

III. METODE PENELITIAN

A. Tempat Dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di lahan percobaan Fakultas Pertanian, Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Mulai bulan Mei sampai dengan Agustus 2019.

B. Bahan Dan Alat Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah: tanah, inokulum *Rhizobium sp. Indigenous*, benih kedelai Edamame, *Urea*, *ZA*, *KCl*, *SP-36*, tanah gambut, Nodul akar kedelai Edamame, aquadest, air steril, alkohol (desinfektan), medium YMA (Yeast Manitol Agar) + *Congo Red* 1%, medium miring YMA + *congo red*.

Alat-alat yang digunakan adalah: timbangan, *polybag*, cangkul, sekop, penggaris, ember, label, alat tulis, gunting, *Colony Counter*, *Shaker*, *Autoklaf*, bunsen, tabung reaksi, petridis, jarum ose, pipet ukur, timbangan analitik, drigalski.

C. Metode Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan secara eksperimen disusun dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL), dengan rancangan percobaan Faktorial (4x3).

Faktor 1 adalah inokulum *Rhizobium sp.* yang terdiri dari 4 aras yaitu :

A = Inokulum *Rhizobium sp.* Edamame isolat B

B = Inokulum *Rhizobium sp.* Edamame isolat E

C = Inokulum *Rhizobium sp.* Edamame isolat F

D = Inokulum *Rhizobium sp.* Edamame isolat campuran B, E, F

Faktor 2 adalah dosis pupuk yang terdiri dari 3 aras yaitu :

P = 1 Dosis anjuran pupuk N untuk Edamame

Q = ½ Dosis anjuran pupuk N untuk Edamame

R = ¼ dosis anjuran pupuk N untuk Edamame

Terdapat 12 kombinasi perlakuan, setiap perlakuan diulang 3 kali sehingga diperoleh 36 unit. Setiap unit terdiri dari 2 korban, 3 sampel dan 1 tanaman cadangan sehingga jumlah tanaman 216 tanaman (*layout* pada lampiran 2).

D. Cara Penelitian

Penelitian ini terdiri dari beberapa tahapan, yakni :

Tahap 1 : sterilisasi alat dan pembuatan media perbanyakan.

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 1 atm selama 30 menit.

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.

Tahap 2 : Perbanyakan *Rhizobium sp.* untuk Inokulum

Biakan murni *Rhizobium sp.* diambil 1-3 ose kemudian bisa diinokulasikan pada media YMA dengan jumlah 12 tabung. 6 tabung untuk disimpan dan 6 tabung untuk dilakukan pengenceran dengan media YMC. Pembuatan medium YMC yaitu 100 ml setiap tabung erlenmeyer dan digojog menggunakan shaker, masing-masing perlakuan 100 ml atau setiap jenis isolat yang berbeda bentuk, warna dan ukurannya.

Tahap 3 : Perbanyakan untuk identifikasi jumlah *Rhizobium sp.*

Hasil dari pemindahan ke media cair YMC di tabung reaksi kemudian dimasukkan ke dalam masing-masing Erlenmeyer steril yang berisi media YMC,

kemudian di inkubasi pada *rotary shaker* selama 48 jam untuk mengaktifkan *fase mid log* bakteri .

Dilakukan seri pengenceran 1 ml sampel dari perbanyakan diencerkan pada botol suntik berisi 99 ml aquades steril untuk seri pengenceran 10^{-2} , 10^{-4} dan 10^{-6} dan 2 tabung reaksi untuk seri pengenceran 10^{-7} dan 10^{-8} . Setiap 0,1 ml pada setiap seri pengenceran 10^{-6} , 10^{-7} dan 10^{-8} diinokulasikan pada petri berisi media YMA dengan menggunakan metode *surface*, masing-masing media ada 3 kali ulangan , inkubasi selama 48 jam.

Perhitungan populasi bakteri dilakukan 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 ml dengan menggunakan rumus :

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

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

- a. Jumlah koloni tiap cawan petri antara 30-300 koloni.
- b. Tidak ada koloni yang menutup lebih besar dari setengah luas cawan petri.
- c. Perbandingan jumlah koloni dari seri pengenceran yang berturut-turut antara pengenceran yang lebih besar dari pengenceran sebelumnya. Jika sama atau lebih kecil dari 2 maka hasilnya dirata-rata, dan jika lebih besar dari 2 maka yang digunakan adalah jumlah koloni dari seri pengenceran sebelumnya.
- d. Jika dengan ulangan, setelah memenuhi syarat hasil rata-rata (Agung Astuti dkk., 2014). Apabila kepadatan populasi bakteri kurang lebih 10^{-7} - 10^{-9} cfu/g, maka dilanjutkan formulasi inokulum.

Tahap 4 : Aplikasi Inokulum *Rhizobium sp.* dan Penanaman

- a. Pembuatan naungan

Pemberian naungan dilahan perlu dilakukan dikarenakan tanaman kedelai tidak suka terhadap banyak air, sementara penelitian ini dilakukan pada musim penghujan. naungan tersebut dibuat dari bambu dan atapnya menggunakan plastik PE.

b. Penyiapan media tanam dan pemupukan dasar

Penyiapan media tanam dilakukan 2 minggu sebelum tanam dan mengering anginkan tanah. Kemudian diayak dan dimasukkan ke polybag sebanyak 11,2 kg (lampiran 7.A.6).

c. Pengujian dilakukan dengan cara mengambil 100 benih 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):

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

Dari hasil uji perkecambahan didapatkan daya berkecambah

d. Aplikasi Inokulum

Aplikasi cair *Rhizobium* sp. yaitu mencampur tanah gambut dengan inokulum *Rhizobium* sp. *Indigenous*. Inokulum yang sudah dibuat yaitu dengan jumlah 100ml/perlakuan. Sebelum kedelai dicampur dengan gambut yang sudah diberi inokulum, kedelai direndam air selama 5 menit setelah itu ditiriskan. Pemberian perekat dilakukan ketika kedelai edamame sudah kering kemudian direndam isolat dan dicampur dengan gambut (lampiran 7.A.5).

e. Penanaman

Penanaman dilakukan dengan cara membuat lubang tanam pada polybag dan menanam 2 benih kedelai dalam 1 polybag. Hal ini untuk mengurangi resiko jika ada tanaman yang mati (lampiran 7.B.1).

Tahap 5 : pemeliharaan tanaman

a. Penyiraman

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

b. Pemupukan

Pemupukan dasar dilakukan pada 7 hari sebelum tanam, yaitu menggunakan pupuk kandang 80 gram/polybag dan 0,8 gram/polybag. Pupuk susulan yaitu pada umur tanaman 10 hari dan 21 HST. (lampiran 7.B.7).

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. Hama dan penyakit

i. Ulat polong (*Etiela zinchenella*)

Ulat yang berasal dari kupu-kupu ini bertelur di bawah daun buah, setelah menetas, ulat masuk ke dalam buah sampai besar, memakan buah muda. Gejala : pada buah terdapat lubang kecil. Waktu buah masih hijau, polong bagian luar berubah warna, di dalam polong terdapat ulat gemuk hijau dan kotorannya. Pengendalian : (1), sebelum ulat berkembang biak; (2) penyemprotan obat Reegent 50 C dengan dosis 1 g/liter air.

ii. Ulat grayak (*Prodenia litura*)

Ulat ini melakukan Serangan mendadak dan dalam jumlah besar, bermula dari kupu-kupu berwarna keabu-abuan, panjang 2 cm dan sayapnya 3-5 cm, bertelur di permukaan daun. Tiap kelompok telur terdiri dari 350 butir. Gejala : kerusakan pada daun, ulat hidup bergerombol, memakan daun, dan berpencar mencari rumpun lain. Pengendalian: Sanitasi kemudian pestisida disemprotkan pada sore/malam hari (saat ulat menyerang tanaman) beberapa insektisida yang efektif seperti Reegent 50 C dengan dosis 1 g/liter air.

iii. Belalang (*Caelifera*)

Belalang biasanya berwarna cokelat, hijau atau hitam. Mereka memiliki kaki belakang besar yang membantu mereka melompat jarak jauh dari rumput ke rumput. Dari segi anatomi belalang memiliki susunan tubuh unik yang terbagi menjadi tiga bagian utama yakni kepala, dada, dan perut. Kaki belalang yang besar biasa disebut jumping leg (kaki belakang) yang digunakan untuk mendorong belalang di udara untuk melompat dari daun ke daun. Sementara kaki tengah dan kaki depan,

digunakan untuk berjalan dan menggenggam pohon, daun. Belalang menyerang dengan memakan daun-daun tanaman sehingga mengurangi luas permukaan daun dan mengganggu fungsi fisiologis dari tanaman yang diserang. Kerusakan daun ini berpengaruh terhadap produktivitas tanaman tersebut. Sanitasi kemudian pestisida disemprotkan pada sore/malam hari (saat ulat menyerang tanaman) beberapa insektisida yang efektif seperti Reegent 50 C dengan dosis 1 g/liter air.

Tahap 6 : panen dan Pascapanen

Kedelai dapat dipanen setelah sebagian besar polong sudah terisi penuh. Umur panen kedelai Edamame yakni 63-68 HST. Pada penelitian ini kedelai Edamame di panen pada umur 63 hari, karena Edamame merupakan tanaman konsumtif. Pemanenan dilakukan pada pagi hari untuk menjaga agar nodul akar tetap segar sehingga dapat dilakukan pengujian karakterisasi setelah dilakukan pemanenan (lampiran 7.B.4).

E. Parameter Yang Diamati

1. Nodul akar kedelai Edamame

- a. Jumlah nodul total : pengamatan dilakukan dengan menghitung jumlah seluruh nodul akar yang terbentuk . Dilakukan pada minggu ke 3,6 dan pada saat panen.
- b. Persentase efektifitas nodul (%)

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

Nodul akar efektif adalah nodul yang terlihat berwarna merah pada bagian alam setelah dilakukan pembelahan.

- c. Diameter nodul (cm)

Nodul akar kedelai Edamame diukur menggunakan jangka sorong. Kegiatan ini dilakukan pada saat pencabutan tanaman korban dan pada saat panen.

d. Berat segar nodul (g)

Menimbang seluruh nodul akar segar yang ada dalam satu tanaman

2. Pertumbuhan perakaran

a. *Poliferasi 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.

b. **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.

c. **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.

3. **Pertumbuhan tanaman kedelai Edamame**

a. Tinggi tanaman (cm)

Tinggi tanaman diukur dari pangkal tanaman yaitu batas akar sampai dengan titik tumbuh. Pengukuran ini dilakukan 1 minggu sekali sampai maksimal masa vegetatif dengan tujuan untuk mengetahui fase pertumbuhan tanaman yang akan menunjukkan grafik pertumbuhan (7.C.1 dan 7.C.1).

b. Jumlah daun (helai)

Pengamatan dilakukan pada hari ke-6 dengan menghitung daun majemuk yang muncul. Penghitungan dilakukan 1 minggu sekali (lampiran 7.C.2).

c. 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 konstan. Pengamatan bobot kering tajuk dilakukan dengan menimbang tajuk yang telah kering oven dengan menggunakan timbangan analitik dalam satuan gram.

4. **Hasil pra panen dan pasca panen**

a. Jumlah polong isi pertanaman (polong)

Polong dihitung jumlahnya per tanaman per perlakuan. Pengamatan dilakukan setelah panen (lampiran 7.D.1).

b. Persentase polong isi (%)

Perhitungan persentase polong isi dilakukan dengan menghitung jumlah polong isi dalam satu tanaman dibagi dengan jumlah polong yang terbentuk kemudian dikalikan 100%.

$$\text{Rumus persentase polong isi} : \frac{\text{Jumlah polong isi}}{\text{jumlah polong total}} \times 100 \%$$

c. Bobot segar isi per tanaman (g)

Perhitungan dilakukan pada saat panen dengan menimbang total polong isi yang dipanen.

d. Hasil polong persatuan luas (ton/ha)

Hasil polong persatuan luas diperoleh dari bobot segar polong kemudian dikonversikan ke dalam ton/ha. Rumus yang digunakan adalah :

$$\text{Hasil kedelai/ha} : \frac{10.000 \text{ m}^2}{\text{jarak tanam (m}^2\text{)}} \times \text{bobot segar polong/tanaman.}$$

F. Analisis Data

Hasil pengamatan dianalisis dengan menggunakan sidik ragam atau *Analysis Of Variance* pada taraf α 5%. Apabila ada perbedaan nyata antar perlakuan yang diujikan maka dilakukan uji lanjut dengan menggunakan *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT).