

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimen dengan data dianalisis secara kuantitatif menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL), yang meliputi 8 perlakuan yaitu;

T₀ = kontrol

T₁ = *B. mycoides* + *K. ozaenae*

T₂ = *Ps. pseudomallei* + *B. mycoides*

T₃ = *Ps. Pseudomallei* + *K. ozaenae*

T₄ = *K. Ozaenae*

T₅ = *B. Mycoides*

T₆ = *Ps. pseudomallei*

T₇ = *B. mycoides* + *K. ozaenae* + *Ps. Pseudomallei*

Adapun untuk menentukan ulangan perlakuan menggunakan rumus Hanafiah (1993) yaitu : $(t-1)(r-1) > 15$

Keterangan : t = treatment / perlakuan : 8

r = replikasi / ulangan

Dari rumus tersebut didapatkan hasil penentuan ulangan 3 atau lebih dari 3. Jadi ulangan dari masing - masing perlakuan kami lakukan 3 kali.

3.2 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juni sampai dengan Oktober 2010 di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi

Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang dan di Greenhouse Dusun Sumber Brantas, Desa Tulung Rejo, Kecamatan Bumiaji, Kota Batu, Jawa Timur. Tanaman kentang ditanam dalam polibag dan diletakkan di dalam Greenhouse. Sedangkan analisis kadar nitrogen, fosfat dan klorofil dilakukan di Laboratorium Bioteknologi Universitas Muhammadiyah Malang (UMM).

3.3 Alat dan Bahan

3.3.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah laminar flow cabinet, autoklaf, oven, cawan petri, jarum ose, bunsen, kompor gas, pengaduk kaca, pinset, inkubator, aluminum foil, gelas ukur, tabung reaksi, beaker glass, orbital shaker, mortal, pipet volume, kertas filter Whatman 41, erlenmeyer, botol media, inkubator, timbangan analitik, polibag, selang plastik, aerator, desikator, spektrofotometer UV.

3.3.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah bibit atau umbi tanaman kentang (*Solanum tuberosum*), daun kentang segar, limbah tahu, molase, media TSA (*Tryptic Soy Agar*), tanah steril, larutan P-1A, larutan P-2A, sunclin, aquades steril, aseton 85 % dan isolat bakteri endofit *Ps. Pseudomallei*, *B. mycoides* dan *K. Ozaenae* koleksi Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.4 Variabel Penelitian

3.4.1 Variabel bebas: Suspensi bakteri endofit hasil fermentasi

3.4.2 Variabel terikat : Jumlah daun, tinggi tanaman, diameter batang, kadar nitrogen, fosfat dan klorofil.

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Pembuatan Pupuk Hayati

3.5.1.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

Sterilisasi alat dan bahan dilakukan dengan cara membungkus alat-alat dengan kertas HVS bekas yang dibaliknya masih kosong untuk cawan petri sedangkan untuk alat-alat yang lain dibungkus dengan plastik tahan panas, kemudian memasukkannya ke dalam autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 15 psi (*per square inchi*) selama 15 menit.

3.5.1.2 Peremajaan Isolat Bakteri Endofit

Penyiapan dan pemurnian bakteri endofit dilakukan dengan cara sebagai berikut:

1. Meremajakan isolat bakteri endofit yang tumbuh pada medium TSA masing-masing pada medium lempeng agar dan medium TSA miring.
2. Menginkubasi selama satu hari pada suhu 35°C .
3. Bakteri endofit yang telah diperoleh digunakan untuk perlakuan.

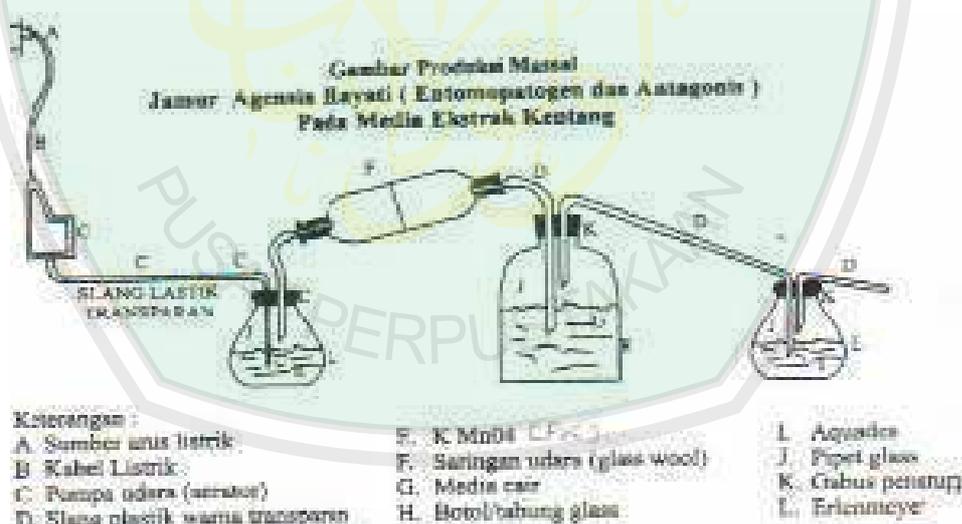
3.5.1.3 Pembuatan Formula Pembawa (Carrier)

Formula pembawa untuk mikroba endofit ini adalah larutan molase 1% dari 20 ml limbah tahu. Sebelum digunakan formula ini di sterilkan dengan

dimasukkan ke dalam autoklaf pada suhu 121° C dengan tekanan 15 psi (*per square inch*) selama 15 menit.

3.5.1.4 Fermentasi Mikroba Endofit dan Penentuan Fase Optimum Pertumbuhan Masing - Masing Bakteri Endofit

Fermentasi mikroba endofit dilakukan dengan cara mengambil 1 ose masing- masing isolat bakteri endofit ke dalam 5 ml air steril dengan kerapatan 10^6 CFU/ ml (Ratih, 2007). Suspensi ini kemudian dicampurkan ke dalam formula pembawa. Dengan fermentor sederhana formula yang telah diinokulasi mikroba endofit diinkubasikan selama ± 7 hari dan biakan sudah dapat digunakan (Purwantisari, 2009). Untuk menentukan fase optimum pertumbuhan, setiap 24 jam sekali dilakukan penghitungan kepadatan bakteri dengan menggunakan spektrofotometer.



Gambar 3.1 Skema pengembangan formulasi media cair dengan fermentor sangat sederhana (Purwantisari, 2009)

3.5.2 Aplikasi Pupuk Hayati

3.5.2.1 Persiapan Media Tanam

Media taman yang digunakan adalah tanah steril yang ditempatkan pada polibag 15 x 35 cm. Penyeterilan tanah dilakukan dengan mencampur tanah

dengan sunclin yang mengandung 25,5% clorin sebanyak 64 ml/ liter air dengan cara disiramkan secara merata pada media tanam dengan menggunakan ember dan ditutup dengan menggunakan plastik selama 7 hari. Setelah 7 hari plastik dibuka dan dikeringanginkan kemudian dimasukkan ke dalam polybag sebanyak 2 kg. Hasil pengujian di laboratorium menunjukkan bahwa sterilisasi tanah dengan alsinini mampu menurunkan jumlah bakteri sampai sepertiga dari jumlah awal dan mampu menurunkan jumlah penyakit yang ada dalam tanah (Balai Besar Pengembangan Mekanisme Pertanian).

3.5.2.2 Penentuan Volume Penyiraman

Menentukan volume penyiraman yaitu dengan melakukan pengukuran kapasitas lapang. Pengukuran kapasitas lapang dilakukan dengan cara media tanam dalam polibag disiram dengan air sampai menetes (jenuh) kemudian didiamkan selama 3 hari sampai tidak ada air yang menetes. Selanjutnya, media tanam ditimbang berat basah dan berat keringnya. Berat basah ditimbang setelah tidak ada air yang menetes dari dalam polybag. Berat kering ditimbang setelah media tanam dioven pada suhu 100° C selama 24 jam. Kapasitas lapang dihitung dengan rumus (Hendriyani et al, 2009) :

$$W = \frac{(TB - TK)}{TK} \times 100\%$$

TK

Keterangan : W = kapasitas lapang

TB = berat basah

TK = berat kering

3.5.2.3 Pemilihan Benih atau Bibit Kentang

Bibit atau umbi tanaman kentang yang digunakan adalah bibit kentang granola Holland Jerman dengan berat antara 100-120 gram dengan 3-5 mata tunas, kemudian dicuci hingga bersih lalu dibilas dengan air steril.

3.5.2.4 Perendaman Benih

Perendaman benih atau umbi tanaman dilakukan sesuai dengan prosedur Coombs *et al.*, (2003 dalam Firmansah, 2008).

Setelah suspensi diperoleh, kemudian masing-masing benih atau umbi tanaman kentang direndam dalam pupuk hayati (25 ml per umbi tanaman) selama 30 menit. Untuk kontrol bibit atau umbi tanaman kentang direndam dengan air steril.

3.5.2.5 Penanaman Benih

Penanaman benih tanaman kentang dilakukan sebagai berikut :

1. Bibit umbi kentang ditanam dalam pot yang telah disterilkan dengan perbandingan tanah dan pasir 2 : 1 sebanyak 2 kg/polibag, dimasukkan dalam polibag berukuran 15 x 35 cm.
2. Bibit dimasukkan ke lubang tanam, ditimbun dengan tanah dan tekan tanah di sekitar umbi. Lubang tanam dibuat dengan kedalaman 8-10 cm.
3. Tiap polibag tanaman kentang terdiri dari 1 tanaman, sehingga polibag yang memiliki tanaman lebih dari 1 akan dicabut. Untuk mengganti tanaman yang kurang baik, maka dilakukan penyulaman. Penyulaman dapat dilakukan setelah tanaman berumur 10 hari. Bibit sulaman merupakan bibit cadangan yang telah disiapkan bersamaan dengan bibit produksi. Penyulaman dilakukan

dengan cara mencabut tanaman yang mati/kurang baik tumbuhnya dan diganti dengan tanaman baru pada lubang yang sama.

3.5.3 Pemeliharaan Tanaman Kentang (*Solanum tuberosum*)

Pemeliharaan tanaman kentang dilakukan sebagai berikut:

1. Penyiangan dilakukan minimal dua kali selama masa penanaman. Penyiangan harus dilakukan pada fase kritis yaitu vegetatif awal dan pembentukan umbi.
2. Penyiraman air dilakukan 7 hari sekali secara rutin. Pengairan dilakukan dengan cara disiram sampai areal lembab.

3.6 Pengamatan

Pengamatan dilakukan setelah tanaman kentang berumur 45 hari (fase vegetatif) yaitu dengan menghitung kadar nitrogen, fosfat dan klorofil pada daun yang sudah dewasa serta parameter pertumbuhan meliputi :

1. Jumlah Daun (cm)

Dihitung daun yang telah membuka sempurna dan berwarna hijau

2. Tinggi Tanaman (cm)

Diukur dari pangkal batang atau dari permukaan tanah sampai titik tumbuh tanaman

3. Diameter Batang (cm)

Diukur dengan jangka sorong pada bagian batang

3.7 Analisis Bahan

3.7.1 Analisis Kadar Nitrogen pada Daun Kentang (*Solanum tuberosum*)

1. Penentuan Kadar Abu Metode Furnace

Dicuci cawan porselen yang akan digunakan sebagai tempat sampel, dikeringkan cawan porselen dengan memanaskannya dalam oven lalu dinginkan dalam desikator dan berat awal ditimbang (massa awal), timbang cawan porselen lalu catat (a gram) kemudian diberi pelabelan. Timbang dengan teliti sampel sebanyak 1-2 gr (massa sampel) tergantung pada kadar abu bahan dan diletakkan di dalam cawan porselen. Abukan bahan dalam tanur listrik (*furnace*) selama 5 jam pada suhu 600° C lalu dimatikan dan ditunggu sampai indikator suhu menunjukkan suhu kamar, dikeluarkan cawan porselen dan didinginkan dalam desikator, lalu ditimbang cawan porselen beserta abu (massa akhir).

$$\text{Penghitungan kadar abu (\%)} = \frac{\text{massa akhir} - \text{massa awal}}{\text{massa sampel}} \times 100\%$$

Hasilnya dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan aquades samai 10ml (pengenceran 10x), lalu larutan tersebut diambil 1 ml kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang lain dan ditambahkan aquades sampai 10 ml (pengenceran 100x).

2. Tes Kit (Uji Kadar Nitrogen)

a. Kontrol

Air biasa ditambahkan 5 tetes larutan $\text{NO}_3 + \text{NO}_2$ -1A dan diaduk lalu ditambahkan 1 sendok larutan $\text{NO}_3 + \text{NO}_2$ -2A, kemudian diuji dengan spektrofotometri UV pada panjang gelombang 517 nm.

b. Uji Sampel

Sampel 5 ml ditambahkan 5 tetes larutan $\text{NO}_3 + \text{NO}_2$ -1A dan diaduk lalu ditambahkan 1 sendok larutan $\text{NO}_3 + \text{NO}_2$ -2A, kemudian diuji dengan spektrofotometri UV pada panjang gelombang 710 nm.

3.7.2 Analisis Kadar Fosfat pada Daun Kentang (*Solanum tuberosum*)

1. Penentuan Kadar Abu Metode Furnace

Dicuci cawan porselen yang akan digunakan sebagai tempat sampel, dikeringkan cawan porselen dengan memanaskannya dalam oven lalu dinginkan dalam desikator dan berat awal ditimbang (massa awal), timbang cawan porselen lalu catat (a gram) kemudian diberi pelabelan. Timbang dengan teliti sampel sebanyak 1-2 gr (massa sampel) tergantung pada kadar abu bahan dan diletakkan di dalam cawan porselen. Abukan bahan dalam tanur listrik (*furnace*) selama 5 jam pada suhu 600°C lalu dimatikan dan ditunggu sampai indikator suhu menunjukkan suhu kamar, dikeluarkan cawan porselen dan didinginkan dalam desikator, lalu ditimbang cawan porselen beserta abu (massa akhir).

$$\text{Penghitungan kadar abu (\%)} = \frac{\text{massa akhir} - \text{massa awal}}{\text{massa sampel}} \times 100\%$$

Hasilnya dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan aquades samai 10ml (pengenceran 10x), lalu larutan tersebut diambil 1 ml kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang lain dan ditambahkan aquades sampai 10 ml (pengenceran 100x).

2. Tes Kit (Uji Kadar Fosfat)

a. Kontrol

Air biasa ditambahkan 5 tetes larutan P-1A dan diaduk lalu ditambahkan 1 sendok larutan P-2A, kemudian diuji dengan spektrofotometri UV pada panjang gelombang 710 nm.

b. Uji Sampel

Sampel 5 ml ditambahkan 5 tetes larutan P-1A dan diaduk lalu ditambahkan 1 sendok larutan P-2A, kemudian diuji dengan spektrofotometri UV pada panjang gelombang 710 nm.

3.7.3 Analisis Kadar Klorofil pada Daun Kentang (*Solanum tuberosum*)

Pengukuran kadar klorofil dilakukan berdasarkan Hendriani dan Setiari (2009). Daun yang digunakan adalah daun nomor 4 dari atas, diambil sebanyak 2 gr dan dihaluskan dengan mortal martil yang ditambahkan 50 ml aseton 85%, kemudian di diamkan selama 4 jam. Setelah itu disaring menggunakan kertas filter Whatman 41 dan diambil 5 ml, kemudian diencerkan dengan aseton 85% sampai 50 ml. Pengukuran kandungan klorofil dilakukan dengan spektrofotometer, absorbansi pada panjang gelombang 663 nm dan 645 nm.

Penghitungan kandungan klorofil dilakukan dengan rumus :

1. Klorofil a mg / g berat daun

$$= 12,21 \times A(663) - 2,81 \times A(646)$$
2. Klorofil b mg / g berat daun

$$= 20,13 \times A(646) - 5,03 \times A(663)$$
3. Klorofil total mg / g berat daun

$$= 17,3 \times A(646) + 7,18 \times A(663)$$

3.8 Analisis Data

Pengaruh perlakuan dari uji aplikasi pupuk hayati berbahan baku bakteri endofit ini dianalisis dengan menggunakan Oneway Anova yang apabila hasilnya terdapat perbedaan yang nyata, yaitu signifikansi kurang dari 0.05, maka dilakukan uji lanjut BNT.

