

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan waktu penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Pertanian Universitas Siliwangi Tasikmalaya Kampus Mugarsari dan di *Greenhouse* Kampung Rawa Desa Calingcing Kecamatan Sukahening Kabupaten Tasikmalaya dengan ketinggian tempat 600 meter di atas permukaan laut. Penelitian terdiri dari dua tahap yaitu perbanyak mikroba di laboratorium (*in vitro*) dan pengujian lapangan (*in planta*) terhadap pertumbuhan melon pada bulan November 2023 sampai Februari 2024.

3.2 Alat dan bahan penelitian

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah benih melon varietas Merlion, pupuk organik, pupuk kimia NPK (16-16-16), Kalium Nitrat (KNO₃), SP-36), strain bakteri rizosfer berasal dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Pertanian Universitas Siliwangi hasil dari berbagai jenis perakaran tanaman. Strain bakteri yang digunakan terdiri dari strain bakteri pelarut fosfat, strain bakteri penambat nitrogen, strain bakteri perombak bahan organik, pupuk kompos, media Agar media YEMA-CR (*Yeast Extract Mannitol Agar Congo Red*), CMC-CR (*Carboxyl Methyl Cellulose Congo Red*) dan *pikovskaya*.

Adapun alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah cawan petri, erlenmeyer, gelas ukur, lampu bunsen, timbangan analitik, ember, gelas ukur, jarum ose, autoklaf, Laminar Air Flow (LAF), aluminium foil, kertas label, plastik wrap, korek, tisu, alat suntik steril, gelas ukur, *hotplate*, *magnetic stirrer*, polybag ukuran 40 x 40 cm, tali, cangkul, bambu, gelas eskrim, timbangan digital, meteran dan alat tulis.

3.3 Metode penelitian

Penelitian ini menggunakan metode deskriptif dan eksperimental dengan Rancangan Acak Kelompok (RAK) dengan 7 perlakuan dan 4 ulangan. Satu plot terdiri dari 6 polybag dan tiap polybag terdiri dari 1 tanaman, sehingga jumlah tanaman yang digunakan sebanyak 168 tanaman. Setiap perlakuan mendapat

masing – masing 30 ml strain bakteri baik tunggal ataupun campuran yang kemudian diberikan sebanyak 3 kali yaitu pada awal tanam, 21 hari setelah tanam, dan 35 hari setelah tanam.

Perlakuan strain bakteri rizosfer pada melon adalah sebagai berikut:

A = bakteri penambat nitrogen 30 ml/tanaman

B = bakteri pelarut fosfat 30 ml/tanaman

C = bakteri perombak bahan organik 30 ml/tanaman

D = bakteri penambat nitrogen 15 ml/tanaman + bakteri pelarut fosfat 15 ml/tanaman

E = bakteri penambat nitrogen 15 ml/tanaman + bakteri perombak bahan organik 15 ml/tanaman

F = bakteri pelarut fosfat 15 ml/tanaman + bakteri perombak bahan organik 15 ml/tanaman

G = bakteri penambat nitrogen 10 ml/tanaman + bakteri pelarut fosfat 10 ml/tanaman + bakteri perombak bahan organik 10 ml/tanaman

Data hasil pengamatan dianalisis dengan ANOVA atau analisis sidik 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

μ = nilai rata-rata umum

τ_i = pengaruh perlakuan ke-i

r_j = pengaruh kelompok ke-j

ε_{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	$\frac{\sum xi^2}{d} - FK$	$\frac{JKU}{DBU}$	$\frac{JKU}{KT galat}$	3.16
Perlakuan	6	$\frac{\sum xi^2}{R} - FK$	$\frac{JKP}{DBP}$	$\frac{KTP}{KT galat}$	2.66
Galat	18	$JK_{tot} - JK_p - JK_u$	$\frac{JK galat}{DBP}$		
Total	27	$\sum Y_{ij}^2 - FK$			

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:

$$LSR = SSR (\alpha, dbg, p) \cdot Sx$$

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

Keterangan:

LSR = *Least Significant Range*

SSR = *Significant Studentized Range*

α = 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 di bandingkan

3.4 Pelaksanaan penelitian

3.4.1 Perbanyakkan bakteri

a. Sterilisasi alat laboratorium

Sterilisasi alat-alat yang digunakan untuk pembuatan media dan perbanyakkan bakteri menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C dengan tekanan 1,5 Psi (kg/cm²) selama 15 menit. Alat-alat yang terbuat dari gelas dibungkus terlebih dahulu dengan plastik atau kertas sebelum dimasukkan ke dalam autoklaf.

b. Pembuatan media

Pembuatan media yang biasa untuk perbanyakkan bakteri pelarut fosfat yaitu media agar *Pikovskaya* dengan komposisi glukosa 10 g, Ca₃PO₄ 5 g, (NH₄)₂SO₄ 0,5 g, KCl 0,2 g, MgSO₄.7H₂O 0,1 g, MnSO₄.H₂O 0,01 g, yeast ekstrak 0,5 g, dan FeCl₃.6H₂O 0,01 g pada pH 7 (Widawati, Nurkanto dan Sudiana, 2008). Bakteri penambat nitrogen menggunakan media selektif *Yeast Extract Mannitol Agar* (YEMA) yang mengandung agar teknis 20 g, sukrosa 10 g, K₂HPO₄ 0,5 g, MgSO₄.7H₂O 0,2 g, NaCl 0,1 g, CaCO₃ 3 g, ekstrak khamir 3 g, congo red 0,025 g (Rao dan Subba, 2007). sedangkan bakteri perombak bahan organik menggunakan media selektif CMC (*Carboxymethyl Cellulose*) yang mengandung agar teknis 18 g, CMC 10% 10 g, MnSO₄.H₂O 0,2 g, KNO₃ 0,75 g, K₂HPO₄ 0,5 g, FeSO₄ 0,02 g, CaCl 0,04 g, glukosa 1 g dan yeast ekstra 2 g, karena bakteri perombak bahan organik memiliki kemampuan yang tinggi dalam mendegradasi kandungan selulosa dalam bahan organik (Rao dan Subba, 2007). Adapun pembuatannya yaitu dengan cara menimbang kebutuhan bahan dan melarutkannya dalam 1 liter aquades dan dipanaskan menggunakan *hot plate*. Setelah semua larut, kemudian media disterilisasi menggunakan autoklaf.

c. Peremajaan bakteri

Peremajaan bakteri dimulai dengan menyiapkan media yang sebelumnya sudah dibuat, lalu memilih strain bakteri penambat nitrogen, strain bakteri pelarut fosfat dan strain bakteri perombak bahan organik terbaik, bagian atas tabung reaksi diputar dan dilewatkan di atas api bunsen kemudian tutup tabung reaksi dibuka. Melewatkan jarum ose di atas api bunsen untuk kemudian mengambil strain 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. strain bakteri yang telah dipindahkan ke media disimpan di ruang inkubasi dalam kondisi aseptik dan terkendali.

3.4.2 Uji eksperimen

a. penyemaian

Pembibitan melon diawali dengan penyemaian benih terlebih dahulu. penyemaian menggunakan tanah dan pupuk kompos dengan perbandingan 1:1. Persemaian benih dilakukan dengan menggunakan kemasan eskrim bekas yang diberi lubang. Setelah media selesai dibuat, maka dibuat lubang untuk memasukan benih kemudian disiram sampai basah. Kemudian dilakukan penyiraman sebanyak 2 kali dalam satu hari untuk menjaga media tetap dalam keadaan lembab.

Bibit melon dipindahkan ke media tanam apabila sudah berdaun 4 helai yaitu saat tanaman melon telah berusia 14 hari.

b. Pembuatan media tanam

Media tanam menggunakan polybag dengan ukuran 40 x 40 cm kemudian diisi dengan tanah dan pupuk kompos dengan perbandingan 1:1, berat total media tanam adalah 10 kg per polybag. Menurut Henni (2016), melon diberi pupuk dasar kimia berupa pupuk NPK (16-16-16), SP-36 dan KNO_3 . Pupuk anorganik akan digunakan sebanyak 50% dari rekomendasi sebagai berikut :

Tabel 3. Pupuk dasar kimia

Nama Pupuk	Rekomendasi	50% dari Rekomendasi
NPK (16-16-16)	300 kg/ha	150 kg/ha setara 0,75 gram/polybag
SP-36	250 kg/ha	125 kg/ha setara 0,625 gram/polybag
Kalium (KNO_3)	150 kg/ha	75 kg/ha setara 0,375 gram/polybag

Pengapuran diperlukan apabila pH tanah terlalu asam serta dapat menambahkan unsur hara kalsium.

c. Pengaplikasian strain bakteri rizosfer

Pengaplikasian bakteri rizosfer dilakukan dengan tingkat kerapatan 10^8 CFU/ml yang dicairkan dengan aquades. kemudian diinjeksikan sebanyak 30 ml pada media tanam yang akan dibagi sebanyak 3 kali pemberian yaitu pada saat tanam, 21 hari setelah tanam, dan 35 hari setelah tanam.

d. Pemeliharaan tanaman dan pemanenan

Beberapa pemeliharaan dilakukan pada tanaman melon, diantaranya yaitu penyiraman, pemangkasan, pemupukan dan pengendalian organisme pengganggu tanaman (OPT), dan panen.

1. Penyiraman

Penyiraman dilakukan dua kali sehari, yaitu pada pagi dan sore hari. Apabila media tanam nampak basah maka tidak dilakukan penyiraman. Tanaman disiram sejak masa pertumbuhan tanaman, sampai tanaman akan dipetik buahnya.

2. Pemangkasan

Pemangkasan cabang dilakukan pada cabang lateral yang tumbuh dari pangkal batang hingga ruas ke-8 dan setelah ruas ke-11. Hal ini dilakukan agar produksi buah yang dihasilkan baik atau maksimal.

3. Pemupukan susulan

Pemupukan susulan yang dilakukan menggunakan rekomendasi pemupukan melon dari Henni, dkk (2016). Pemupukan dilakukan sebanyak 5 kali dengan interval 7 hari dengan cara melarutkan pupuk kimia dengan air sebanyak satu liter kemudian dikocor sebanyak 200 ml larutan pupuk per tanaman. Pemupukan pertama dilakukan 7 hari setelah tanam berupa NPK (16-16-16) dengan konsentrasi 15 gram/liter. Pemupukan kedua dilakukan 14 hari setelah tanam berupa NPK (16-16-16) dengan konsentrasi 20 gram/liter. Pemupukan ketiga dilakukan 21 hari setelah tanam berupa NPK (16-16-16) 20 gram dan pupuk Kalium (KNO_3) 10 gram/liter. Pemupukan keempat dilakukan 28 hari setelah tanam berupa NPK (16-16-16) 25 gram

dan pupuk Kalium (KNO_3) 10 gram/liter. Pemupukan kelima dilakukan 35 hari setelah tanam berupa NPK (16-16-16) 30 gram dan pupuk Kalium (KNO_3) 15 gram/liter (Henni, 2016). pupuk akan digunakan sebanyak 50% dari rekomendasi sebagai berikut :

Tabel 4. Pemupukan kimia susulan

Pemupukan ke-	waktu	Jenis pupuk	Rekomendasi	50% dari rekomendasi
1	7 hst	NPK (16-16-16)	15 gram/liter	7,5 gram/liter
2	14 hst	NPK (16-16-16)	20 gram/liter	10 gram/liter
3	21 hst	NPK (16-16-16) Kalium (KNO_3)	20 gram/liter 10 gram/liter	10 gram/liter 5 gram/liter
4	28 hst	NPK (16-16-16) Kalium (KNO_3)	25 gram/liter 10 gram/liter	12,5 gram/liter 5 gram/liter
5	35 hst	NPK (16-16-16) Kalium (KNO_3)	30 gram/liter 15 gram/liter	15 gram/liter 7,5 gram/liter

4. Pengendalian Organisme pengganggu tanaman (OPT)

Pengendalian OPT dilakukan dengan cara mekanik tanpa menggunakan bahan kimia dengan mengambil langsung organisme pengganggu tanaman yang menyerang tanaman melon. Apabila serangan telah melewati ambang batas maka akan digunakan pestisida kontak maupun sistemik.

5. Panen

Tanaman melon dipanen pada umur 65 hari setelah tanam yaitu saat buah sudah berwarna kuning keemasan, kulit buah terasa halus tidak berbulu.

3.5 Parameter Pengamatan

3.5.1 Parameter penunjang

Parameter 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:

1. Analisis status hara tanah

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

2. Organisme pengganggu tanaman (OPT)

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

3. Suhu dan kelembaban

Suhu dan kelembaban diukur setiap pagi pukul 07.00 dan sore pukul 16.00 menggunakan alat *thermohygrometer*.

3.5.2 Parameter utama

Parameter utama adalah pengamatan yang dilakukan terhadap variabel yang datanya diuji secara statistik untuk mengetahui pengaruh dari setiap perlakuan. Adapun parameter utama adalah pertumbuhan melon pada fase vegetatif dan generatif. Respon pertumbuhan tanaman melon terhadap pemberian strain bakteri rizosfer diamati pada umur 14, 21, 28 dan 35 hari setelah tanam.

1. Kelimpahan koloni bakteri

Kelimpahan koloni bakteri dihitung dengan metode cawan hitung/ Total Plate Count (TPC). Prinsip metode cawan hitung adalah strain bakteri yang masih hidup ditumbuhkan pada *Nutrien Agar*, strain bakteri akan diencerkan dengan metode pengenceran bertingkat, yang mana strain bakteri disuspensikan dengan menambahkan 9 ml akuades steril di dalam tabung reaksi kemudian diaduk sampai homogen, setelah itu strain bakteri ditanam pada media *Nutrient Agar* (NA) dengan metode *spread plate* (menyebarkan suspensi bakteri di cawan petri yang telah di isi *Nutrien Agar*). Konsentrasi

suspensi strain bakteri yang digunakan yaitu $10^9 - 10^{10}$ CFU/ml (Irawati, 2017). Jumlah koloni bakteri dari sampel dihitung dengan menggunakan rumus:

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

Keterangan:

FP = faktor pengenceran pada cawan petri yang koloninya dihitung atau pengenceran x jumlah yang ditumbuhkan (volume yang dimasukkan dalam cawan petri sebanyak 0,1 ml atau 1 ml).

Metode menghitung jumlah koloni pada cawan petri dilakukan dengan mengacu pada Schegel (2001) dalam Utami et al., (2008) dengan kaidah 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 mikroba dimurnikan pada media selektif yang baru

dan diperbanyak pada media cair menggunakan *Nutrient Broth* (NB) untuk pengaplikasian di lapangan.

2. Tinggi tanaman

Tinggi tanaman diukur dengan meteran dari pangkal batang sampai ujung daun tertinggi pada fase vegetatif. Pengukuran dilakukan pada umur 14, 21, 28 dan 35 hari setelah tanam.

3. Jumlah daun

Daun yang dihitung telah terbuka sempurna dan tidak cacat atau terserang hama pada 14, 21, 28 dan 35 hari setelah tanam.

4. Bobot buah per tanaman

Setelah buah dipanen, kemudian berat buah ditimbang dengan menggunakan timbangan.

5. Kadar gula

Kadar gula diukur dengan menggunakan refractometer. Hal ini disebabkan karena refractometer mudah digunakan dimana saja asal ada cahaya dan tidak memakan waktu yang lama untuk mendapatkan hasilnya dibandingkan dengan menggunakan pengukuran metode lain.