

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### 3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga dan penanaman tomat dilakukan di rumah kaca (*Greenhouse*) UPT Pengembangan Agribisnis Tanaman Pangan dan Hortikultura, Lebo, Sidoarjo, selama 6 bulan pada bulan Januari sampai Juni 2012.

#### 3.2 Bahan dan Alat

##### 3.2.1 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

1. Bibit tanaman tomat varietas Idaman yang diproduksi oleh Diamond Seed Indonesia, Yogyakarta dan diperoleh dari UPT Pengembangan Agribisnis Tanaman Pangan dan Hortikultura, Lebo, Sidoarjo.
2. Mikroba campuran pupuk hayati (*Biofertilizer*) terdiri atas konsorsium bakteri fiksasi Nitrogen non simbiotik (*Azotobacter sp* dan *Azospirillum sp.*): bakteri fiksasi Nitrogen simbiotik *Rhizobium sp.*; konsorsium bakteri pelarut Fosfat (*Bacillus megaterium* dan *Pseudomonas sp.*): bakteri pelarut Fosfat *Bacillus subtilis*; mikroba dekomposer *Cellulomonas sp.*, *Lactobacillus sp.*, dan *Saccharomyces cereviceae* yang merupakan koleksi Laboratorium Mikrobiologi, Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga.

### 3. Bahan kimia

#### a. Media dasar pertumbuhan bakteri

Media dasar pertumbuhan bakteri yang digunakan adalah *Nutrient Broth* (NB).

#### b. Sumber karbon

Sumber karbon yang digunakan untuk kultur bakteri adalah glukosa.

#### c. Media untuk uji kualitas pupuk hayati (*biofertilizer*)

Media untuk uji kualitas pupuk hayati (*biofertilizer*) yang digunakan adalah *Nitrogen Fixing Bacteria* (NFB) semi solid, *Carboxil Methyl Cellulose* (CMC) agar, *Mannitol Salt Agar* (MSA), *Mannitol Rhogasa Sharpe Agar* (MRSA), *Pikovskaya Agar*, dan *Potato Dekstrose Agar* (PDA).

#### d. Pupuk kimia (pupuk NPK) yang diperoleh dari UPT Pengembangan Agribisnis Tanaman Pangan dan Hortikultura, Lebo, Sidoarjo

### 4. Media tanam

Media tanam yang digunakan adalah tanah sawah yang berasal dari kecamatan Bangil, Pasuruan dan kompos yang diperoleh dari Rumah Kompos Bratang Surabaya Dinas Kebersihan dan Pertamanan Surabaya.

### 5. Akuades, molase, dan air.

### 3.2.2 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

1. Alat untuk pembuatan pupuk hayati (*biofertilizer*) menggunakan *autoclave* Ogawa Seiki, timbangan digital, kompor listrik, *shaker*, *Laminar Air Flow* (LAF) ESCO, *magnetic stirrer Cimeric*, *oven*, botol kultur, spatula, pipet *volume* , gelas *beaker*, bunsen, korek api, jarum ose, gelas ukur, tabung *erlenmeyer*, cawan petri, tabung reaksi, rak tabung reaksi, *aluminium foil*, kapas, spiritus, alkohol , selotip, kertas koran, kertas label, dan jerigen.
2. Alat untuk persiapan media tanam, yaitu *polybag* ukuran 35 x 17.5 cm, *thermometer*, *soil tester*, dan sekrup .
3. Alat untuk pemberian pupuk hayati (*biofertilizer*) ke tanaman tomat menggunakan gelas ukur 100 ml, pipet ukur 10 ml, *pipetor*.
4. Alat untuk pengukuran pertumbuhan dan produktivitas tanaman tomat menggunakan penggaris, timbangan digital, dan alat tulis.

### 3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium dan lapangan yang menggunakan Rancangan Acak Lengkap Pola Faktorial 2x5 dengan tiga kali pengulangan. Faktor perlakuan pertama adalah dosis pupuk (D) yang terdiri dari D<sub>0</sub>, D<sub>a</sub>, D<sub>5</sub>, D<sub>10</sub>, dan D<sub>15</sub>. D<sub>0</sub> merupakan perlakuan tanpa pemberian pupuk, D<sub>a</sub> merupakan pemberian pupuk kimia NPK pada dosis 10 g/tanaman, D<sub>5</sub> merupakan pemberian pupuk hayati (*biofertilizer*) pada dosis 5 ml/tanaman, D<sub>10</sub> merupakan pemberian pupuk hayati (*biofertilizer*) pada dosis 10

ml/tanaman, dan  $D_{15}$  merupakan pemberian pupuk hayati (*biofertilizer*) pada dosis 15 ml/tanaman. Faktor kedua adalah media tanam yang terdiri dari  $M_1$  (tanah) dan  $M_2$  (campuran tanah : kompos = 1:1). Kombinasi perlakuan penelitian dapat dilihat pada tabel 3.1.

Tabel 3.1 Kombinasi perlakuan penelitian

Media tanam	Dosis pupuk (ml/tanaman)				
	$D_0$	$D_a$	$D_5$	$D_{10}$	$D_{15}$
$M_1$	$M_1D_0$	$M_1D_a$	$M_1D_5$	$M_1D_{10}$	$M_1D_{15}$
$M_2$	$M_2D_0$	$M_2D_a$	$M_2D_5$	$M_2D_{10}$	$M_2D_{15}$

Keterangan :

$M_1$  : Media tanah

$M_2$  : Campuran media tanah dan kompos (1:1)

$D_0$  : Tanpa pemupukan

$D_a$  : Dosis pupuk kimia NPK 10 g/tanaman

$D_5$  : Dosis pupuk hayati (*Biofertilizer*) 5 ml/tanaman

$D_{10}$  : Dosis pupuk hayati (*Biofertilizer*) 10 ml/tanaman

$D_{15}$  : Dosis pupuk hayati (*Biofertilizer*) 15 ml/tanaman

### 3.4 Variabel Penelitian

Variabel penelitian meliputi:

- variabel bebas : dosis *biofertilizer* (ml), media tanam, dan kombinasi dosis *biofertilizer* (ml) dengan media tanam.
- variabel terikat : tinggi tanaman (cm), jumlah daun (helai), jumlah buah (buah), dan berat buah (g).
- variabel kendali : varietas tanaman tomat, interval pemupukan, perlakuan pada *polybag*, interval penyiraman air.

### 3.5 Prosedur Penelitian

#### 3.5.1 Pembuatan pupuk hayati (*biofertilizer*)

Pembuatan pupuk hayati (*Biofertilizer*) diawali dengan pembuatan media pertumbuhan dengan cara memasukan 5,6 g media *Nutrient Broth* (NB) ke dalam 700 ml aquades kemudian diaduk hingga terlarut sempurna di dalam *erlenmeyer*, kemudian memasukkan 7 g glukosa ke dalam *erlenmeyer* tersebut dan diaduk kembali hingga terlarut sempurna. Kemudian, menuangkan media masing-masing 100 ml ke dalam 7 botol kultur. Setelah itu, masing-masing botol kultur di tutup dengan kapas dan aluminium foil kemudian di sterilisasi di dalam *autoclave* (1 atm, 121<sup>o</sup> C, 20 menit). Setelah media steril dan suhu tidak terlalu panas, masing-masing inokulan yang terdiri atas : (1) konsorsium bakteri fiksasi Nitrogen non simbiotik (*Azotobacter sp.* dan *Azospirillum sp.*); (2) bakteri fiksasi Nitrogen simbiotik *Rhizobium sp.*; (3) konsorsium bakteri pelarut Fosfat (*Bacillus megaterium* dan *Pseudomonas sp.*); (4) bakteri pelarut Fosfat *Bacillus subtilis*; (5) mikroba dekomposer *Cellulomonas sp.*; (6) mikroba dekomposer *Lactobacillus sp.*; dan (7) mikroba dekomposer *Saccharomyces cereviceae*, ditanam pada masing-masing media, kemudian diinkubasi selama 24 jam. Selanjutnya, starter pupuk yang sudah diinkubasi selama 24 jam, dimasukkan ke dalam jerigen yang sudah terlebih dahulu diisi dengan larutan molase 2% sebanyak 6,3 L. Campuran di dalam jerigen dihomogenkan dan diinkubasi selama 24 jam untuk selanjutnya dilakukan uji kualitas pupuk.

### 3.5.2 Uji Kualitas Pupuk Hayati (*Biofertilizer*)

#### 3.5.2.1 Pembuatan media untuk uji kualitas pupuk hayati (*Biofertilizer*)

##### 1. Media *Potato Dekstrose Agar* (PDA)

Memasukkan 3,9 g media *Potato Dekstore Agar* (PDA) ke dalam 100 ml aquades kemudian diaduk hingga terlarut sempurna di dalam *erlenmeyer*. Selanjutnya media dipanaskan di atas kompor listrik. Setelah itu, *erlenmeyer* di tutup dengan kapas dan aluminium foil dan disterilisasi di dalam *autoclave* ( $121^{\circ}\text{C}$ , 1 atm, 20 menit).

##### 2. Media *Nitrogen Fixing Bacteria* (NFB)

Memasukkan secara satu persatu 0,5 g asam malat; 0,4 g KOH; 0,05 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 0,005 g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,01 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,001 g  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,002 g NaCl; 0,002 g  $\text{CaCl}_2$ ; 0,001 g  $\text{N}_2\text{M}_2\text{O}_2$ ; 0,2 ml BTB, dan 0,17 g Bacto agar ke dalam 100 ml aquades di atas *magnetic stirrer*. Selanjutnya media dipanaskan di atas kompor listrik. Setelah itu, 7 ml media dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 9 buah, kemudian di tutup dengan kapas dan aluminium foil dan siap disterilisasi di dalam *autoclave* ( $121^{\circ}\text{C}$ , 1 atm, 20 menit).

##### 3. Media *Mannitol Salt Agar* (MSA)

Memasukkan 11,1 g media *Mannitol Salt Agar* (MSA) ke dalam 100 ml aquades kemudian diaduk hingga terlarut sempurna di dalam *erlenmeyer*. Selanjutnya media dipanaskan di atas kompor listrik. Setelah itu, *erlenmeyer*

di tutup dengan kapas dan aluminium foil dan siap disterilisasi di dalam *autoclave* ( $121^{\circ}\text{C}$ , 1 atm, 20 menit).

#### **4. Media *Carboxyl Methyl Cellulose* (CMC) agar**

Memasukkan secara satu persatu 0,1 g  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ; 0,2 g NaCl; 1 g selulosa, dan 1 g agar ke dalam 100 ml aquades di atas *magnetic stirrer*. Selanjutnya media dipanaskan di atas kompor listrik. Setelah itu, erlenmeyer di tutup dengan kapas dan aluminium foil dan siap disterilisasi di dalam *autoclave* ( $121^{\circ}\text{C}$ , 1 atm, 20 menit).

#### **5. Media *Mannitol Rhogasa Sharpe Agar* (MRSA)**

Memasukkan secara satu persatu 2 g MRS, 2 g glukosa, 1,5 g yeast ekstrak, dan 1,7 g agar ke dalam 100 ml aquades di atas *magnetic stirrer* kemudian diaduk hingga terlarut sempurna di dalam erlenmeyer. Selanjutnya media dipanaskan di atas kompor listrik. Setelah itu, erlenmeyer di tutup dengan kapas dan aluminium foil dan siap disterilisasi di dalam *autoclave* ( $121^{\circ}\text{C}$ , 1 atm, 20 menit).

#### **6. Media *Pikovskaya Agar***

Memasukkan secara satu persatu 0,5 g  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{O}_4$ , 0,05 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 0,02 g NaCl; 0,02 g KCl; 0,02 g  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,25 g  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 0,25 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,25 g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,05 g  $(\text{NH}_4)_3\text{O}_4$ ; 1 g glukosa, dan 1,5 g agar ke dalam 100 ml aquades di atas *magnetic stirrer*. Selanjutnya media dipanaskan di atas kompor listrik. Setelah itu, erlenmeyer di tutup dengan kapas dan aluminium foil dan siap disterilisasi di dalam *autoclave* ( $121^{\circ}\text{C}$ , 1 atm, 20 menit).

### 3.5.2.2 Metode uji kualitas pupuk hayati (*biofertilizer*)

1. Sebanyak 25 ml pupuk hayati (*Biofertilizer*) dimasukkan ke dalam 225 ml akuades steril sebagai pengenceran pertama ( $10^{-1}$ ), kemudian dihomogenkan. Dilanjutkan dengan pengenceran  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  dan  $10^{-7}$ . Sampel pada pengenceran  $10^{-6}$  dan  $10^{-7}$  lah yang akan diuji kualitasnya.
2. Untuk mengetahui jumlah bakteri fiksasi nitrogen digunakan metode MPN pada media NFB. Sebanyak 10 ml sampel dimasukan ke dalam 3 tabung reaksi pertama, 1 ml sampel dimasukan ke dalam 3 tabung reaksi kedua, dan 0,1 ml sampel dimasukan ke dalam 3 tabung reaksi ketiga. Kemudian diinkubasi selama 5-7 hari. Uji positif ditandai dengan terbentuknya cincin putih (*pelicle*) pada permukaan media. Jumlah tabung reaksi yang positif kemudian dicocokkan pada tabel MPN untuk mengetahui jumlah mikroba.
3. Untuk mengetahui jumlah bakteri pelarut fosfat digunakan metode TPC pada media pikovskaya agar. Sebanyak 1 ml sampel dimasukkan ke dalam cawan petri, kemudian 15 ml media dituangkan ke dalam cawan petri dan diinkubasi selama 3 hari. Uji positif ditandai dengan terbentuknya zona halo di sekitar koloni.
4. Untuk mengetahui jumlah bakteri *Rhizobium sp.* digunakan metode TPC pada media MSA. Sebanyak 1 ml sampel dimasukkan ke dalam cawan petri, kemudian 15 ml media dituangkan ke dalam cawan petri dan diinkubasi selama 3 hari. Koloni yang diamati adalah koloni yang



berbentuk bulat, elevasi cembung, agak tembus cahaya, berwarna putih susu, dan berwarna kuning di sekitar koloni.

5. Untuk mengetahui jumlah *Saccharomyces sp.*, sebanyak 1 ml sampel dimasukkan ke dalam cawan petri yang berisi 1 ml kloramfenikol, kemudian 15 ml media PDA dituangkan ke dalam cawan petri tersebut dan diinkubasi selama 5 hari. Uji positif ditandai dengan terbentuknya koloni berbentuk bulat, seperti tetes susu, berwarna putih agak krem, dan berbau khas seperti tape.
6. Untuk mengetahui jumlah bakteri *Lactobacillus sp.* digunakan metode TPC pada media MRSA. Sebanyak 1 ml sampel dimasukkan ke dalam cawan petri, kemudian 15 ml media dituangkan ke dalam cawan petri dan diinkubasi selama 3 hari. Koloni yang diamati adalah yang berbentuk bulat dan berwarna putih kekuningan.
7. Untuk mengetahui jumlah bakteri *Cellulomonas sp.* digunakan metode TPC pada media CMC agar. Sebanyak 1 ml sampel dimasukkan ke dalam cawan petri, kemudian 15 ml media dituangkan ke dalam cawan petri dan diinkubasi selama 3 hari. Uji positif ditandai dengan terbentuknya zona halo di sekitar koloni.

Kualitas pupuk hayati (*Biofertilizer*) dikatakan baik jika masing-masing bakteri yang dianalisis memiliki jumlah  $\geq 10^6$  CFU/ ml dan yeast yang dianalisis memiliki jumlah  $\geq 10^4$  propagul/ ml (Saraswati dkk., 2008).

### 3.5.3 Pemberian Pupuk Hayati (*Biofertilizer*)

Pemberian pupuk hayati (*Biofertilizer*) diberikan pada tanaman tomat dengan cara disemprotkan pada media tanam dengan dosis 5 ml, 10 ml, dan 15 ml tiap tanaman, sedangkan pemberian pupuk kimia NPK dengan dosis 10 g/tanaman diberikan dengan cara ditaburkan pada media tanam. Masing-masing diberikan 4 kali pemupukan, yaitu pemupukan I pada 3 hari sebelum penanaman bibit (*transplanting*), pemupukan II pada usia 7 hari setelah penanaman bibit (*transplanting*), pemupukan susulan III pada usia 30 hari setelah penanaman bibit (*transplanting*), pemupukan susulan IV pada usia tanaman 70 hari setelah *transplanting* (Susila, 2006).

### 3.5.4 Penyiapan *Polybag*

*Polybag* yang digunakan adalah *polybag* plastik ukuran 35 x 17.5 cm. *Polybag* dibagi menjadi dua perlakuan, yaitu perlakuan satu dan perlakuan dua. Pada perlakuan satu, *polybag* diisi dengan tanah saja, sedangkan pada perlakuan dua, *polybag* diisi dengan campuran tanah dan kompos (1:1). *Polybag* diisi dengan media tanam, jarak antara media tanam dengan permukaan *polybag* berkisar 5 cm, semua *polybag* yang berisi media tanam disiram dengan air secukupnya sehari sebelum penanaman bibit.

### 3.5.5 Penanaman Tanaman Tomat

Tahap penanaman tanaman tomat adalah sebagai berikut :

1. Pemilihan bibit. Bibit yang dipilih adalah bibit yang sehat, bebas dari segala jenis penyakit, dan sudah memiliki 4-6 buah daun.
2. Memindahkan bibit ke dalam media tanam pada *polybag* yang sudah disiapkan dengan hati-hati.

### 3.5.6 Pemeliharaan Tanaman Tomat

Pemeliharaan tanaman tomat terdiri atas :

1. Pengajiran  
Pengajiran dilakukan pada usia tanaman 50 hari. Ajir dibuat dari bambu 2 x 100 cm, ditancapkan 10 cm dari pohon, ditanamkan dalam tanah sedalam 20-30 cm.
2. Pewiwilan  
Dilakukan pada semua tunas di bawah cabang pertama, dilakukan pada usia tanaman 45 hari setelah tanam.
3. Pengendalian hama dan penyakit  
Pengendalian HPT dilakukan bila perlu saja dengan menggunakan insektisida dan fungisida.
4. Penyiangan  
Dilakukan secara manual yaitu 1 minggu sekali.
5. Pemupukan

Pemupukan dengan menggunakan pupuk hayati (*biofertilizer*) dilakukan pada dosis 5 ml/tanaman, 10 ml/tanaman, dan 15 ml/tanaman; dan menggunakan pupuk kimia NPK dengan dosis 10 g/tanaman (Cahyono, 2008). Pemupukan dilakukan sebanyak 4 kali yaitu yaitu pemupukan I pada 3 hari sebelum penanaman bibit (*transplanting*), pemupukan II pada usia 7 hari setelah penanaman bibit (*transplanting*), pemupukan susulan III pada usia 30 hari setelah penanaman bibit (*transplanting*), pemupukan susulan IV pada usia tanaman 70 hari setelah penanaman bibit (*transplanting*).

#### 6. Penyiraman

Dilakukan pada pagi atau sore hari, cukup sesuai kebutuhan.

### 3.5.7 Pemanenan Tanaman Tomat

Panen pertama tanaman tomat dapat dilakukan pada usia 80 hari setelah tanam (hst). Buah dipanen dengan ciri-ciri: kulit buah berubah dari warna hijau menjadi kuning/ jingga; bagian tepi daun tua telah mengering; batang menguning/ mengering. Pemetikan dilakukan pada pagi atau sore hari dan cuaca cerah (Purwati dan Khairunisa, 2007).

### 3.6 Prosedur Memperoleh Data

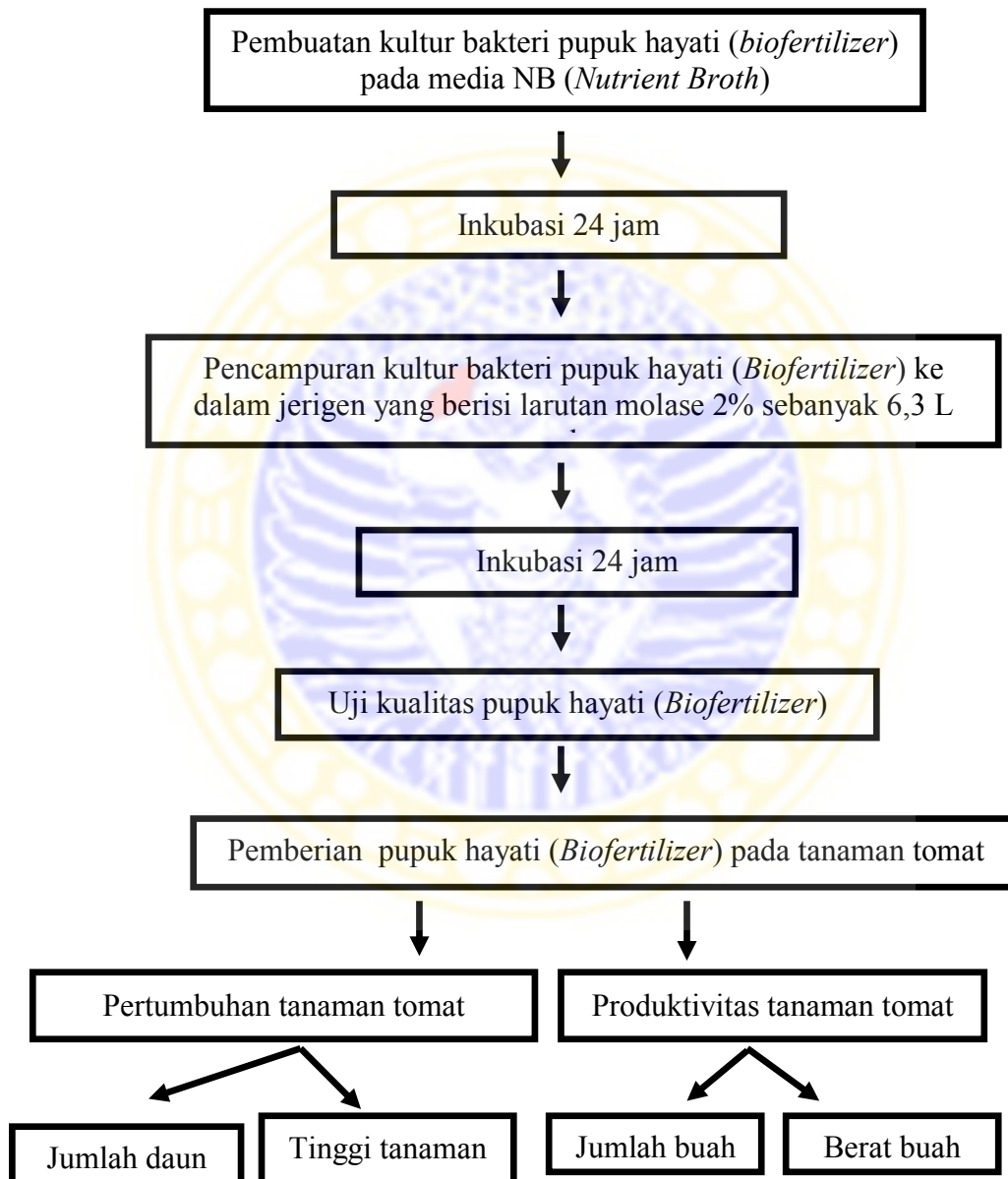
Untuk memperoleh data tinggi tanaman (cm), diukur dari pangkal batang sampai pada ujung tunas tertinggi dan pengukuran dilakukan setiap satu minggu. Jumlah daun (helai) dihitung dengan cara menjumlahkan semua daun yang ada

pada tanaman dan pengukuran dilakukan setiap satu minggu. Jumlah buah (buah) dihitung dengan cara menjumlahkan semua buah yang dihasilkan tiap tanaman. Berat buah (g) dihitung dengan cara menimbang semua buah yang dihasilkan tiap tanaman.

### 3.7 Analisis Data Penelitian

Data hasil pengamatan pengaruh dosis pupuk hayati (*biofertilizer*), pengaruh media tanam, dan pengaruh kombinasi dosis pupuk hayati (*biofertilizer*) dan media tanam terhadap tinggi tanaman (cm), jumlah daun, jumlah buah, dan berat buah (g) dianalisis secara statistik. Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan uji *Two-way Analysis of Varians* (ANOVA) dan uji *Independet-Samples T Test* dengan asumsi data berdistribusi normal. Uji *Duncan* dan uji *Tamhane* digunakan untuk melihat beda nyata antar perlakuan, dengan asumsi variansi data homogen untuk uji *Duncan* dan variansi data tidak homogen untuk uji *Tamhane*.

### 3.8 Skema Metode Penelitian



**Gambar 10 .** Skema metode pelaksanaan penelitian