

III. METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan September sampai Desember 2011 di kebun terpadu Unila dan Laboratorium Bioteknologi Fakultas Pertanian Universitas Lampung.

B. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah cawan petri, erlenmayer, tabung reaksi, gelas ukur, plastik, gunting, alat tulis, tisu, kapas, aluminium foil, inkubator, autoklaf, kantong plastik, *QCC (Quebec Colony Counter)*, lakban, dan alat-alat laboratorium lainnya untuk analisis tanah.

Bahan yang digunakan adalah kotoran sapi segar yang berasal dari PT. Juang Jaya Sidomulyo (Lampung Selatan), batuan fosfat alam yang berasal dari pertambangan rakyat di Selagai Lingga (Lampung Tengah), aquades, alkohol, agar nutrisi (*nutrient agar*), NaCl, bahan-bahan yang digunakan untuk media biakan bakteri serta bahan kimia yang digunakan untuk analisis N total (Kjeldahl), C-organik (Walkley and Black), pH (Elektrometrik), P-larut (asam sitrat 2%) dan P-total (HCl 25%).

C. Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) dengan 4 ulangan, secara keseluruhan penelitian ini terdiri dari 16 satuan percobaan. Adapun perlakuan yang digunakan adalah:

K = Campuran 20% batuan fosfat alam dan 80% kotoran sapi segar +
Dekomposer (Kontrol)

N = Campuran 20% batuan fosfat alam dan 80% kotoran sapi segar +
Dekomposer + Penambat N (*Azotobacter* sp dan *Azospirillum* sp)

P = Campuran 20% batuan fosfat alam dan 80% kotoran sapi segar +
Dekomposer + Pelarut P (*Aspergillus niger* dan *Pseudomonas fluorescens*)

NP = Campuran 20% batuan fosfat alam dan 80% kotoran sapi segar +
Dekomposer + Penambat N + Pelarut P

Data yang diperoleh dirata-ratakan, kemudian diuji homogenitasnya dengan uji Bartlett dan aditivitasnya dengan uji Tukey. Selanjutnya data dianalisis dengan analisis ragam pada taraf 5% . Untuk mengetahui beda nilai tengah dilakukan Uji Kontras Ortogonal, serta untuk melihat hubungan antara total populasi bakteri dengan pH, C-organik, P-larut, P-total dan N-total dilakukan uji korelasi pada taraf 5%.

D. Pelaksanaan Penelitian

1. Persiapan

Bahan yang digunakan adalah kotoran sapi segar yang berasal dari PT. Juang Jaya Sidomulyo (Lampung Selatan), batuan fosfat berasal dari pertambangan rakyat di Selagai Lingga (Lampung Tengah). Sebelum dilakukan pencampuran

terlebih dahulu dilakukan penggilingan batuan fosfat kemudian diayak dengan ayakan 3 mm. Kotoran sapi diambil dalam keadaan segar. Setelah itu dilakukan pencampuran batuan fosfat dan kotoran sapi segar untuk setiap kotak, sesuai dengan persentase pencampuran sebesar 20% : 80%. Pada perlakuan kontrol campuran batuan fosfat dan kotoran sapi hanya ditambahkan molasses dengan konsentrasi 40% . Pada perlakuan mikroba penambat N ditambahkan bakteri *Azotobacter* sp dan bakteri *Azospirillum* sp dari hasil uji isolat yang telah dicampurkan molasses 40% sebanyak $2,97 \times 10^8$ cfu g⁻¹ (aplikasi/gram bahan = $1,3 \times 10^6$) dan $2,29 \times 10^8$ cfu g⁻¹(aplikasi/gram bahan = 8×10^5). Pada perlakuan mikroba pelarut P ditambahkan bakteri *Pseudomonas flourescens* dan fungi *Aspergillus niger* dari hasil uji isolat yang telah dicampurkan molasses 40% sebanyak $2,62 \times 10^8$ cfu g⁻¹ (aplikasi/gram bahan = 1×10^6) dan $1,21 \times 10^6$ cfu g⁻¹(aplikasi/gram bahan = $4,2 \times 10^3$). Setelah itu, bahan campuran tersebut dimasukkan ke dalam kotak kayu berukuran (120x80x50) cm³ dan diaduk, kemudian dikomposkan secara aerobik selama 2 bulan, kotak ditutup rapat dengan plastik agar tidak terjadi penguapan air yang berlebihan selama proses pengomposan.

2. Analisis Populasi Mikroba

Pada waktu awal inkubasi (1 hari) sampel dari setiap kotak diambil dari enam titik kemudian dikompositkan. Sampel tersebut masing - masing ditimbang sebanyak 10 g untuk analisis P tersedia, NH₄⁺ (amonium), N total, pH, dan C-organik. Analisis sampel dilakukan serentak untuk setiap ulangan (kelompok). Jika analisis tersebut tidak bisa dilakukan dalam sehari, sampel yang tersisa disimpan

dalam lemari es. Pengambilan sampel dan analisis berikutnya dilakukan pada waktu inkubasi 7, 14, 28, dan 56 hari.

E. Variabel Pengamatan

1. Variabel Utama

Variabel utama yang diamati adalah total bakteri. Pengukuran jumlah bakteri dilakukan dengan menggunakan metode cawan agar dengan teknik sebagai berikut:

a. Pembuatan Seri Pengenceran

Dibuat larutan fisiologis (8,5 g NaCl dalam 1 liter akuades) dan dimasukkan sebanyak 90 ml kedalam erlenmayer, kemudian dimasukkan 9 ml larutan fisiologis ke dalam tabung reaksi sebanyak 7 buah. Erlenmayer dan tabung reaksi ditutup dengan kapas dan aluminium foil kemudian diautoklaf selama 20 menit pada temperatur 121°C, sebelum digunakan larutan tersebut didinginkan terlebih dahulu. Sebanyak 10 g sampel dimasukkan kedalam erlenmayer yang berisi 90 ml larutan fisiologis, larutan ini mempunyai pengenceran 10^{-1} . Dengan menggunakan pipet steril, dipindahkan 1 ml larutan 10^{-1} ke dalam 9 ml larutan fisiologis selanjutnya sehingga diperoleh seri pengenceran 10^{-2} . Demikian seterusnya hingga diperoleh pengenceran 10^{-8} .

b. Penyiapan Media Bakteri Inokulasi

Media biakan yang digunakan untuk mengidentifikasi bakteri yaitu agar nutrisi (*nutrient agar*). Agar nutrisi sebanyak 28 g dilarutkan di dalam 1 liter aquades,

lalu disterilisasikan dengan menggunakan autoklaf selama 20 menit, setelah itu media didinginkan pada suhu 45 °C. Kemudian sebanyak 12 - 15 ml media agar nutrisi yang bertemperatur 45 – 50 °C dituangkan dalam cawan petri dan didiamkan sampai medium agar memadat. Setelah padat, cawan petri dibalik dan diinkubasi pada inkubator dengan suhu 28°C.

c. Pengamatan

Pengamatan dilakukan pada hari ke 1, 7, 14, 28 dan 56 hari setelah inkubasi.

Jumlah koloni yang muncul pada tiap kali pengamatan dihitung. Untuk memudahkan penghitungan pada cawan petri digunakan *Quebec Colony Counter* (QCC).

Untuk menghitung jumlah mikroorganisme dari sampel yang dihitung adalah dengan mengalikan rata-rata jumlah koloni dengan faktor pengencer.

$$\text{CFUs/ml (sampel)} = \text{rata-rata koloni/cawan} \times \text{faktor pengencer.}$$

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

2. Variabel Pendukung

Variabel pendukung yang diamati pada awal dan akhir penelitian adalah:

1. Kemasaman tanah/ pH (metode Elektromagnetik)
2. C-Organik (metode Walkley & Black)
3. N-total (metode Kjeldhal)
4. P-larut (Metode asam sitrat 2%) dan
5. P-total (Metode HCl 25%)