analisis ditampilkan dalam bentuk tabel, grafik atau histogram.