

III. BAHAN DAN METODE

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juli sampai bulan November 2009, di Laboratorium Kesuburan Tanah, dan Laboratorium Bioteknologi Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Lampung.

B. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah ayakan 2 mm, autoklaf, cawan petri, gelas ukur, erlenmeyer, tabung reaksi, pipet, titrimeter, tisu, kapas, aluminium foil, polibag, neraca analitik, inkubator, dan kantong plastik.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Tanah Andisol Desa Gisting Atas, Herbisida Glifosat (nama dagang Round Up dengan bahan aktif isopropilamina glifosat), kompos jerami (C/N = 15,16), kapur (CaCO_3), aquades, alkohol 96%, agar nutrien (*nutrient agar*), NaCl, bahan-bahan yang digunakan untuk medium biakan bakteri nitrosomonas, C-organik tanah (metode Walkey & Black), N-total (metode Kjeldhal), dan pH tanah (metode elektrometri).

C. Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan kombinasi perlakuan dalam Rancangan Acak Kelompok (RAK) dalam faktorial 3 x 2 x 2 dengan 3 kali ulangan.

Faktor pertama adalah herbisida Glifosat yaitu :

H₀ = tanpa herbisida

H₁ = herbisida glifosat dengan dosis 20 mg kg⁻¹

H₂ = herbisida glifosat dengan dosis 60 mg kg⁻¹.

Faktor kedua adalah kompos jerami (K) yaitu :

K₀ = tanpa kompos

K₁ = kompos 20 t ha⁻¹

Faktor ketiga adalah kapur CaCO₃ (L) yaitu :

L₀ = tanpa kapur

L₁ = kapur dengan dosis 15 t ha⁻¹

Tabel 1. Kombinasi perlakuan yang diujikan

Perlakuan			Ulangan		
Herbisida	Kompos	Kapur	U1	U2	U3
H ₀	K ₀	L ₀	H ₀ K ₀ L ₀	H ₀ K ₀ L ₀	H ₀ K ₀ L ₀
			H ₀ K ₀ L ₁	H ₀ K ₀ L ₁	H ₀ K ₀ L ₁
			H ₀ K ₁ L ₀	H ₀ K ₁ L ₀	H ₀ K ₁ L ₀
			H ₀ K ₁ L ₁	H ₀ K ₁ L ₁	H ₀ K ₁ L ₁
H ₁	K ₁	L ₁	H ₁ K ₀ L ₀	H ₁ K ₀ L ₀	H ₁ K ₀ L ₀
			H ₁ K ₀ L ₁	H ₁ K ₀ L ₁	H ₁ K ₀ L ₁
			H ₁ K ₁ L ₀	H ₁ K ₁ L ₀	H ₁ K ₁ L ₀
			H ₁ K ₁ L ₁	H ₁ K ₁ L ₁	H ₁ K ₁ L ₁
H ₂			H ₂ K ₀ L ₀	H ₂ K ₀ L ₀	H ₂ K ₀ L ₀
			H ₂ K ₀ L ₁	H ₂ K ₀ L ₁	H ₂ K ₀ L ₁
			H ₂ K ₁ L ₀	H ₂ K ₁ L ₀	H ₂ K ₁ L ₀
			H ₂ K ₁ L ₁	H ₂ K ₁ L ₁	H ₂ K ₁ L ₁

homogenitas ragam data diuji dengan uji Bartlett dan aditifitas data dengan uji Tukey. Analisis ragam dilakukan dengan taraf nyata 5 % yang dilanjutkan dengan Uji BNT pada taraf 5%.

D. Pelaksanaan Percobaan

Percobaan ini merupakan percobaan laboratorium dengan pemberian herbisida Glifosat pada tanah Andisol desa Gisting Atas, Kecamatan Gisting Kabupaten Tangamus.

1. Sejarah Tanah di Lapang Tempat Pengambilan Contoh Tanah

Contoh tanah yang diambil untuk penelitian ini berasal dari lahan pertanaman kubis (*Brassica oleracea L*) di desa Gisting Atas Kecamatan Gisting Kabupaten Tangamus. Dalam budidaya tanaman kubis telah diaplikasikan pupuk kimia dan insektisida secara terus-menerus selama 20-30 tahun dan herbisida \pm 5-10 tahun. Lahan digunakan untuk budidaya tanaman kubis dalam satu tahun dilakukan 3 kali tanam dengan 1 kali pengolahan tanah pada musim tanam pertama. Aplikasi herbisida diberikan pada saat pengolahan tanah awal yaitu satu kali dalam satu tahun dengan dosis 20 cc per 12 L air. Sedangkan untuk pupuk kimia yang digunakan adalah pupuk ZA, SP-36, dan KCl yang dicampurkan sebagai pupuk dasar dan pupuk susulan. Pupuk yang diberikan saat pemupukan dasar dengan dosis 10 g tanaman⁻¹. Selanjutnya pupuk susulan diberikan 20 hari setelah tanam dengan dosis 20 g tanaman⁻¹ dan 45 hari setelah tanam dengan dosis 25 g tanaman⁻¹. Selain pupuk kimia, dalam pemeliharaan juga digunakan insektisida dengan merek dagang Tracer dengan dosis 20 cc per 12 L air yang diaplikasikan

setiap 5 hari sekali dari awal tanam hingga panen. Produksi kubis mencapai $\pm 5 \text{ t ha}^{-1}$.

2. Pengambilan Contoh Tanah

Contoh tanah yang diambil sebanyak 3 titik. Contoh tanah diambil hingga kedalaman 20 cm disetiap titik. Kemudian contoh tanah yang diambil setiap titik dikompositkan.

3. Tahapan Penelitian

Pertama-tama dilakukan analisis awal C-organik, pH-tanah, N-total dan KTK tanah pada tanah yang diinkubasi. Selanjutnya tanah dengan 3 kg Berat Kering Oven (BKO) masing-masing dimasukkan kedalam polibag berlubang dan ditutup rapat dan disimpan dalam ruangan dengan suhu kamar. Kemudian tanah dikondisikan pada kelembaban 75% kapasitas lapang dengan cara seminggu sekali ditimbang dan ditambahkan air bila diperlukan. Setiap contoh tanah diaplikasikan kapur, dengan cara mengeluarkan tanah dari polibag dan diletakkan di atas plastik kemudian ditambah dengan kapur (CaCO_3) secara merata. Lalu campuran tanah dan kapur (CaCO_3) dimasukkan kedalam plastik besar dan dikocok sampai merata, agar campuran tanah dan kapur lebih merata. Kemudian contoh tanah diinkubasi selama 14 hari dan setelah itu diaplikasikan kompos dan herbisida glifosat sesuai perlakuan. Aplikasi kompos dan herbisida glifosat dilakukan dengan mengeluarkan tanah dari dalam polibag diletakkan di atas plastik dan dicampur rata dengan kompos dan setelah itu dicampur merata dengan herbisida glifosat. Selanjutnya tanah dikembalikan ke dalam polibag berlubang dan ditutup rapat untuk diinkubasi selama penelitian berlangsung. Kadar air dikembalikan

pada kondisi 75% kapasitas lapang. Pengamatan terhadap total bakteri tanah dilakukan pada hari ke 0, 3, 6, 12, 24, dan 36, dan bakteri nitrosomonas dilakukan pada hari 0, 6, dan 36 setelah inkubasi. Setelah pengamatan hari ke- 0 dan ke-36 contoh tanah diambil untuk analisis terhadap kandungan C-organik, N-total, pH tanah, dan KTK tanah.

E. Variabel Pengamatan

1. Variabel Utama

Variabel utama yang diamati adalah total bakteri tanah dan bakteri nitrosomonas. Untuk menghitung total bakteri tanah menggunakan metode cawan agar. Metode hitungan cawan didasarkan pada anggapan bahwa setiap sel yang dapat hidup akan berkembang menjadi satu koloni. Jadi jumlah koloni yang muncul pada cawan merupakan suatu indeks bagi jumlah organisme yang dapat hidup yang terkandung dalam sampel. Teknik yang digunakan adalah pengenceran sampel dan mencawakan hasil pengenceran tersebut. Untuk menghitung bakteri nitrosomonas digunakan metode *Most Probable Number* (MPN) yang didasarkan pada penentuan ada tidaknya mikroorganisme di dalam médium inkubasi (tabung reaksi) yang diinokulasi dengan suatu seri pengenceran suspensi atau larutan tanah.

a. Prosedur pembuatan seri pengenceran

Dibuat larutan fisiologis (8,5 g NaCl dalam 1 liter akuades) dan dimasukkan sebanyak 90 ml kedalam erlenmeyer. Disiapkan tabung reaksi dan

dimasukkan 9 ml larutan fisiologis. Masing-masing sampel tanah disiapkan sebanyak 7 tabung reaksi. Erlenmeyer 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 sebelum digunakan. Sebanyak 10 g sampel tanah dimasukkan ke dalam erlenmeyer 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. Pembuatan Medium Biakan Bakteri tanah

Medium yang biasa digunakan untuk mengidentifikasi bakteri tanah yaitu agar nutrien (*nutrient agar*). Adapun komposisi media per liter untuk total bakteri antara lain: Pepton 5 gram, *Beef extract* 3 g, NaCl 5 g, Agar 15 g dan akuades 1000 ml. Cara membuat medium tersebut adalah dengan melarutkan masing-masing bahan tersebut dalam erlenmeyer sesuai dengan komposisi yang diinginkan. Untuk menghitung bakteri, 1 ml suspensi tanah diambil dari seri pengenceran 10^{-4} - 10^{-6} dengan menggunakan pipet steril ke cawan petri. Kemudian dituangkan 12-15 ml medium agar nutrien yang bertemperatur 45 - 50°C dan didiamkan sampai medium agar memadat. Setelah padat, cawan petri dibalik dan diinkubasi pada inkubator dengan suhu 28 - 30°C . Pengamatan koloni bakteri pada cawan petri dilakukan setelah 3-4 hari inkubasi.

c. Pembuatan Medium Biakan Bakteri nitrosomonas

Medium yang biasa digunakan untuk mengidentifikasi bakteri nitrosomonas (Verstrate, 1981), yaitu : $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,5 g), KH_2PO_4 (0,2 g), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,04 g), MgSO_4 (0,04 g), Fe-sitrat (0,5 mg), *Phenol red* (0,5 mg), akuades (900 ml). Bahan-bahan tersebut dilarutkan ke dalam akuades sampai volumen 1000 ml, pH media 7,4 dengan menambahkan 0,1 N HCl atau 0,1 N NaOH. Larutan tersebut diautoklaf pada suhu 121°C selama 20 menit. Setelah médium dingin, 1 ml larutan tanah dimasukkan dari seri pengenceran 10^{-3} - 10^{-7} sebanyak 5 tabung reaksi dan 5 ulangan. Kemudian diinkubasi selama 3-4 minggu.

d. Pengamatan

Pengamatan dilakukan mulai hari ke-3 setelah inkubasi. Menghitung jumlah koloni yang muncul pada tiap kali pengamatan. Bisa dilihat dari warna, elevasi, (cembung, rata, sekung), pinggiaran koloni (bergerigi, mulus, berhifa). Untuk memudahkan penghitungan pada cawan petri dapat digunakan *Quebec Colony Counter*.

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

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

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

Untuk menghitung MPN mikroorganisme yang ada dalam sampel, tabung berisi médium yang berubah warna menjadi kuning menandakan bahwa reaksi positif kemudian jumlah mikroorganisme dihitung dengan tabel MPN.

2. Variabel Pendukung

Variabel pendukung yang diamati pada awal dan akhir penelitian. Variabel yang diamati adalah :

1. C-organik (metode Walkey & Black)
2. N-total (metode Kjeldhal)
3. Kemasaman tanah/ pH (metode elektrometrik dengan pengestrak H₂O menggunakan perbandingan 1:2,5).
4. Analisis tanah awal dan akhir (C, N, KTK, dan pH)
5. Analisis kompos awal (C, N, KTK, dan pH)

Tabel 2. Beberapa Sifat Kimia Tanah Andisol dan Kompos Jerami Sebelum Perlakuan

Sifat	Nilai
• Tanah Andisol	
1. C-organik (%)	2,17
2. N-total (%)	0,17
3. KTK (me 100 g ⁻¹)	8,05
4. Al-dd (me 100 g ⁻¹)	0,25
5. H-dd (me 100 g ⁻¹)	0,05
6. pH	5,38
7. Tekstur tanah	Lempung berpasir
• Kompos	
1. C-organik (%)	24,71
2. N-total (%)	1,63
3. Nisbah C/N	15,16
4. KTK (me 100 g ⁻¹)	14,60
5. pH	7,35