

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di UPT Pengembangan Agrobisnis Tanaman Pangan dan Hortikultura Sidoarjo dan Laboratorium Mikrobiologi, Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga, Surabaya pada bulan Februari - Juni 2012.

3.2 Bahan dan Alat Penelitian

3.2.1 Bahan penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi : (1) enam isolat spesies mikroba yaitu *Rhizobium sp.*, *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas sp.*, *Cellulomonas sp.*, *Saccaromyces cereviceae*, serta *Lactobacillus sp.* (diperoleh dari koleksi Laboratorium Mikrobiologi, Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga, Surabaya), (2) biji tanaman kacang tanah (*Arachis hypogaea*) dengan varietas BISON yang diperoleh dari Balai Penelitian Palawija Malang, Jawa Timur, (3) media untuk menumbuhkan tiap-tiap mikroba menggunakan NA (*Nutrient Agar*), (4) starter untuk tiap-tiap mikroba menggunakan NB (*Nutrient Broth*) + glukosa 1% (5) media untuk *quality control* pupuk hayati menggunakan MSA (*Mannitol Salt Agar*), Pikovskaya, CMC (*Carboxyl Methyl Cellulose*), MRSA (*Mannitol Rogosa Sharpe Agar*), PDA (*Potato Dextrose Agar*) (6) media untuk produksi keenam mikroba menggunakan

Molase 2% (7) tanah, (8) kompos, (9) furadan, (10) kapas, (11) akuades, (12) aluminium foil .

3.2.2 Alat penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi : pensil, bulpen, kertas label, *polybag*, cetok, sprayer, gunting, timbangan analitik, timbangan digital, gelas ukur, erlenmeyer, pengaduk, cawan petri, autoklaf, spektrofotometer, tabung reaksi dan rak tabung reaksi, gelas beker, pipet tetes, pipet ukur, bunsen, aluminium foil, kompor listrik, panci, jurigen, plastik.

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Rancangan penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental dengan rancangan faktorial 3 x 4 sehingga ada 12 perlakuan dengan 3 kali pengulangan dimana tiap ulangan terdiri dari 1 tanaman per*polybag*. Perlakuan yang diberikan terdiri atas dua faktor. Faktor pertama adalah frekuensi pemberian pupuk hayati yaitu F1 (1 kali pemberian pupuk, pada awal masa tanam), F2 (2 kali pemberian pupuk, diberikan pada saat tanaman berumur 21 hari setelah tanam dan 35 hari setelah tanam), F3 (3 kali pemberian pupuk, diberikan pada saat tanaman berumur 10 hari setelah tanam, 20 hari setelah tanam, dan 30 hari setelah tanam). Faktor yang kedua adalah konsentrasi pupuk hayati yaitu K0 (tanpa pupuk kimia dan pupuk hayati), K1 (dengan pupuk kimia), K5 (5 mL pupuk hayati/tanaman), K10 (10 mL pupuk hayati/tanaman) dimana tiap 1 mL mengandung mikroba 10^6 sel mikroba.

Pengamatan dilakukan pada pertumbuhan tanaman (berat basah tanaman (g), serta berat basah bintil akar (g)) dan hasil produksi tanaman (berat kering polong tanaman (g) dan berat kering biji tanaman (g)). Jenis perlakuan diperlihatkan pada tabel berikut.

Tabel 3.1 Rancangan Penelitian

Frekuensi	Konsentrasi			
	K0	K1	K5	K10
F1	F1K0	F1K1	F1K5	FIK10
F2	F2K0	F2K1	F2K5	F2K10
F3	F3K0	F3K1	F3K5	F3K10

Keterangan :

- F1 : Frekuensi pemberian pupuk sebanyak 1 kali (awal masa tanam)
 F2 : Frekuensi pemberian pupuk sebanyak 2 kali (diberikan pada saat tanaman berumur 21 hari setelah tanam dan 35 hari setelah tanam)
 F3 : Frekuensi pemberian pupuk sebanyak 3 kali (diberikan pada saat tanaman berumur 10 hari setelah tanam, 20 hari setelah tanam, dan 30 hari setelah tanam).
 K0 : Tanpa pemberian pupuk kimia dan pupuk hayati (kontrol negatif)
 K1 : Dengan pemberian pupuk kimia (kontrol positif)
 K5 : Konsentrasi pemberian pupuk hayati sebanyak 5 mL/ tanaman
 K10 : Konsentrasi pemberian pupuk hayati sebanyak 10 mL/ tanaman

3.3.2 Variabel penelitian

Variabel yang diamati dari penelitian ini antara lain :

1. Variabel bebas : Frekuensi pemberian pupuk, konsentrasi pupuk (mL), dan interaksi antara frekuensi dan konsentrasi pupuk yang diberikan pada tanaman kacang tanah (mL).
2. Variabel terikatnya : Pertumbuhan (berat basah tanaman (g), dan berat basah bintil akar (g)) dan hasil produksi (berat

kering polong tanaman (g) dan berat kering biji tanaman (g).

3. Variabel terkontrol : Varietas tanaman kacang tanah (*Arachis hypogaea*), jenis media tanam.

3.4 Cara Kerja

Cara kerja yang dilakukan dalam penelitian ini dibagi dalam beberapa tahap sebagai berikut:

3.4.1 Tahap pembuatan stok mikroba dan starter mikroba

1. Pembuatan stok mikroba dilakukan dengan menyiapkan media NA (*Nutrient Agar*) miring. Media tersebut dibuat dengan cara dilarutkan dengan akuades kemudian dipanaskan sampai mendidih. Selanjutnya media tersebut dituang sebanyak 5 mL ke dalam tabung reaksi dan disterilkan dengan autoklaf (121°C selama 15 menit). Kemudian media tersebut dimiringkan. Biakan masing-masing mikroba diinokulasikan bila media agar tersebut telah dingin dan memadat.
2. Pembuatan starter mikroba dilakukan dengan cara menyiapkan kultur mikroba dalam media *broth* dengan komposisi NB (*Nutrient Broth*) + glukosa 1% sebanyak 100 mL dalam 6 tabung Erlenmeyer. Biakan murni ditumbuhkan dengan mengambil dua ose (dari agar miring), kemudian dimasukkan dalam media *broth* yang dilakukan secara aseptik dan diinkubasi pada suhu ruang selama 2 hari.

3. Setelah diinkubasi selama 2 hari, jumlah mikroba pada media *Nutrient Broth* (NB) dihitung menggunakan metode *Total Plate Count* (TPC). Suspensi mikroba dengan jumlah mikroba 10^6 diukur OD (*Optical Density*) menggunakan spektrofotometer dengan 600 nm. OD suspensi mikroba sebesar 0,5 dengan jumlah mikroba 10^6 kemudian digunakan untuk mengukur suspensi mikroba yang lain.

3.4.2 Tahap pencampuran masing-masing inokulum mikroba dalam media produksi

1. Pembuatan media produksi mikroba dilakukan dengan cara menyiapkan akuades dengan kandungan molase 2%
2. Starter mikroba diinokulasi sebanyak 100 mL dari masing-masing starter ke dalam 6 L akuades dengan kandungan molase 2% yang dilakukan secara aseptik.
3. Media molase tersebut kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 2 hari.

3.4.3 Tahap uji *quality control* produk pupuk hayati

1. Masing-masing mikroba dari media molase diambil sebanyak 10 mL untuk disuspensikan dalam 90 mL larutan garam fisiologis steril, kemudian dilakukan pengenceran serial dengan menggunakan 9 mL garam fisiologis steril 10^{-5} .
2. Suspensi tersebut kemudian diinokulasikan ke dalam medium dari masing-masing jenis mikroba. Untuk mikroba *Rhizobium* menggunakan media

MSA (*Mannitol Salt Agar*), untuk mikroba pelarut fosfat (*Pseudomonas sp.* dan *Bacillus megaterium*) menggunakan media Pikovskaya, untuk mikroba *Cellulomonas sp.* menggunakan media CMC (*Carboxyl Methyl Cellulose*), untuk mikroba *Lactobacillus sp.* menggunakan media MRSA (*Mannitol Rogosa Sharpe Agar*), untuk mikroba *Saccaromyces sp.* menggunakan media PDA (*Potato Dextrose Agar*).

3. Pertumbuhan koloni diamati dan perhitungan populasinya berdasarkan metode TPC (*Total Plate Count*) dengan jumlah mikroba tiap 1 mL suspensi mikroba sebanyak 10^6 setelah diinkubasi selama 6 hari.

3.4.4 Tahap pemilihan bibit kacang tanah yang baik

1. Berasal dari tanaman yang baru dan varietas unggul.
2. Daya tumbuh yang tinggi (lebih dari 90%) dan sehat.
3. Kulit benih mengkilap, tidak keriput dan cacat.
4. Murni atau tidak tercampur dengan varietas lain.
5. Kadar air benih berkisar 9-12 %.

3.4.5 Tahap persiapan tanah

1. Menyiapkan tanah dan pupuk kompos.
2. Tanah dan pupuk kompos dicampur menggunakan cetok dengan perbandingan masing-masing 4:1.
3. Campuran tanah dan kompos tersebut dimasukkan ke dalam *polybag* \pm 15 kg tiap *polybag*.

3.4.6 Tahap penanaman dan pemberian pupuk terhadap tanaman kacang tanah

Cara pemberian pupuk :

1. Tanah dimasukkan ke dalam 36 buah *polybag* sebanyak 15 kg per*polybag*.
2. Tanah disiram sampai keadaanya lembab.
3. Tanah dalam *polybag* dilubangi \pm 5 cm dari permukaan tanah untuk tempat menanam biji kacang tanah.
4. Biji kacang tanah ditanam pada lubang tanah di *polybag*, masing-masing 3 biji untuk tiap *polybag*.
5. Biji-biji tersebut ditutup dengan tanah, untuk perlakuan pemberian pupuk dengan frekuensi 1 kali diberikan setelah biji ditanam, pupuk hayati diberikan sebanyak 5 mL dan 10 mL per tanaman, untuk perlakuan K5 dan K10.
6. Sedangkan untuk perlakuan kontrol negatif, biji yang telah ditanam hanya disiram dengan air (K0), dan untuk perlakuan kontrol positif, diberi pupuk kimia (K1).
7. Setelah tanaman berumur 2 minggu, dalam satu *polybag* dipilih tanaman yang pertumbuhannya baik sedangkan tanaman yang pertumbuhannya kurang baik dimatikan dengan cara dibenamkan ke dalam tanah.
8. Banyaknya frekuensi pupuk hayati untuk 2 kali pemberian dilakukan pada saat biji telah berumur 21 hari setelah tanam dan 35 hari setelah tanam, untuk frekuensi 3 kali pemberian dilakukan pada saat biji berumur 10 hari setelah tanam, 20 hari setelah tanam, dan 30 hari setelah tanam.

3.4.7 Tahap pemeliharaan tanaman

1. Penyiangan

Penyiangan dilakukan untuk menghindari hama dan penyakit tanaman. Juga agar tanaman yang ditanam tidak bersaing dengan tanaman liar (gulma).

2. Pengairan dan penyiraman

Pengairan dilakukan agar tanah tetap lembab. Pada saat tanaman berbunga tidak dilakukan penyiraman, karena dapat mengganggu penyerbukan.

3. Pemeliharaan lain

Hal-hal lain yang sangat menunjang faktor pemeliharaan bisa dilakukan, misalnya, perambatan, pemeliharaan tunas dan bunga serta sanitasi lingkungan lahan (dijaga agar menunjang kesehatan tanaman).

3.5 Pengamatan

Parameter yang diamati

1. Berat basah tanaman (g)

Seluruh bagian tanaman ditimbang dengan menggunakan timbangan digital, hal ini dilakukan pada saat panen.

2. Berat basah bintil akar (g)

Bintil akar tanaman dipisahkan dengan akar tanaman, kemudian ditimbang menggunakan timbangan analitik. Hal ini dilakukan pada saat panen.

3. Berat kering polong tanaman (g)

Polong tanaman dipisahkan dari akar tanaman, kemudian dikeringkan dibawah sinar matahari selama \pm 3 hari, setelah itu ditimbang menggunakan timbangan digital. Hal ini dilakukan pada saat panen.

4. Berat kering biji tanaman (g)

Biji tanaman dipisahkan dari kulitnya, hanya disisakan bijinya saja setelah diukur berat kering polong tanamannya. Biji ditimbang dengan teliti menggunakan timbangan analitik. Hal ini dilakukan pada saat panen.

3.6 Uji Efektivitas Pupuk Hayati / RAE (*Relatif Agronomic Effectiveness*)

Keefektifan pupuk hayati didasarkan pada peningkatan pertumbuhan tanaman pada fase vegetatif, hasil panen, atau kualitas hasil yang diperoleh dibandingkan dengan perlakuan lain. Uji efektivitas pupuk menurut Saraswati (2008), dilakukan untuk mengetahui pengaruh pupuk hayati yang diberikan terhadap tanaman, dengan menggunakan rumus :

$$\frac{\text{Produksi pupuk hayati} - \text{Produksi kontrol (-)}}{\text{Produksi pupuk kimia} - \text{Produksi kontrol (-)}} \times 100\%$$

- Jika hasil yang diperoleh lebih besar ($>$) dari 100%, maka pupuk hayati terbukti efektif untuk digunakan.
- Jika hasil yang diperoleh sama dengan ($=$) 100%, maka pupuk hayati sama efektifnya dengan pupuk kimia.
- Jika hasil yang diperoleh lebih kecil ($<$) dari 100%, maka pupuk hayati tidak efektif untuk digunakan.

3.7 Analisis Data

Data yang diperoleh berupa berat basah tanaman, berat basah bintil akar tanaman, berat kering polong tanaman dan berat kering biji tanaman yang diperoleh pada saat panen diuji normalitas dan homogenitas. Apabila data normal dan homogen maka data dianalisis secara statistik menggunakan uji *ANOVA* (*Analysis of Variance 2 way*) dengan derajat signifikansi 0,05, jika ada beda hasil yang signifikan antar perlakuan maka dilanjutkan dengan uji *Duncan* dengan derajat signifikansi 0,05. Sedangkan untuk data yang tidak normal dan tidak homogen dianalisis menggunakan uji *Kruskal-Wallis* dengan derajat signifikansi 0,05, jika ada beda hasil yang signifikan maka dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney*.