

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Tempat dan waktu percobaan**

Percobaan dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi dan di Lahan Percobaan Fakultas Pertanian Universitas Siliwangi, Kelurahan Mugarsari, Kecamatan Tamansari, Kota Tasikmalaya dengan ketinggian tempat berada pada 350 m di atas permukaan laut, jenis tanah adalah regosol, tipe curah hujan yaitu tipe C dan dimulai pada bulan Februari sampai dengan bulan Mei 2023.

#### **3.2 Alat dan bahan percobaan**

Alat-alat yang digunakan adalah Laminar Air Flow (LAF), autoklaf, *hot plate magnetic stirrer*, erlenmeyer, cawan petri, tabung reaksi, rak tabung reaksi, jarum ose, timbangan analitik, spatula, gelas ukur, plastik wrap, bunsen, tisu, ember, cangkul, sekop, gembor dan alat tulis.

Bahan-bahan yang digunakan adalah benih buncis tegak vareitas Balitsa 3, isolat bakteri pelarut fosfat, isolat bakteri penambat nitrogen, bahan organik lumpur tinja (*night soil*), media Agar Pikovskaya dan media YEMA-CR (*Yeast Extract Mannitol Agar-Congo Red*).

#### **3.3 Metode percobaan**

Percobaan ini menggunakan metode eksperimen dengan Rancangan Acak Kelompok (RAK) yang terdiri dari 6 perlakuan dan 4 ulangan.

Perlakuan terdiri dari:

A = *night soil* 5 t/ha + bakteri pelarut fosfat

B = *night soil* 10 t/ha + bakteri pelarut fosfat

C = *night soil* 15 t/ha + bakteri pelarut fosfat

D = *night soil* 5 t/ha + bakteri penambat nitrogen

E = *night soil* 10 t/ha + bakteri penambat nitrogen

F = *night soil* 15 t/ha + bakteri penambat nitrogen

Data hasil pengamatan dianalisis dengan ANOVA atau analisis ragam menggunakan uji F pada taraf nyata 5% untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap variabel yang diamati. Model linier rancangan acak kelompok adalah sebagai berikut:

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

Keterangan:

$i$  = 1,2,..., t (perlakuan)

$j$  = 1,2,..., r (ulangan)

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

$\mu$  = nilai rata-rata umum

$\tau_i$  = pengaruh perlakuan ke- $i$

$r_j$  = pengaruh perlakuan ke- $j$

$\varepsilon_{ij}$  = galat percobaan pada satuan percobaan ke- $j$  dalam perlakuan ke- $i$

Dari model linier di atas, maka dapat disusun daftar sidik ragam sebagai berikut:

Tabel 1. Daftar sidik ragam

Sumber Ragam	Derajat Bebas	Jumlah Kuadrat	Kuadrat Tengah	F Hitung	F tabel 5%
Ulangan	3	$\frac{\sum xi^2}{d} - FK$	$\frac{JKU}{DBU}$	$\frac{JKU}{KT\ galat}$	3.29
Perlakuan	5	$\frac{\sum xi^2}{R} - FK$	$\frac{JKP}{DBP}$	$\frac{KTP}{KT\ galat}$	2.90
Galat	15	$JK_{tot} - JK_p - JK_u$	$\frac{JK\ galat}{DBP}$		
Total	23	$\sum Y_{ij}^2 - FK$			

Sumber: Gomez dan Gomez (2015)

Tabel 2. Kaidah pengambilan keputusan

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

Sumber: Gomez dan Gomez (2015)

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

$$LSR = SSR (\alpha. dbg. p). Sx$$

$$SX = \sqrt{\frac{KT\ galat}{r}}$$

Keterangan:

LSR = *Least Significant Range*

SSR = *Significant Studentized Range*

$\alpha$  = Taraf nyata

*dbg* = Derajat bebas galat

*p* = *Range* (perlakuan)

Sx = Galat baku rata-rata

KTG = Kuadran tengah galat

r = Jumlah ulangan pada tiap nilai tengah perlakuan yang dibandingkan

### 3.4 Pelaksanaan percobaan

#### 3.4.1 Perbanyakkan bakteri

Perbanyakkan bakteri tanah yang berasal dari rizosfer lahan mugarsari yaitu tanah rizosfer tanaman kalopo (*Calopogonium mucunoides*), rizosfer tanaman kirinyuh (*Eupatorium odoratum*) dan rizosfer tanaman alang-alang (*Imperata cylindrical*).

a. Sterilisasi alat laboratorium

Sterilisasi alat-alat yang akan digunakan untuk pembuatan media dan perbanyak bakteri menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1,5 Psi (kg/cm<sup>2</sup>) selama 15-20 menit. Alat-alat yang terbuat dari gelas dibungkus terlebih dahulu dengan plastik atau kertas sebelum dimasukkan ke dalam autoklaf.

b. Pembuatan media

Pembuatan media untuk perbanyak bakteri pelarut fosfat menggunakan media Agar Picovskaya dan bakteri penambat nitrogen menggunakan media YEMA-CR (*Yeast Extract Mannitol Agar-Congo Red*). Adapun pembuatannya yaitu dengan cara menimbang kebutuhan bahan dan melarutkannya dalam 250 ml aquades, kemudian mengukur pH dan dipanaskan menggunakan *hot plate*. Setelah semua larut, kemudian media disterilisasi menggunakan autoklaf.

c. Perbanyak bakteri

Perbanyak bakteri dimulai dengan menyiapkan media yang sebelumnya sudah dibuat, lalu memilih isolat bakteri pelarut fosfat dan isolat bakteri penambat nitrogen terbaik, bagian atas tabung reaksi diputar dan dilewatkan di atas api bunsen kemudian tutup tabung reaksi dibuka. Melewatkan jarum ose di api bunsen untuk kemudian mengambil isolat bakteri dan dipindahkan ke dalam media secara merata. Bagian mulut tabung reaksi dilewatkan dan diputar kembali di atas api bunsen, kemudian ditutup dan dilapisi dengan plastik wrap. Isolat bakteri yang telah dipindahkan ke media disimpan di ruang inkubasi dalam kondisi aseptik dan terkendali.

d. Perhitungan kerapatan bakteri

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 mikroba tersebut akan berbiak membentuk koloni yang dapat dilihat dan dihitung secara makroskopis, disebut sebagai *Colony Forming Unit* (CFU). Jumlah koloni bakteri dari sampel dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\text{Koloni per ml atau per g} = \sum \text{koloni per cawan} \times \frac{1}{FP}$$

Keterangan:

FP = faktor pengenceran

Metode menghitung jumlah koloni pada cawan petri dilakukan dengan mengacu pada Schegel (2001) *dalam* Utami dkk. (2008) dengan ketentuan 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 dan diperbanyak pada media cair menggunakan Nutrient Broth (NB).

### **3.4.2 Pelaksanaan percobaan**

#### **a. Persiapan lahan**

Lahan dibersihkan dari gulma kemudian dibuat bedengan dengan ukuran 150 cm dan panjang 200 cm, ketinggian bedengan 30 cm dan antar bedengan dibuat parit sebesar 50 cm.

b. Aplikasi lumpur tinja (*night soil*)

Lumpur tinja diaplikasikan pada tanah secara merata, lalu didiamkan selama 7 hari sebelum penanaman dimulai.

c. Penanaman

Benih buncis tegak ditanam di bedengan yang telah dipersiapkan. Pembuatan lubang tanam dengan kedalaman berkisar 3 cm. Jarak tanam 30 cm x 40 cm dan tiap lubang ditanam 2 benih buncis tegak.

d. Aplikasi inokulum bakteri

Pemberian inokulum bakteri pelarut fosfat dan bakteri penambat nitrogen dilakukan dengan metode Hindersah dan Matheus (2015), pada tingkat kerapatan  $10^8$  CFU/ml yang diaplikasikan dengan menyiram 10 ml inokulum pada setiap tanaman sebanyak 3 kali pemberian yaitu pada saat tanam, 21 hst dan 35 hst.

e. Pemeliharaan tanaman

Pemeliharaan yang dilakukan pada tanaman buncis tegak yaitu penyiraman, penyulaman, penyiangan, pemupukan dan pengendalian organisme pengganggu tanaman (OPT).

1. Penyiraman

Penyiraman dilakukan dua kali sehari pada pagi dan sore hari dengan cara disiram menggunakan gembor. Penyiraman tidak perlu dilakukan jika terjadi hujan.

2. Penyulaman

Penyulaman dilakukan 7 hari setelah tanam, untuk mengganti tanaman yang mati dengan tanaman baru yang sama umurnya.

3. Penyiangan

Penyiangan dilakukan secara berkala untuk meminimalisir terjadinya persaingan antara tanaman buncis tegak dengan gulma, dengan cara mencabut gulma menggunakan tangan.

#### 4. Pemupukan

Pemberian pupuk anorganik (Urea, SP-36 dan KCl). Pemupukan diberikan pada saat pengolahan tanah. Takaran pupuk yang diberikan adalah 18 g Urea/petak, 22,5 g SP-36 g/petak dan 2,025 g KCl/petak.

#### 5. Pengendalian organisme pengganggu tanaman (OPT)

Pengendalian organisme pengganggu tanaman dilakukan dengan cara mekanik tanpa menggunakan bahan kimia dengan mengambil langsung organisme pengganggu tanaman yang menyerang tanaman buncis tegak.

#### f. Pemanenan

Panen dilakukan pada umur 48 hari setah tanam, buncis tegak dipanen 2 hari sekali selama pertumbuhan dapat dipanen dengan interval panen 4 sampai 6 kali panen. Ciri-ciri polong siap panen yaitu warna hijau muda, permukaan kulitnya agak kasar, polong belum berserat dan bila polong dipatahkan akan menimbulkan bunyi letup.

### 3.5 Parameter pengamatan

#### 3.5.1 Pengamatan penunjang

Pengamatan penunjang adalah pengamatan yang dilakukan terhadap variabel yang datanya tidak diuji secara statistik untuk mengetahui kemungkinan pengaruh lain dari luar perlakuan. Adapun parameter penunjang adalah sebagai berikut:

##### a. Analisis tanah

Analisis tanah sebelum percobaan dilakukan dan sebelum media tanam diberi perlakuan di Laboratorium Tanah Fakultas Pertanian Universitas Siliwangi.

##### b. Organisme pengganggu tanaman (OPT).

Mengamati dan mencatat organisme pengganggu tanaman yang terdapat pada tanaman buncis tegak serta gulma yang tumbuh di petak percobaan.

##### c. Curah hujan

Data curah hujan yang digunakan adalah data selama tiga bulan yaitu bulan Maret, April dan Mei tahun 2023.

### 3.5.2 Pengamatan utama

Pengamatan utama adalah pengamatan yang dilakukan terhadap variabel yang datanya diuji secara statisik untuk mengetahui pengaruh dari setiap perlakuan. Adapun parameter utama adalah kelimpahan bakteri dan pertumbuhan buncis tegak pada fase vegetatif dan generatif. Respon pertumbuhan vegetatif tanaman buncis tegak terhadap pemberian inokulan diamati pada 30 hari setelah tanam dan respon pertumbuhan generatif diamati pada 48 hari setelah tanam. Adapun parameter pertumbuhan buncis tegak adalah sebagai berikut:

#### a. Tinggi tanaman

Pengamatan tinggi tanaman dilakukan dengan mengukur tanaman dari pangkal batang sampai ujung yang tertinggi pada tanaman buncis tegak menggunakan penggaris. Tinggi tanaman diamati pada umur 10 hst, 20 hst dan 30 hst.

#### b. Luas daun (cm<sup>2</sup>)

Pengamatan luas daun diamati pada umur 34 hari setelah tanam menggunakan aplikasi Image-J dengan cara didestruksi.

#### c. Panjang polong (cm)

Pengamatan panjang polong dilakukan pada polong yang dihasilkan tanaman sampel menggunakan penggaris. Dilakukan pada panen pertama hingga panen berakhir.

#### d. Jumlah biji per polong

Pengamatan jumlah biji per polong dilakukan pada polong yang dihasilkan tanaman sampel. Dilakukan pada panen pertama hingga panen berakhir.

#### e. Jumlah polong per tanaman

Pengamatan jumlah polong per tanaman dilakukan pada polong yang dihasilkan tanaman sampel. Dilakukan pada panen pertama hingga panen berakhir dengan cara dijumlahkan.

#### f. Bintil akar

Pengamatan bintil akar dilakukan pada tanaman sampel, dilakukan pada saat tanaman berumur 34 hst.



g. Bobot polong per tanaman

Bobot polong per tanaman ditimbang kemudian dijumlahkan dari panen pertama hingga panen berakhir. Pengamatan dilakukan pada tanaman sampel.

h. Bobot polong per petak (kg) dan konversi ke hektar (t)

Bobot polong per petak yaitu hasil polong setiap tanaman termasuk tanaman sampel pada setiap petak perlakuan. Pengamatan ini dilakukan setiap panen kemudian dijumlahkan sampai panen berakhir.

Rumus konversi bobot polong per hektar

$$\text{Hasil per hektar} = \frac{\text{luas lahan 1 hektar}}{\text{luas lahan per petak}} \times \text{hasil per petak} \times 80\%$$