

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan waktu penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Pertanian Universitas Siliwangi Tasikmalaya untuk isolasi dan identifikasi mikroba alami dan lahan percobaan Fakultas Pertanian Universitas Siliwangi kampus Mugarsari dengan ketinggian tempat 367 m di atas permukaan laut pada bulan Oktober 2021 sampai Februari 2022.

3.2 Bahan dan alat

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah 1) tanah rizosfer tanaman kalopo (*Calopogonium mucunoides*), 2) rizosfer tanaman alang-alang (*Imperata cylindrical*) dan 3) rizosfer tanaman kirinyuh (*Eupatorium odoratum*).

Media pertumbuhan bakteri yang terdiri dari media selektif *Yeast Extract Mannitol Agar – Congo Red* (YEMA-CR) untuk bakteri penambat nitrogen, media selektif Pycovskaya untuk bakteri pelarut fosfat dan media selektif untuk *Skim Milk* (SM) Agar untuk bakteri perombak organik dalam pengujian aktivitas proteolitik, sedangkan aktivitas selolitik menggunakan media selektif *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) (Lampiran 1).

Alat yang digunakan adalah bor tanah, plastik, kertas label, tisu, timbangan analitik, polybag ukuran 35 x 18 cm, klorofil meter, LAM (*Leaf Area Meter*), hygrometer, *Laminar Air Flow*, cawan petri, tabung reaksi, jarum ose, mikropipet, autoklaf, mikroskop, gelas objek, cover glass, lampu bunsen, korek, alat tulis.

3.3 Metode penelitian

Penelitian ini menggunakan metode deskriptif dan eksperimental. Metode deskriptif digunakan untuk isolasi dan karakterisasi bakteri tanah yang berasal dari rizosfer lahan Mugarsari. Sedangkan metode eksperimental digunakan untuk menguji strain inokulum bakteri *indigenous* lahan Mugarsari terhadap

pertumbuhan dan hasil kedelai (*Glycine max* L.) varietas Devon 2 dengan Rancangan Acak Kelompok (RAK) yang terdiri dari 5 perlakuan dan 5 ulangan. Satu plot perlakuan terdiri dari 6 polybag dan tiap polybag terdiri dari 1 tanaman, sehingga jumlah tanaman yang digunakan sebanyak 150 tanaman. Tata letak percobaan disajikan pada Lampiran 2.

Perlakuan inokulasi bakteri lahan Mugarsari pada kedelai adalah sebagai berikut :

- B₀ = Tanpa inokulasi bakteri
- B₁ = Inokulasi bakteri penambat nitrogen
- B₂ = Inokulasi bakteri pelarut fosfat
- B₃ = Inokulasi bakteri perombak organik
- B₄ = Inokulasi campuran bakteri penambat nitrogen, bakteri pelarut fosfat dan bakteri perombak organik

Data hasil pengamatan dianalisis dengan ANOVA atau analisis sidik ragam menggunakan uji F pada taraf nyata 5% atau dengan selang kepercayaan 95% untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap variabel yang diamati. Model linier rancangan acak kelompok adalah sebagai berikut (Gomez dan Gomez, 2010) :

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + r_j + \epsilon_{ij}$$

Keterangan:

I = 1,2,... , t (perlakuan)

J = 1,2,... , r (ulangan)

Y_{ij} = nilai pengamatan pada satuan percobaan ke-j yang mendapatkan perlakuan ke-i

μ = nilai tengah umum

τ_i = pengaruh perlakuan ke-i

r_j = pengaruh kelompok ke-j

ε_{ij} = galat percobaan pada satuan percobaan ke-j dalam perlakuan ke-i

Berdasarkan model linier diatas, maka dapat disusun daftar sidik ragam sebagai berikut :

Tabel 1. Daftar sidik ragam

Sumber Keragaman	Derajat Bebas (db)	Jumlah (JK)	Kuadrat Tengah (KT)	F Hitung	F Tabel 5%
Ulangan	r-1	$\frac{\sum xi^2}{d} - FK$	$\frac{JKU}{dbU}$	$\frac{KTU}{KT Galat}$	
Perlakuan	t-1	$\frac{\sum xi^2}{R} - FK$	$\frac{JKP}{dbP}$	$\frac{JKP}{KT Galat}$	
Galat	(t-1)(r-1)	$JK_{tot} - JK_p - JK_u$	$\frac{JK Galat}{db Galat}$		
Total	(tr-1)	$\sum Y_{ij}^2 - FK$			

Sumber : Gomez dan Gomez (2015)

Tabel 2. Kaidah pengambilan keputusan

Hasil Analisis	Analisis	Kesimpulan Percobaan
$F_{hit} \leq F_{0,05}$	Berbeda Tidak Nyata	Tidak terdapat pengaruh antar perlakuan
$F_{hit} \geq F_{0,05}$	Berbeda Nyata	Terdapat perbedaan pengaruh antar perlakuan

Sumber : Gomez dan Gomez (2015)

Bila nilai F_{hitung} menunjukkan perbedaan yang nyata, maka dilakukan uji lanjut dengan Uji Jarak Berganda Duncan pada taraf 5% dengan rumus sebagai berikut :

$$LSR = SSR (\alpha, dbg, p) \cdot S_{\bar{x}}$$

$$S_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{KT Galat}{r}}$$

Keterangan :

LSR = *Least Significant Range*

SSR = *Significant Studentized Range* (dilihat dari tabel dengan db Galat dan $\alpha=5\%$)

α = Taraf nyata

dbg = Derajat bebas galat

p = Banyaknya nilai tengah dalam wilayah yang diuji

$S\bar{x}$ = Galat baku rata-rata (*Standard Error*)

KTG = Kuadrat tengah galat

r = Jumlah ulangan pada tiap perlakuan yang dibandingkan

3.4 Pelaksanaan penelitian

3.4.1 Uji deskriptif

a. Pengambilan sampel tanah

Sampel tanah didapatkan dari daerah kampus Mugarsari Universitas Siliwangi Kota Tasikmalaya. Sampel tanah terdiri dari 3 sampel yang diambil dari 3 titik lokasi yang berbeda, yaitu tanah rizosfer tanaman kalopo (*Calopogonium mucunoides*), rizosfer tanaman alang-alang (*Imperata cylindrica*) dan rizosfer tanaman kirinyuh (*Eupatorium odoratum*). Tiap lokasi pengambilan sampel dicatat titik koordinatnya. Penentuan titik koordinat dilakukan dengan menggunakan alat bantu *Global Positioning System* (GPS) (Tabel 3). Sampel tanah dilakukan kemudian dikompositkan untuk selanjutnya dilakukan isolasi bakteri di laboratorium.

Tabel 3. Koordinat lokasi pengambilan sampel

No	Lokasi	Koordinat Geografis
1	Plot rizosfer <i>Calopogonium mucunoides</i>	S : 07°22'50.9106" E : 108°15'1.4976" Elevasi : 367 mdpl
2	Plot rizosfer <i>Imperata cylindrica</i>	S : 07°22'51.7066" E : 108°15'2.5985" Elevasi : 367 mdpl
3	Plot rizosfer <i>Eupatorium odoratum</i>	S : 07°22'51.9856" E: 108°15'3.488" Elevasi : 367 mdpl

b. Sterilisasi alat

Alat yang digunakan dalam laboratorium dilakukan sterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1,5 Psi

(kg/cm²) selama 15-20 menit dengan tujuan untuk mengeliminasi kontaminasi alat.

c. Pembuatan media

Medium isolasi yang digunakan untuk memperoleh isolat bakteri penambat nitrogen adalah dengan menggunakan media YEMA (*Yeast Extract Mannitol Agar*), bakteri pelarut fosfat menggunakan media Pycovskaya Agar dan bakteri pengurai bahan organik menggunakan media selektif *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) untuk pengujian potensi selulolitik dan media *Skim Milk* (SM) Agar untuk pengujian potensi proteolitik.

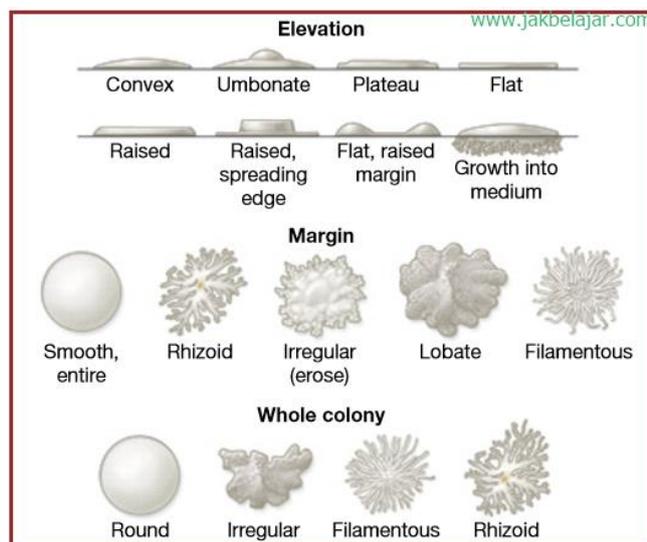
Adapun pembuatannya yaitu dengan cara menimbang kebutuhan bahan dan melarutkannya dalam 1 liter aquades dan dipanaskan menggunakan *hot plate*. Setelah semua larut, media kemudian disterilkan menggunakan autoklaf. Sedangkan untuk pembuatan media cair untuk perbanyakkan yaitu dengan menggunakan media broth spesifik yaitu YMA CR broth untuk bakteri penambat nitrogen, pycovskaya broth untuk bakteri pelarut fosfat dan CMC broth untuk bakteri perombak organik yang dilakukan dengan cara menimbang bahan dan melarutkannya dalam 1 liter aquadest kemudian dipanaskan menggunakan *hot plate* dan disterilkan menggunakan autoklaf.

d. Isolasi bakteri

Isolasi bakteri *indigenus* dilakukan dengan cara memasukkan 10 gram sampel komposit tanah rizosfer ke dalam 90 mL larutan fisiologis (0,85% NaCl) yang telah disterilkan, kemudian di vortex atau dikocok selama 2 menit, lalu suspensi didiamkan untuk memisahkan endapannya. Selanjutnya dibuat seri pengenceran dari 10⁻¹ hingga 10⁻⁷ dengan cara memasukkan 1 ml suspensi hasil pengenceran sebelumnya ke dalam 9 ml larutan fisiologis. Kemudian dipipet 0,1 mL atau 100 μ m dari semua seri pengenceran menggunakan metode *spread plate method* pada media selektif. Setiap penanaman diulang sebanyak dua kali (*duplo*), setiap

cawan petri diberikan label dan selanjutnya diinkubasi pada suhu kamar (27-28°C) selama 48 jam dalam keadaan aseptik.

Koloni yang tumbuh diamati karakteristik morfologinya, yaitu bentuk koloni, permukaan koloni, tepi koloni, elevasi koloni, warna koloni, ukuran koloni dan jumlah koloni. Jumlah koloni dihitung dengan metode cawan hitung/ *Total Plate Count* (TPC). Prinsip metode cawan hitung adalah sel bakteri yang masih hidup ditumbuhkan pada media agar, maka sel bakteri tersebut akan berbiak membentuk koloni yang dapat dilihat dan dihitung secara makroskopis, disebut sebagai *Colony Forming Unit* (CFU). Proses isolasi bakteri tersaji pada lampiran 3.



Gambar 6. Morfologi bakteri

Perhitungan jumlah bakteri dilakukan pada cawan yang ditumbuhi koloni sebanyak 30 sampai 300. Adapun rumus perhitungannya adalah sebagai berikut :

Koloni per ml atau per gram (CFU/ml) = Jumlah koloni x (1/FP)

Keterangan :

FP = faktor pengenceran pada cawan petri yang koloninya dihitung atau pengenceran x jumlah yang ditumbuhkan (volume yang dimasukkan dalam cawan petri sebanyak 0,1 ml atau 1 ml).

Metode menghitung jumlah koloni pada cawan petri dilakukan dengan mengacu pada Schegel (2001) dalam Utami dkk (2018) dengan kaidah sebagai berikut :

- 1) Cawan yang dipilih dan dihitung adalah cawan yang mengandung jumlah koloni antara 30 sampai 300.
- 2) Jika terdapat beberapa koloni yang bergabung menjadi satu atau kumpulan koloni yang dikategorikan besar dan jumlah koloni diragukan maka dihitung sebagai satu koloni.
- 3) Dalam suatu deret (rantai) yang terlihat sebagai suatu garis tebal maka dihitung sebagai satu koloni.
- 4) Data yang dilaporkan mengikuti peraturan yaitu hanya terdiri dari dua angka, yaitu angka pertama di depan koma dan angka kedua di belakang koma.
- 5) Jika semua pengenceran menghasilkan angka kurang dari 30 koloni, hanya jumlah koloni yang terendah yang dihitung. Jika semua pengenceran menghasilkan lebih dari 300 koloni pada cawan petri, maka hanya jumlah koloni pada pengenceran yang tertinggi yang dihitung.
- 6) Jika terdapat lebih dari satu cawan yang mempunyai jumlah koloni yang memenuhi syarat, maka dihitung berdasarkan nilai rata-ratanya.

Setelah bakteri diidentifikasi dengan mengacu pada karakteristik morfologinya, selanjutnya bakteri dimurnikan pada media selektif yang baru kemudian dilakukan pengujian skrining untuk menyeleksi kemampuan tertinggi setiap bakteri lalu diperbanyak pada media cair menggunakan medium selektif cair yaitu pycovskaya broth, YMA broth dan medium CMC broth.

e. Pengujian gram

Pewarnaan gram dilakukan untuk mempermudah pengamatan dalam menentukan karakteristik morfologi sel, yaitu dilakukan dengan cara membersihkan gelas benda dengan alkohol 70% sehingga bebas lemak kemudian di panggang di atas nyala Bunsen. Preparat apusan

bakteri dibuat dengan mengambil 1 ose biakan bakteri secara aseptik lalu diratakan di atas permukaan gelas benda kira-kira seluas 1 cm². Olesan bakteri diberi 2 sampai 3 tetes pewarna kristal violet (gram A) dan dibiarkan selama 1 menit kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Kemudian olesan bakteri diberi larutan iodin (gram B) dan dibiarkan selama 1 menit lalu dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Selanjutnya olesan bakteri dicuci dengan larutan alkohol 95% (gram C) selama 30 detik kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Lalu olesan bakteri diberi larutan safranin (gram D) selama 1 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Selanjutnya preparat diamati menggunakan mikroskop dengan pembesaran 1000x menggunakan minyak imersi. Bakteri gram positif berwarna ungu, sedangkan bakteri gram negatif berwarna merah (Cappuccino dan Sherman, 2014).

f. Pengujian hipersensitif

Pengujian hipersensitif (*hypersensitive response/HR*) bertujuan untuk mengetahui potensi patogenitas bakteri calon agen hayati terhadap tanaman. Uji ini dilakukan terhadap tanaman tembakau. Masing-masing inokulum bakteri diinjeksikan sebanyak 1 ml menggunakan suntikan *syringe* tanpa jarum pada bagian belakang helaian daun tembakau dengan kerapatan 10⁶ CFU/ml. Jika dalam pengamatan dalam waktu 2 x 24 jam menunjukkan gejala nekrosis maka bakteri tersebut bersifat patogen pada tanaman, sedangkan daun yang tidak mengalami nekrosis menunjukkan bahwa bakteri bersifat non-patogen pada tanaman (Zuraidah, 2013). Bakteri yang tidak menunjukkan gejala nekrosis dan memiliki kemampuan tertinggi dalam aktivitas penambatan nitrogen, pelarutan fosfat dan perombakan organik kemudian diaplikasikan pada tanaman kedelai.

3.4.2 Uji eksperimen

a. Pembuatan media tanam dan penanaman

Tanah yang digunakan pada *green house* di dapat dari tanah Mugarsari dengan menggunakan polybag berukuran 35 x 18 cm. Tanah yang digunakan

sebagai media tanam dilakukan sterilisasi secara kimia dengan menggunakan bahan kimia basamid selama 14 hari sebelum tanam. Media tanam diisi dengan tanah dan pupuk organik kotoran sapi dengan perbandingan 3:1 (v/v), total berat media tanam adalah 6 kg per polybag (lampiran). Penanaman dilakukan dengan melubangi tanah dengan kedalaman 5 cm dan ditanam 2 benih kedelai setiap polybag dan ditutup dengan kompos.

b. Aplikasi inoculan bakteri

Pemberian inoculan bakteri dilakukan dengan metode Hindersah dan Matheus (2015), dilakukan dengan tingkat kerapatan 10^6 CFU/ml yang diaplikasikan dengan merendam benih kedelai menggunakan inoculan bakteri selama 1 jam sebelum tanam dan dilakukan aplikasi dengan menyiram 10 ml inoculan pada media tanam sebanyak 3 kali pemberian yaitu pada saat tanam, 14 hari setelah tanam dan 35 hari setelah tanam.

c. Pemeliharaan tanaman dan pemanenan

Uji keefektifan strain inoculan bakteri terhadap kedelai dilakukan di kebun percobaan Mugasari. Tanah yang digunakan telah digemburkan sebelum digunakan untuk menanam benih. Biji kedelai varietas Devon 2 diseleksi untuk mendapatkan biji dengan kualitas yang baik.

a. Penjarangan

Penjarangan tanaman dilakukan saat tanaman berumur 5 sampai 7 hari setelah tanam. Penjarangan dilakukan dengan memotong tanaman yang tidak perlu sehingga hanya tinggal satu tanaman yang paling baik pertumbuhannya untuk setiap polybag.

b. Penyiraman

Penyiraman dilakukan 2 kali sehari, yaitu pada pagi dan sore hari.

c. Penyulaman

Penyulaman dilakukan 5 hari setelah tanam, untuk mengganti tanaman yang mati dengan tanaman yang baru yang umurnya sama dengan tanaman mati tersebut.

d. Penyiangan

Penyiangan dilakukan dilakukan untuk menghindari persaingan antara gulma dan tanaman, dilakukan secara manual dengan mencabutnya langsung pada 14 hari setelah tanam (hst), 28 hst, 42 hst, 56 hst dan 70 hst.

e. Pemupukan

Pemupukan dilakukan dengan pemberian pupuk organik kotoran sapi dan pupuk anorganik (NPK, SP-36 dan KCl dengan dosis 50% dari rekomendasi). Seluruh jenis pupuk diberikan pada waktu 14 hari sebelum benih ditanam.

f. Pengendalian organisme pengganggu tanaman

Pengendalian hama dilakukan dengan mengintroduksi tanaman refugia sebagai konservasi hayati dan juga melakukan penyemprotan pestisida nabati ekstrak daun sirsak namun jika melebihi ambang kendali pengendalian dilakukan menggunakan insektisida, sedangkan pengendalian penyakit dilakukan dengan penyemprotan fungisida Antracol 70 WP dengan konsentrasi 1-2 g/liter air. Penyemprotan pestisida nabati dilakukan pada 4 dan 6 MST dan fungisida dilakukan pada 3 MST dan 7 MST.

g. Panen

Panen dilakukan setelah kedelai menunjukkan kriteria panen, yaitu pada saat tanaman sudah matang 90% yang ditandai dengan berwarna kecoklatan, daun telah rontok, kulit polong mudah dikupas dan batang sudah kering.

3.5 Parameter pengamatan

3.5.1 Parameter penunjang

Parameter pengamatan penunjang adalah pengamatan yang dilakukan terhadap variabel yang datanya tidak diuji secara statistik untuk menunjang data penelitian dan mengetahui pengaruh lain diluar perlakuan. Adapun parameter pengamatan penunjang adalah analisis status hara tanah, serangan organisme pengganggu tanaman, suhu dan kelembaban.

3.5.2 Parameter utama

Parameter pengamatan utama adalah pengamatan yang dilakukan pada setiap variabel yang tujuannya adalah untuk mengetahui pengaruh dari setiap perlakuan yang diuji coba. Adapun parameter pengamatan utama adalah karakteristik morfologi dan kelimpahan bakteri *indigenous* dan pertumbuhan kedelai pada fase vegetatif dan komponen hasil pada fase generatif. Respon pertumbuhan vegetatif kedelai terhadap pemberian inokulan dimulai pengamatan pada 14 hari setelah tanam, dan respon pertumbuhan generatif diamati pada 70 hari setelah tanam.

Parameter pertumbuhan kedelai yang diamati pada fase vegetatif adalah :

a. Tinggi tanaman (cm)

Pengamatan tinggi tanaman dilakukan dengan mengukur tanaman dari pangkal batang sampai ujung daun tertinggi pada fase vegetatif. Pengukuran dilakukan pada umur 14, 21, 28, dan 35 hari setelah tanam hari setelah tanaman (hst).

b. Jumlah daun (helai)

Perhitungan terhadap jumlah daun dilakukan setiap 7 hari sekali pada fase vegetatif. Perhitungan dilakukan pada umur 14, 21, 28, 35 hari setelah tanam (hst).

c. Luas daun (cm²)

Luas daun pertanaman diamati pada umur 44 hari setelah tanam dengan menggunakan aplikasi digital pengukuran luas daun Image J pada daun trifoliolate ke-3, 4 dan ke-6 pada area tengah daun dari seluruh daun tanaman destruktif pada akhir fase generatif.

d. Jumlah klorofil (unit)

Jumlah klorofil dilakukan pada bagian tengah daun menggunakan alat klorofil meter pada umur 44 hari setelah tanam.

e. Panjang akar (cm)

Pengukuran panjang akar dilakukan pada akar terpanjang tanaman kedelai yang telah dibersihkan pada umur 50 hari setelah tanam.

f. Bobot basah brangkasan (gram)

Bobot basah brangkasan dilakukan pada umur 50 hari setelah tanam yaitu dengan cara menimbang seluruh bagian tanaman.

g. Bobot kering brangkasan (gram)

Penimbangan bobot kering brangkasan dilakukan pada 50 hari setelah tanam dengan menimbang bobot kering tajuk, akar dan total brangkasan setelah brangkasan dikeringkan menggunakan oven bersuhu 50°C selama 48 jam (setelah diperoleh bobot yang konstan).

h. Nisbah pupus akar

Nisbah Pupus Akar diukur pada 50 hari setelah tanam dengan cara membandingkan bobot kering bagian atas tanaman dan bagian akar tanaman.

$$NPA = \frac{Wa}{Wb}$$

Keterangan : Wa = bobot kering bagian atas tanaman

Wb = bobot kering bagian akar tanaman

i. Jumlah bintil akar efektif dan tidak efektif

Penghitungan jumlah bintil akar efektif dilakukan pada 50 hari setelah tanam, dengan ciri bintil akar efektif adalah masih segar dan berwarna merah.

Adapun parameter komponen hasil dan hasil kedelai yang diamati pada fase generatif adalah :

a. Jumlah polong per tanaman

Perhitungan jumlah polong dilakukan pada umur 70 hari setelah tanam atau seminggu sebelum panen dilakukan yaitu dengan menghitung jumlah polong yang bernas.

b. Jumlah biji per tanaman

Perhitungan jumlah biji per tanaman dilakukan pada umur panen yaitu pada saat polong sudah kering, daun menguning serta batang mengering.

c. Bobot biji per tanaman (gram)

Penimbangan dilakukan dengan menimbang biji kering dari masing-masing tanaman per perlakuan.

d. Bobot 100 biji kering (gram)

Penimbangan dilakukan dengan menimbang 100 biji kering dari masing-masing perlakuan.

Pengamatan komponen hasil dan hasil kedelai dilakukan menggunakan 4 tanaman sampel dari jumlah 6 tanaman per plot (2 tanaman digunakan untuk pengamatan bersifat destruktif yaitu bobot basah dan kering brangkasan, NPA dan jumlah bintil akar efektif dan non efektif).