

III. METODE PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember 2010 sampai Maret 2011. Ekstraksi, analisis sifat kimia ekstrak limbah agroindustri dan analisis tanah dilakukan di Laboratorium Ilmu Tanah. Enumerasi fungi tanah dilakukan di Laboratorium Bioteknologi Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Lampung.

B. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan adalah cangkul, shaker, autoklaf, laminar flow, erlenmeyer, tabung reaksi, corong, pipet, timbangan, kertas saring, sentrifius, plastik tahan panas, aluminium foil, polybag 3 kg, gelas ukur, oven, pH meter, cawan petri, karung, kertas label, tissue, alat tulis, dan alat-alat untuk analisis tanah dan enumerasi fungi tanah.

Bahan-bahan yang digunakan antara lain tanah yang diambil dari Politeknik Negeri Lampung, limbah kulit kopi, limbah kulit kakao, limbah jerami bekas pertanaman jamur, limbah kepala udang, pupuk kandang sapi, kotoran cacing, aquades (H_2O), larutan asam asetat (CH_3COOH) 0,01 N, alkohol, bahan-bahan kimia untuk analisis kimia ekstrak limbah agroindustri, NaCl, PDA

(*Potato Dextrose Agar*), streptomycin dan bahan-bahan kimia lainnya untuk analisis laboratorium.

C. Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK), yang disusun secara faktorial (8×2) dengan 3 kelompok, secara keseluruhan penelitian ini terdiri dari 48 satuan percobaan.

Faktor I : Ekstrak Bahan Organik (O) yang terdiri dari :

- O_1 = Pupuk kandang sapi + Kulit kopi
- O_2 = Pupuk kandang sapi + Kulit kakao
- O_3 = Pupuk kandang sapi + Jerami bekas media jamur
- O_4 = Pupuk kandang sapi + Kepala Udang
- O_5 = Kascing + Kulit kopi
- O_6 = Kascing + Kulit kakao
- O_7 = Kascing + Jerami bekas media jamur
- O_8 = Kascing + Kepala Udang

Faktor II : Jenis Pengekstrak (E) yang terdiri dari :

- E_1 = air destilata (H_2O)
- E_2 = Asam asetat (CH_3COOH) 0,01 N.

Tabel 1. Kombinasi perlakuan yang diuji.

Perlakuan		Kelompok			
Bahan Organik (O)	Pengekstrak (E)	U ₁	U ₂	U ₃	
Pupuk kandang sapi + Limbah Kulit kopi	Aquades	O ₁ E ₁	O ₁ E ₁	O ₁ E ₁	
Pupuk kandang sapi + Limbah Kuli kakao		O ₂ E ₁	O ₂ E ₁	O ₂ E ₁	
Pupuk kandang sapi + Limbah Jerami		O ₃ E ₁	O ₃ E ₁	O ₃ E ₁	
Pupuk kandang sapi + Kepala udang		O ₄ E ₁	O ₄ E ₁	O ₄ E ₁	
Kascing + Limbah Kulit kopi		O ₅ E ₁	O ₅ E ₁	O ₅ E ₁	
Kascing + Limbah Kuli kakao		O ₆ E ₁	O ₆ E ₁	O ₆ E ₁	
Kascing + Limbah Jerami		O ₇ E ₁	O ₇ E ₁	O ₇ E ₁	
Kascing + Limbah Kepala udang		O ₈ E ₁	O ₈ E ₁	O ₈ E ₁	
Pupuk kandang sapi + Limbah Kulit kopi		Asam asetat	O ₁ E ₂	O ₁ E ₂	O ₁ E ₂
Pupuk kandang sapi + Limbah Kuli kakao			O ₂ E ₂	O ₂ E ₂	O ₂ E ₂
Pupuk kandang sapi + Limbah Jerami			O ₃ E ₂	O ₃ E ₂	O ₃ E ₂
Pupuk kandang sapi + Kepala udang			O ₄ E ₂	O ₄ E ₂	O ₄ E ₂
Kascing + Limbah Kulit kopi			O ₅ E ₂	O ₅ E ₂	O ₅ E ₂
Kascing + Limbah Kuli kakao			O ₆ E ₂	O ₆ E ₂	O ₆ E ₂
Kascing + Limbah Jerami			O ₇ E ₂	O ₇ E ₂	O ₇ E ₂
Kascing + Limbah Kepala udang			O ₈ E ₂	O ₈ E ₂	O ₈ E ₂

Data yang diperoleh ditabulasi dan diuji homogenitas ragamnya dengan Uji Bartlett dan kenambahan dengan Uji Tukey. Selanjutnya data dianalisis dengan analisis ragam pada taraf nyata 5%. Untuk mengetahui beda nilai tengah dilakukan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) taraf 5% serta untuk melihat hubungan antara total populasi dan keanekaragaman fungsi dengan pH, C-organik dan N-total dilakukan uji korelasi pada taraf.

D. Pelaksanaan Penelitian

1. Pengambilan Contoh Tanah

Contoh Tanah yang digunakan untuk penelitian ini berasal dari lahan yang belum pernah diolah yang hanya ditanami rumput di Politeknik Negeri Lampung.

2. Cara Pengambilan Sampel di lapangan

Contoh tanah yang digunakan berasal dari Politeknik Negeri Lampung. Tanah dikelompokkan menjadi 3 berdasarkan kesuburan tanahnya, tanah diambil sebanyak 5 titik setiap ulangan, diambil hingga kedalaman 20 cm disetiap titik. Kemudian tanah yang diambil pada setiap titik dikompositkan berdasarkan ulangan. Selanjutnya tanah lembab diayak dengan menggunakan ayakan 2 mm tujuan dari pengayakan adalah untuk memisahkan tanah dari akar-akar halus tanaman, dan butiran-butiran tanah yang digunakan lebih halus. Sebagian contoh tanah di kering udarkan untuk dilakukan analisis pH, C-organik, dan N-total.

3. Pengadaan Limbah Agroindustri

Limbah agroindustri didapat dengan cara membeli langsung ke pusat pertambakan udang PT Central Pertiwi Bahari, di perkebunan rakyat (kopi dan kakao), tempat budidaya jamur. Pupuk kandang sapi diperoleh dari peternakan sapi dan kascing diperoleh dengan cara membeli langsung ke perternakan cacing tanah di Bandung.

4. Pencampuran Limbah Agroindustri

Masing-masing dari bahan organik yaitu kulit kopi, kulit kakao, jerami bekas media jamur dan kepala udang, dipotong-potong hingga berukuran kecil ($\pm 1 - 2$ cm), kemudian dicampurkan dengan pupuk kandang sapi maupun kascing sesuai perlakuan dengan perbandingan (L:B) 2:1, kemudian dimasukkan ke dalam kantong plastik hitam dan diinkubasi selama ± 2 minggu. Setelah itu dilakukan ekstraksi terhadap campuran bahan organik tersebut.

5. Ekstraksi Limbah Agroindustri

Prosedur ekstraksi bahan organik dilakukan dengan sedikit memodifikasi metode yang dilakukan oleh Gigliotti dkk., (2005). Campuran bahan organik diekstrak dengan menggunakan aquades dan asam asetat 0,01 N, dengan perbandingan berdasarkan volume (BB : E) 1 : 5, yaitu 200 g campuran bahan organik dan 1000 ml larutan air destilata atau asam asetat 0,01 N untuk mendapatkan konsentrasi 100%. Campuran dikocok selama 2 x 24 jam dengan kecepatan sedang (190 rpm), disentrifius dengan kecepatan 3000 rpm dan pastinya disaring menggunakan kertas saring whatman No. 42 dan dibuat seri pengenceran dengan konsentrasi 60% yaitu dengan cara mencampurkan 60 ml ekstrak campuran bahan organik dan limbah agroindustri dengan 40 ml aquades. Kemudian dilakukan analisis karakteristik kimia ekstrak bahan organik.

6. Tata Laksana Penelitian

Pada sampel tanah yang diinkubasi dilakukan analisis awal C-organik, N-total tanah dan pH-tanah. Tanah setara dengan 3 kg BKO (Berat Kering Oven) masing-masing dimasukkan ke dalam polybag dan ditutup rapat dan disimpan dalam ruangan dengan suhu kamar. Selanjutnya tanah dikondisikan pada kelembaban 75% kapasitas lapang dengan cara seminggu sekali ditimbang dan ditambahkan air bila diperlukan. Kadar air 75% kapasitas lapang karena kondisi tersebut yang paling optimum untuk kehidupan mikroorganisme dan tumbuhan.

Untuk setiap contoh tanah dikeluarkan dari polybag kemudian diaplikasikan masing-masing campuran ekstrak limbah agroindustri dengan dosis 10% dari

berat tanah, diaduk merata dalam plastik berukuran besar, setelah itu tanah dimasukkan kembali ke dalam polybag, ditutup rapat, disimpan dalam ruang gelap dengan suhu kamar sampai dengan waktu pengamatan. Kadar air dikembalikan pada kondisi 75% kapasitas lapang dengan cara ditimbang. Pengambilan contoh tanah untuk pengamatan terhadap total populasi dan keanekaragaman fungi yang dilakukan pada hari ke-0, 7, 15, dan 30 setelah inkubasi. Setelah hari ke-30 contoh tanah diambil untuk dilakukan analisis terhadap pH- tanah, C-organik, dan N-total tanah.

E. Pengamatan

1. Variabel Utama

Variabel utama yang diamati adalah populasi fungi tanah, yaitu total koloni fungi tanah dan keragamannya yang diamati secara morfologi di laboratorium pada hari ke-0, 7, 15, dan 30 setelah inkubasi.

a. Pembuatan Seri Pengenceran (*Dilution Series*)

Alat-alat yang digunakan diautoklaf selama 120 menit dengan suhu 120°C, hal ini dilakukan untuk mencegah kontaminasi mikroorganisme yang menempel pada alat. Pembuatan larutan fisiologis (8,5 g NaCl dalam 1 liter aquades) digunakan untuk membuat seri pengenceran. Larutan fisiologis sebanyak 90 ml dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 ml dan 9 ml masing-masing dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak delapan tabung reaksi. Tabung reaksi dan erlenmeyer ditutup dengan menggunakan kapas dan aluminium foil, kemudian diautoklaf selama 20 menit pada suhu 120°C. Sebelum digunakan larutan didinginkan hingga

suhunya mencapai antara 42 - 45°C. Selanjutnya pembuatan pengenceran dengan cara menambahkan 10 g tanah dimasukkan ke dalam erlenmeyer yang berisi 90 ml larutan fisiologis steril dan dikocok secara perlahan-lahan jangan sampai membasahi kapas kemudian 1 ml larutan pengenceran 10^{-1} dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 ml larutan fisiologis dengan menggunakan pipet mikron sehingga diperoleh seri pengenceran 10^{-2} dan seterusnya sampai 10^{-5} .

b. Medium Fungi

Medium biakan yang digunakan untuk menghitung fungi adalah PDA (*Potato Dextrose Agar*) dibuat dengan melarutkan 39 g PDA dalam 1 liter aquades, kemudian diautoklaf selama 20 menit dengan suhu 120°C. Larutan yang telah diautoklaf kemudian didiamkan beberapa saat sampai mencapai 45 - 50°C, ditambahkan antibiotik streptomycin dengan tujuan agar tidak terjadi kontaminasi dengan bakteri selama inkubasi. Untuk menghitung fungi, 1 ml suspensi tanah diambil dari seri pengenceran 10^{-2} - 10^{-5} dengan menggunakan pipet steril ke cawan petri. Kemudian ditambahkan 12 - 15 ml medium PDA yang bertemperatur 45 - 50°C dan didiamkan sampai agar memadat. Setelah medium PDA memadat cawan petri dibalik dan diinkubasi pada inkubator dengan suhu 28 - 30°C. Pengamatan terhadap total fungi dan keanekaragamannya dilakukan setelah 4 - 5 hari inkubasi (Hariyanto, 2006).

Untuk menghitung dipilih cawan yang jumlah koloninya antara 30 - 300 per cawan. Untuk memudahkan perhitungan total fungi digunakan *Quebec Colony Counter (QCC)*. Keanekaragaman morfologi koloni fungi tanah diamati berdasarkan warna koloni, elevasi (cembung, rata, cekung), pinggir koloni

(bergerigi, mulus, berhifa) serta perhitungan keanekaragaman dihitung dengan metode Shannon dan Wiever (Odum, 1971) dengan rumus sebagai berikut :

$$H = -\sum (ni/N) \log (ni/N)$$

Keterangan :

H = Indeks Keanekaragaman

ni = Jumlah individu ke i

N = Jumlah seluruh individu

Untuk menghitung jumlah fungi dari contoh tanah yang dihitung adalah dengan mengalikan rata-rata jumlah koloni dengan faktor pengencer (Tim Biologi Tanah, 2008).

$$\text{CFUs/g (tanah)} = \text{rata-rata koloni/cawan} \times \text{faktor pengenceran}$$

Hasil ini kemudian dikonversi ke jumlah mikroorganisme dalam 1 gram tanah kering oven dengan memperhitungkan kadar air tanah.

2. Variabel Pendukung

Variabel pendukung yang diamati pada awal dan akhir penelitian adalah :

1. Analisis tanah awal (sebelum perlakuan) dan di akhir waktu inkubasi yaitu pH, C, dan N.
2. Analisis akhir C-organik (metode Walkley & Black) dan N-total (metode Kjeldahl) dan C/N pada masing-masing tanah yang diaplikasikan ekstrak bahan organik pada konsentrasi 60%.