

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di areal persawahan dusun Mojorejo kabupaten Madiun, Jawa Timur, sebagai tempat pembudidayaan kacang tanah dan Laboratorium Mikrobiologi, Departemen Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga, Surabaya, sebagai tempat pembuatan *biofertilizer*. Penelitian ini dilaksanakan selama enam bulan, mulai dari bulan Oktober 2011 sampai dengan bulan Maret 2012.

3.2. Bahan dan Alat Penelitian

3.2.1. Bahan penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

1. Benih kacang tanah

Benih kacang tanah (*Arachis hypogaea* L.) varietas kancil didapatkan dari petani setempat yang merupakan hasil panen sebelumnya dan memenuhi persyaratan benih yang baik.

2. *Biofertilizer*

Bahan yang digunakan untuk membuat *biofertilizer* adalah tujuh mikroba koleksi Laboratorium Mikrobiologi Departemen Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga Surabaya. Komposisi mikroba yang digunakan adalah: *Azotobacter chroococcum*, *Azospirillum brasilense*, *Bacillus megaterium*,

Rhizobium leguminosarum, *Pseudomonas fluorescens*, *Cellulomonas cellulans*, dan *Saccharomyces cerevisiae*. Identifikasi mikroba dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi FST Universitas Airlangga Surabaya. Media pertumbuhan yang digunakan adalah NB (*Nutrient Broth*), NA (*Nutrient Agar*), akuades, glukosa, molase, larutan garam fisiologis. Media yang digunakan untuk menghitung jumlah mikroba adalah Nfb (*Nitrogen free bromothymol blue* yang terdiri atas asam malat 0,5 g; KOH 0,4 g; K₂HPO₄ 0,05 g; FeSO₄ 0,005 g; MnSO₄ 0,001 g; MgSO₄ 0,01 g; NaCl 0,002 g; CaCl₂ 0,002 g; Na₂MoO₂ 0,001 g; bromotimol biru 0,5% larutan dalam alkohol 95% sebanyak 0,3 mL, *Bacto agar* 1,5 g serta 100 mL akuades), MSA (*Manitol Salt Agar*), media Pikovskaya (yang terdiri atas glukosa 0,5 g; Ca₃PO₄ 0,25 g; KCl 0,01 g; MgSO₄ 0,005 g; MnSO₄ 0,005 g; FeSO₄ 0,005 g; *yeast extract* 0,025 g; (NH₄)₂SO₄ 0,025 g; agar 0,75 g serta 50 mL akuades), CMCA (*Carboxy Methyl Cellulose Agar* yang terdiri NH₄NO₃ 0,05 g; NaCl 2,5 mL; selulosa 0,25 g; agar 0,25 g serta 50 mL akuades), PDA (*Potato Dextrose Agar*).

3. Bahan kimia

Bahan kimia yang digunakan adalah alkohol 70% dan spirtus yang digunakan untuk sterilisasi alat dan lingkungan kerja.

4. Pupuk kimia

Pupuk kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah urea dan pupuk SP 36 sedangkan insektisida yang digunakan bermerk *Marshal* yang diperoleh dari toko pertanian di daerah Caruban, kabupaten Madiun.

3.2.2. Alat penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah botol kultur, pipet volum, pipetor, otoklaf, erlemeyer, *vortex*, neraca analitik, kompor listrik, tabung reaksi, rak tabung reaksi, spatula, gelas beaker, jirigen 5 liter, gelas ukur 100 mL dan 1 L, *Laminar Air Flow* (LAF), *Colony Counter*, cawan petri, bunsen, ose, spektrofotometer, *cuvet*, *magnetic stirrer*, *water bath*, kapas, aluminium foil, *seal*/selotip, kertas coklat, label, kamera, cangkul, kayu yang bagian ujungnya lancip (*gejik*), gelas ukur 10 mL, alat penyemprot, ember plastik, *soil tester*, penggaris serta timbangan.

3.3. Prosedur Penelitian

3.3.1. Pembuatan *biofertilizer*

a. Peremajaan isolat

Peremajaan isolat dilakukan dengan cara membuat media NA dan PDA miring terlebih dahulu. Langkah selanjutnya adalah menginokulasikan masing-masing isolat murni bakteri secara aseptik pada setiap tabung reaksi yang berisi media NA miring, kemudian menginkubasi selama 1 hari pada suhu 37°C. Sedangkan untuk kultur murni *yeast* diinokulasi pada tabung reaksi yang berisi media PDA miring dan menginkubasi selama 7 hari pada suhu 37°C. Setelah koloni pada media NA miring dan PDA miring tumbuh, mengambil 2 ose dan menginokulasikannya pada media NB kemudian divortex dan menginkubasinya selama 5 hari. Setiap jenis mikroba diinokulasikan pada 100 mL media NB. Jika ada tujuh mikroba maka, dibutuhkan 700 mL media NB.

b. Pengukuran kekeruhan (*Optical Density*) dan penghitungan jumlah mikroba

Pengukuran kekeruhan mikroba dilakukan dengan mengambil setiap mikroba di media NB sebanyak 5 mL untuk diukur OD-nya dengan panjang gelombang 600 nm. Penghitungan jumlah mikroba dilakukan dengan parameter TPC (*Total Plate Count*) yaitu dengan cara mengambil 10 mL salah satu jenis isolat mikroba, mencampurnya dengan 90 mL larutan garam fisiologis (10^{-1}) dan menghomogenkannya. Kemudian mengambil 1 mL larutan dari seri pengenceran 10^{-1} dan memindahkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 mL larutan garam fisiologis, ini merupakan seri pengenceran kedua (10^{-2}), selanjutnya melakukan hal yang sama sampai seri pengenceran 10^{-8} . Beberapa seri pengenceran kemudian dituang di cawan petri. Kelompok bakteri dikultur dengan menggunakan media NA. Sedangkan *yeast* dikultur dengan menggunakan media PDA. Langkah selanjutnya adalah melakukan pengenceran dan *pour plate* beberapa seri pengenceran di cawan petri dari 6 isolat mikroba yang lain. Setelah mikroba tumbuh, menghitung jumlah koloni dengan persyaratan jumlah koloni mikroba yang tumbuh adalah 30-300 koloni/cawan.

c. Pencampuran mikroba

Pencampuran mikroba dilakukan dengan menyiapkan larutan molase 2% yaitu dengan cara memasukkan 80 mL molase ke dalam 3920 mL akuades, kemudian merebusnya sampai mendidih. Setelah dingin, memasukkan 700 mL suspensi mikroba pada media NB ke dalam larutan molase tersebut, mengaduknya hingga homogen kemudian menginkubasinya selama 2 hari.

d. Penghitungan jumlah mikroba

Penghitungan jumlah mikroba dilakukan dengan parameter TPC dengan menggunakan media yang berbeda. *Azotobacter chroococcum* dan *Azospirillum brasilense* menggunakan media Nfb. *Rhizobium leguminosarum* menggunakan media MSA. *Bacillus megaterium* dan *Pseudomonas fluorescens* menggunakan media Pikovskaya. *Cellulomonas cellulans* menggunakan media CMCA. *Saccharomyces cerevisiae* menggunakan media PDA.

e. Pengenceran *biofertilizer*

Pengenceran *biofertilizer* dilakukan dengan menambahkan 5 L *biofertilizer* pada 50 L air yang berkadar molase 3% kemudian menginkubasi selama minimal 3 hari sebelum digunakan untuk memupuk. Pupuk yang telah diencerkan ini nantinya langsung diambil dengan dosis sesuai perlakuan dan diberikan di rhizosfer kacang tanah.

3.3.2. Penanaman kacang tanah

a. Pemilihan benih

Pemilihan benih kacang tanah dilakukan dengan cara memilih benih yang berbentuk oval seperti telur, rata atau tidak keriput dan berasal dari tanaman yang baru dipanen. Langkah selanjutnya adalah menguji viabilitas benih dengan cara mengambil sampel sebanyak 100 benih kemudian mengecek sampel benih pada media kapas yang telah dibasahi dengan air dan menginkubasinya selama 48 jam. Bila lebih dari 80% benih berkecambah (Kanisius, 1989) maka, benih tersebut dapat digunakan dalam penelitian ini.

b. Persiapan lahan

Persiapan lahan dilakukan dengan mengukur lahan yang akan ditanami kacang tanah seluas 245 m² dan membersihkan lahan dari rumput. Kemudian lahan dicangkul dan sekaligus dibuat parit. Parit ini selanjutnya menjadi pemisah antara perlakuan satu dengan perlakuan lainnya. Bila pada saat pencangkulan ditemui sisa tanaman yang ditanam sebelumnya maka sisa tanaman ini ditanamkan ke dalam tanah (Kanisius, 1989).

c. Pengairan

Pengairan lahan dilakukan sampai parit terisi penuh air dan lahan yang akan ditanami kacang tanah telah basah.

d. Penanaman benih kacang tanah

Penanaman benih kacang tanah lebih baik dilakukan ketika pagi atau sore hari. Sebelum ditanam, benih kacang tanah direndam dalam air selama satu malam. Kemudian pagi harinya benih kacang tanah ditiriskan dan ditaburi dengan insektisida. Sebelum penanaman kacang tanah mengukur pH tanah terlebih dahulu dengan menggunakan *soil tester* dan mengambil sampel tanah yang nantinya akan dianalisis kadar airnya. Penanaman benih dilakukan dengan cara membuat lubang di tanah sedalam 3-5 cm dengan menggunakan kayu yang ujungnya lancip (*gejik*). Setiap lubang diisi dengan satu benih kacang tanah. Jarak tanam antara benih satu dengan benih lainnya adalah 20 cm.

e. Pemeliharaan tanaman

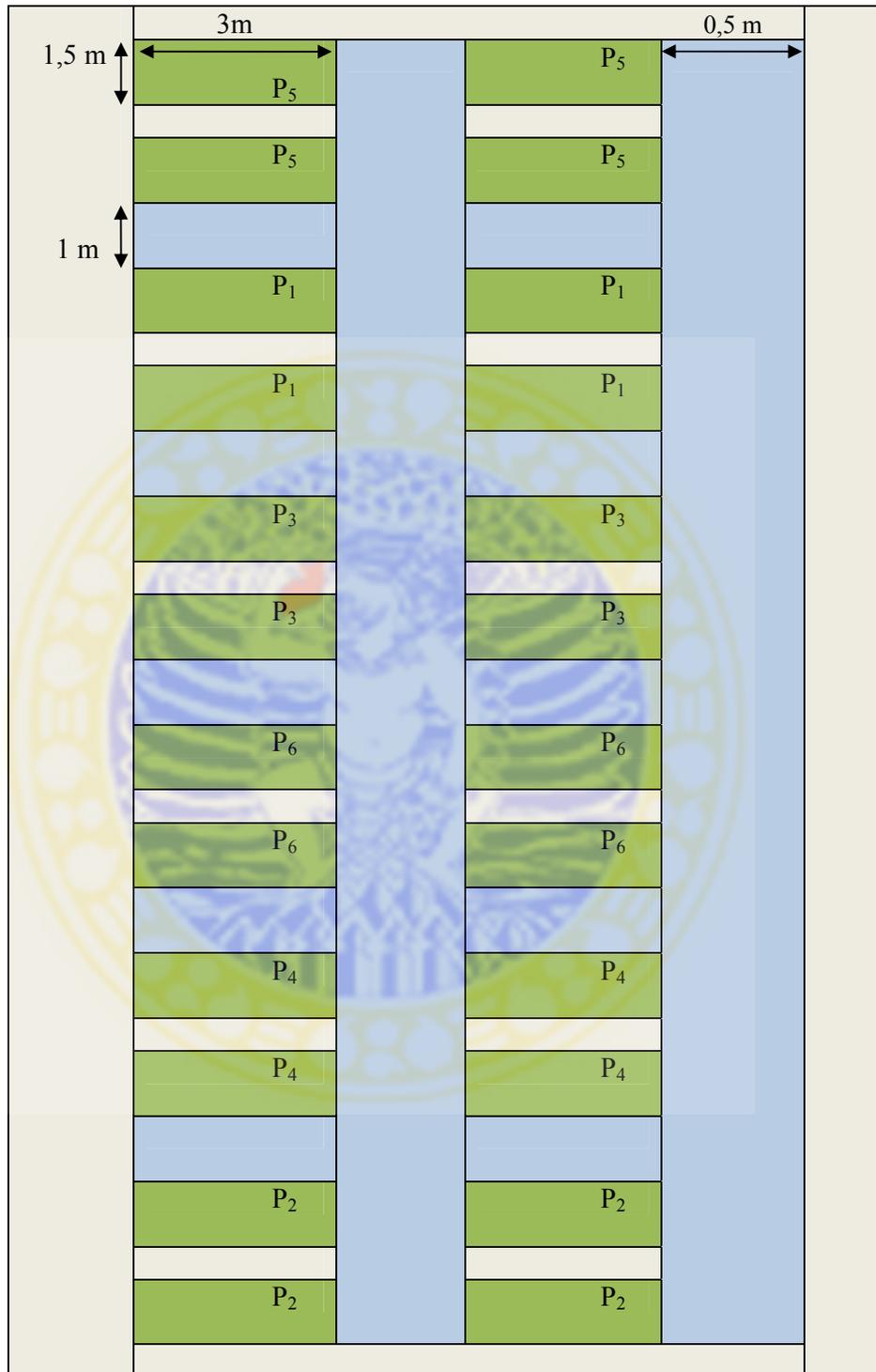
Pemeliharaan tanaman dilakukan dengan penyulaman yang dilakukan 3 hari setelah tanam. Penyiangkan dilakukan dengan mencabuti rumput ataupun

tumbuhan lain yang mengganggu pertumbuhan kacang tanah. Penyiangian dilakukan seminggu sekali selama 1 bulan pertama. Pembubunan dilakukan dengan cara mengumpulkan tanah di daerah barisan sehingga membentuk gundukan yang memanjang sepanjang barisan tanaman (Prihatman, 2000) dan dilakukan ketika tanaman berumur 1 bulan.

3.3.3. Perlakuan penelitian

Perlakuan pertama (P_1) adalah tidak memberikan perlakuan apapun pada tanaman (kontrol negatif). Perlakuan kedua (P_2) adalah memberikan pupuk kimia berupa urea dan pupuk SP 36 masing-masing sebanyak 20 mL per tanaman ketika tanaman berumur 2 minggu dengan cara dikururkan di sekitar tanaman. Perlakuan ketiga (P_3) adalah memberikan *biofertilizer* sebanyak 6 mL pada tanah tempat masing-masing kacang tanah tumbuh yang diberikan ketika tanaman berumur 2 minggu. Perlakuan keempat (P_4) adalah memberikan *biofertilizer* sebanyak 6 mL pada tanah di sekitar tempat yang akan ditanami kacang tanah dan memberikan *biofertilizer* sebanyak 6 mL pada tanah tempat masing-masing kacang tanah tumbuh ketika tanaman berumur 2 minggu. Perlakuan kelima (P_5) adalah memberikan *biofertilizer* sebanyak 15 mL pada tanah tempat masing-masing kacang tanah tumbuh yang diberikan ketika tanaman berumur 2 minggu. Perlakuan keenam (P_6) adalah memberikan *biofertilizer* sebanyak 15 mL pada tanah di sekitar tempat yang akan ditanami kacang tanah dan memberikan *biofertilizer* sebanyak 15 mL pada tanah tempat masing-masing kacang tanah tumbuh ketika tanaman berumur 2 minggu.

Pemanenan kacang tanah dilakukan ketika kacang tanah telah berumur 90 hari. Panen dilakukan pada saat masak fisiologis. Hal ini dapat diketahui dengan mengambil beberapa sampel tanaman. Tanaman yang siap panen ditandai dengan dalam satu tanaman 75% kulit polongnya telah keras, berserat, bagian dalam berwarna coklat dan polong mudah pecah, batang mulai mengeras, daun menguning dan sebagian mulai berguguran. Setelah tanaman kacang tanah tercabut dari tanah, mencuci polong kacang tanah dengan hati-hati agar polong tidak terlepas dari tanaman kacang tanah. Selanjutnya mengukur tinggi tanaman dan mengambil bintil akar dari setiap tanaman kemudian menimbang berat basah bintil akar tersebut. Tinggi tanaman diukur mulai dari ujung akar tunggang sampai pangkal tunas daun pada batang utama. Tanaman kemudian dikeringkan dengan cara dijemur di bawah terik matahari selama 8 hari. Langkah selanjutnya adalah menimbang berat kering tanaman, memetik polong, menimbang polong, mengupas polong serta menimbang berat bijinya.



Gambar 3.1. Plot penanaman kacang tanah

Keterangan :

 Pematang sawah  Parit  Petak perlakuan

P₁ : Kontrol negatif (tidak diberi perlakuan)

P₂ : Kontrol positif (diberi pupuk kimia urea dan pupuk SP 36 masing-masing sebanyak 20 mL per tanaman)

P₃ : Diberi *biofertilizer* sebanyak 6 mL/tanaman ketika berumur 2 minggu

P₄ : Diberi *biofertilizer* sebanyak 6 mL di sekitar tempat yang akan ditanami kacang tanah dan 6 mL/tanaman ketika berumur 2 minggu

P₅ : Diberi *biofertilizer* sebanyak 15 mL/tanaman ketika berumur 2 minggu

P₆ : Diberi *biofertilizer* sebanyak 15 mL di sekitar tempat yang akan ditanami kacang tanah dan 15 mL/tanaman ketika berumur 2 minggu

3.4. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan penempatan petak perlakuan seperti pada gambar 3.1. Penelitian ini terdiri atas 6 perlakuan. Setiap perlakuan diulang sebanyak 4 kali dan setiap ulangan terdiri dari 10 tanaman. Menurut Suyatno (2010), penentuan besarnya pengulangan berdasarkan rumus sebagai berikut:

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

dimana t = banyaknya perlakuan

r = jumlah replikasi

Setelah dilakukan penghitungan, didapatkan nilai r = 4 sehingga pada penelitian ini digunakan 4 kali ulangan.

Tabel 3.1 Rancangan penelitian

Dosis	P ₁	P ₂	P ₃	P ₄	P ₅	P ₆
	Tanpa perlakuan	20 mL urea dan 20 mL SP 36	1x6 mL	2x6 mL	1x15 mL	2x15 mL

Keterangan:

- P₁ : Kontrol negatif (tidak diberi perlakuan)
P₂ : Kontrol positif (diberi pupuk kimia urea dan pupuk SP 36 masing-masing sebanyak 20 mL per tanaman)
P₃ : Diberi *biofertilizer* sebanyak 6 mL/tanaman ketika berumur 2 minggu
P₄ : Diberi *biofertilizer* sebanyak 6 mL di sekitar tempat yang akan ditanami kacang tanah dan 6 mL/tanaman ketika berumur 2 minggu
P₅ : Diberi *biofertilizer* sebanyak 15 mL/tanaman ketika berumur 2 minggu
P₆ : Diberi *biofertilizer* sebanyak 15 mL di sekitar tempat yang akan ditanami kacang tanah dan 15 mL/tanaman ketika berumur 2 minggu

3.5. Variabel Penelitian

Variabel yang diamati pada penelitian ini adalah:

- Variabel bebas : Perlakuan pemberian dosis *biofertilizer* (6 mL diberikan 1 kali dan 2 kali, 15 mL diberikan 1 kali dan 2 kali)
- Variabel terikat : Pertumbuhan kacang tanah (*Arachis hypogaea* L.) meliputi tinggi tanaman (cm), berat basah bintil akar (g), dan berat kering tanaman (g). Sedangkan untuk produktivitasnya meliputi berat kering polong (g) dan berat kering biji (g).
- Variabel terkontrol : Jenis tanaman kacang tanah (*Arachis hypogaea* L.) varietas kancil dan luas petak perlakuan (m²).

3.6. Pengumpulan Data

Data pertumbuhan yang diambil dalam penelitian ini adalah tinggi tanaman (cm), berat basah bintil akar (g) dan berat kering tanaman (g). Data produktivitas yang diambil adalah berat kering polong (g) dan berat kering biji kacang tanah (g). Semua data dikumpulkan pada saat panen.

3.7. Analisis Data

Data yang diperoleh dari pengukuran pertumbuhan adalah tinggi tanaman, berat basah bintil akar, dan berat kering tanaman. Sedangkan data yang diperoleh dari pengukuran produktivitas adalah berat kering polong dan berat kering biji. Semua data yang diperoleh diuji normalitas dan homogenitas. Apabila data normal dan homogen maka data dianalisis statistik menggunakan uji *one way Analysis of Variance (One Way ANOVA)* dengan derajat signifikansi 0,05. Jika ada pengaruh signifikan, dilanjutkan dengan uji Duncan dengan derajat signifikansi 0,05. Untuk data yang tidak berdistribusi normal dianalisis statistik menggunakan uji Kruskal-Wallis dengan derajat signifikansi 0,05. Jika ada pengaruh maka dilanjutkan dengan uji Mann-Whitney dengan derajat signifikansi 0,05.