

III. METODE PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Pelaksanaan

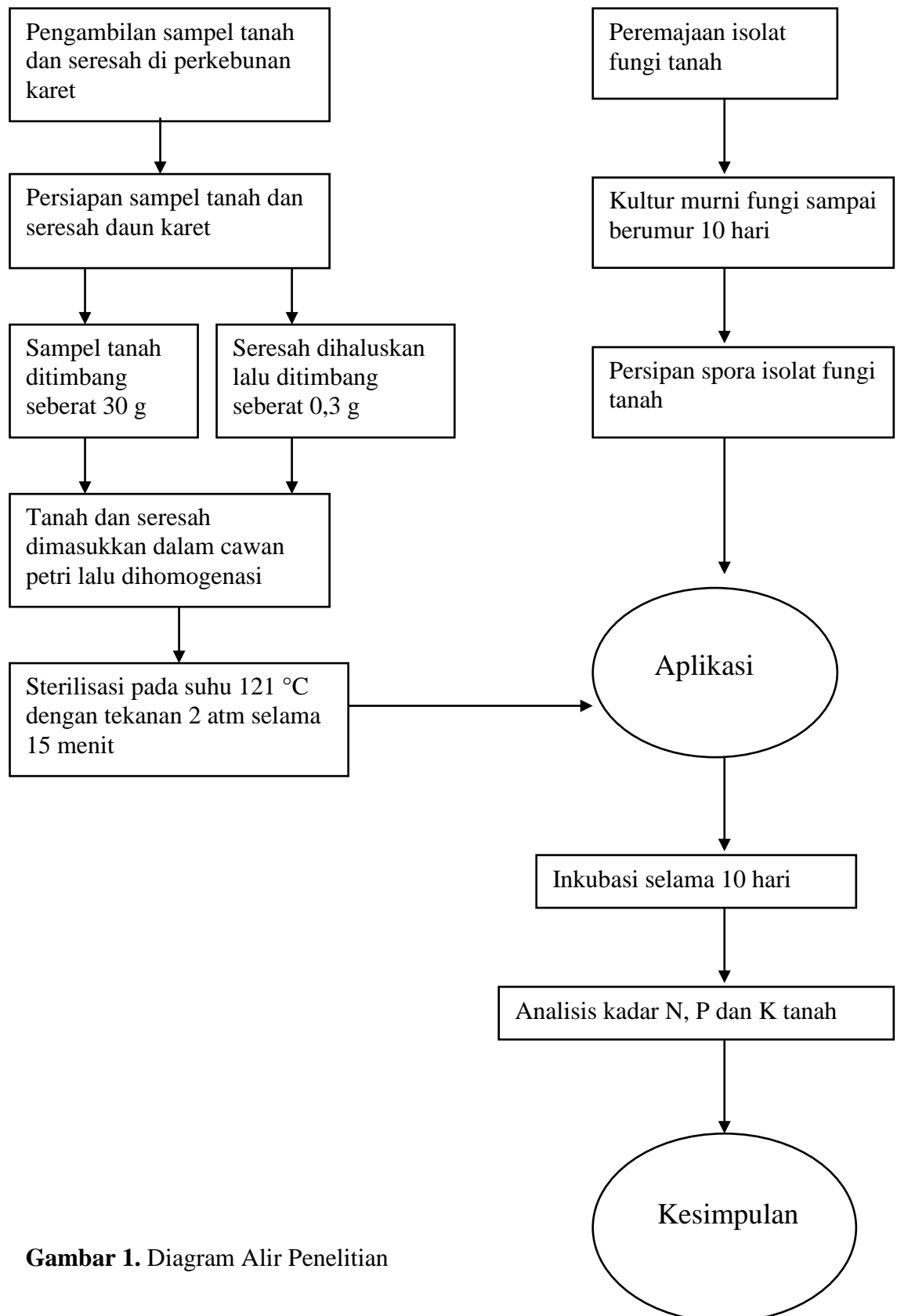
Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium Fisiologi Tumbuhan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung dan Laboratorium Ilmu Tanah Fakultas Pertanian Universitas Lampung, dari bulan Agustus sampai bulan November 2008.

B. Alat dan Bahan

Alat – alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi : cawan petri, erlenmeyer, gelas ukur, hot plate stirrer, kompor listrik, timbangan, inkubator, jarum ose, lampu bunsen, autoclave, labu kjedahl, botol film, rotary shaker, spektrofotometer, flame fotometer dan spatula.

Bahan yang diperlukan meliputi : sampel tanah, aquadest, alkohol 70 %, alumunium foil, dextrose, kentang segar, kertas tissue, spritus, agar – agar, asam sulfat, asam silikat, katalis, air destilasi, asam borat, NaOH 40 %, HCl 0,1 N, Bray-1, *working solution*, NH₄Oac 1 N pH 7, kertas saring whatman dan air deionisasi.

C. Prosedur Kerja



Gambar 1. Diagram Alir Penelitian

Penelitian ini didahului dengan peremajaan isolat fungi, setelah itu fungi yang menunjukkan perkembangan baik dan tidak terkontaminasi dibuat kultur murninya. Kultur murni ini diinkubasi selama 10 hari di dalam inkubator. Kemudian dipersiapkan untuk pengambilan spora fungi berdasarkan kelompoknya masing – masing.

Pada waktu yang bersamaan disiapkan media tanah. Pertama – tama tanah seberat 30 gram ditimbang dengan menggunakan timbangan digital. Lalu ditambah daun karet sebagai sumber makanan untuk mikrofungi yang sebelumnya ditumbuk dan ditimbang seberat 0,3 gram. Tanah dan seresah diaduk hingga homogen dengan menggunakan spatula dalam cawan petri, setelah itu cawan petri ditutup dan dibungkus dengan menggunakan kertas untuk mencegah kontaminasi dengan bahan – bahan lain selama proses sterilisasi dan inkubasi mikrofungi.

Cawan petri yang berisi tanah dan seresah yang telah dibungkus kertas diletakkan ke dalam autoclave untuk disterilisasi pada suhu 121 °C dengan tekanan 2 Atm selama 15 menit. Setelah proses sterilisasi selesai, masing – masing cawan petri dikeluarkan dari autoclave dan dikering anginkan selama 2 – 3 hari untuk memastikan tanah dan seresah yang sudah disterilkan tidak terkontaminasi / ditumbuhi oleh jamur.

Kelompok fungi yang telah disiapkan, masing - masing diambil 10 ml spora yang telah dicampurkan dengan aquades yang telah disterilisasi. 10 ml campuran spora fungi dan aquades murni yang telah siap digunakan dituangkan dalam cawan petri kemudian diaduk hingga homogen dengan menggunakan

spatula. Setelah itu, dibiakkan di dalam inkubator pada suhu 20°C – 30°C selama 10 hari. Setelah 10 hari, dianalisis kadar N, P dan K.

D. Pelaksanaan Penelitian

1. Pembuatan Media Potato Dextrose Agar (PDA)

Media PDA merupakan media untuk menumbuhkan mikrofungi tanah. Cara pembuatannya yaitu : pertama – tama 250 gram kentang dikupas dan dicuci bersih, lalu dipotong – potong menjadi kotak – kotak kecil. Potongan kentang tersebut direbus dalam 500 ml aquades selama 1- 2 jam (sampai kentang terlihat memutih, sedangkan cairannya menguning). Setelah itu disaring dengan kain tipis sehingga diperoleh cairan ekstrak kentang yang bening. Dekstros 10 gram dan agar – agar 7,5 gram dimasukkan ke dalam ekstrak tersebut. Kemudian larutan ini ditetapkan volumenya sampai 500 ml dengan menambahkan aquades, setelah itu dipanaskan diaduk hingga homogen kurang lebih 1 jam. Selanjutnya media disterilisasi selama 15 menit. Bila media belum digunakan, media yang sudah dingin disimpan didalam freezer (Gandjar dkk., 1999; Malloch, 1981).

2. Peremajaan spora isolat fungi tanah

Spora isolat fungi yang telah ada dari penelitian sebelumnya diremajakan kembali secara aseptik di laminar air flow dengan menggunakan media PDA. Media PDA yang sebelumnya telah dipersiapkan dituang ke dalam cawan petri secukupnya, kemudian dibiarkan hingga memadat. Setelah itu, spora isolat fungi diambil sebanyak satu ose dan diletakkan ke bagian dalam cawan petri.

Setelah itu, cawan petri dibungkus dengan kertas dan diinkubasi di dalam inkubator selama 10 hari. Spora isolat fungi yang tidak terkontaminasi dipindahkan ke media PDA miring secara aseptik. Apabila fungi terkontaminasi maka perlu dilakukan isolasi fungi kembali.

3. Pengambilan sampel tanah

Pengambilan sampel tanah dilakukan secara acak (random) pada beberapa titik pengambilan di area perkebunan karet milik PTPN VIII di daerah kabupaten Pesawaran. Sampel tanah diambil dengan menggunakan cangkul sampai kedalaman kira – kira 10 cm dari permukaan tanah, kemudian tanah dimasukkan ke dalam karung.

4. Sterilisasi Tanah

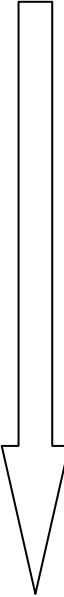
Tanah seberat 30 gram yang sebelumnya telah dicampurkan dengan seresah daun karet sebanyak 0,3 gram disiapkan pada cawan petri, kemudian dilakukan sterilisasi dengan dimasukkan ke dalam autoklave pada suhu 121°C dengan tekanan 2 Atm, selama 15 menit. Sterilisasi ini bertujuan untuk mematikan mikroorganisme yang ada di dalam tanah tersebut.

5. Penyiapan suspensi spora fungi tanah

Setelah 10 hari, kultur masing – masing fungi yang telah bersporulasi di media PDA dalam cawan petri dibuat menjadi suspensi dengan menambahkan 5 ml aquades steril ke dalam tiap biakan fungi. Fungi dilepaskan dari media dengan cara menggosokkan biakan fungi dengan jarum inokulasi. Lalu suspensi fungi

tersebut dipindahkan ke dalam tabung reaksi steril. Selanjutnya diperoleh 10 sumber suspensi spora fungi tanah yaitu DIA1, DIA 2, DIA 3, DIA 4, DIA 5, DIA 6, DIA 7, DIA 8, DIA 9 dan DIA 10 (Tabel 1).

Tabel 1. Kelompok isolat fungi berdasarkan aktifitas enzim

No	Perlakuan	Kelompok isolat fungi	Aktivitas Enzim
1	DIA 1	<i>Aspergillus niger.</i> , <i>Humicola</i> sp., <i>Botryotrichum</i> sp., <i>Rhizophus</i> sp., <i>Lunuluspora</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp. (2).	Paling tinggi
2	DIA 2	<i>Aspergillus niger.</i> , <i>Fusarium</i> sp., <i>Botryotrichum</i> sp., <i>Rhizophus</i> sp., <i>Lunuluspora</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp. (2).	
3	DIA 3	<i>Aspergillus niger.</i> , <i>Botry trichum</i> sp., <i>Rhizophus</i> sp., <i>Lunuluspora</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp. (2).	
4	DIA 4	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Botryotrichum</i> sp., <i>Rhizophus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp. (1), <i>Lunuluspora</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp. (2).	
5	DIA 5	<i>Aspergillus niger.</i> , <i>Botryotrichum</i> sp., <i>Rhizophus</i> sp., <i>Lunuluspora</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp. (2), <i>Aspergillus</i> sp. (3).	
6	DIA 6	<i>Aspergillus niger.</i> , <i>Humicola</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Rhizophus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp. (1), <i>Aspergillus</i> sp. (3).	
7	DIA 7	<i>Humicola</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Botrytrichum</i> sp., <i>Rhizophus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp. (1), <i>Aspergillus</i> sp. (3)	
8	DIA 8	<i>Humicola</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Rhizophus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp. (1), <i>Lunuluspora</i> sp.	
9	DIA 9	<i>Humicola</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Rhizophus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp. (1), <i>Lunuluspora</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp. (3)	
10	DIA 10	<i>Humicola</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Rhizophus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp. (1), <i>Aspergillus</i> sp. (2), <i>Aspergillus</i> sp. (3)	

Keterangan :

DIA : Decomposing Inducer Agent

6. Aplikasi spora fungi

Suspensi spora fungi yang telah siap digunakan diambil sebanyak 10 ml, dituang ke dalam cawan petri yang berisi media tanah yang telah distrerilkan bersama seresah diaduk hingga homogen. Setelah itu, dibiakkan di dalam inkubator pada suhu 20°C - 30°C selama 10 hari. Masing – masing perlakuan dilakukan dengan 3 kali ulangan.

7. Analisis Kadar N, P dan K

Media tanah yang telah diinkubasi kemudian dianalisis kadar N, P dan Knya di Laboratorium Ilmu Tanah Fakultas Pertanian Universitas Lampung. Metode yang digunakan dalam analisis kadar N adalah metode Kjeldahl, sedangkan metode untuk analisis kadar P dan K digunakan metode Bray-1.

A. Analisis Kadar Nitrogen (N)

Seberat 1 gram tanah kering dimasukkan ke dalam labu kjedahl 100 ml, kemudian ditambahkan 5 ml larutan asam sulfat – asam silikat, dibiarkan selama semalam pada suhu ruangan. Setelah itu dipanaskan dengan alat pemanas sampai berhenti berbuih. Selanjutnya labu didinginkan dan ditambah 1,1 gram campuran katalis. Labu dipanaskan hingga proses perombakan selesai dan dilanjutkan hingga campuran mendidih secara perlahan selama 5 jam. Suhu pemanasan diatur sehingga asam sulfat mengkondensasi hingga 1/3 leher labu. Labu dibiarkan dingin dan ditambah hingga 10 ml air destilasi, diaduk hingga menjadi suspensi dan labu dibiarkan mendingin. Dilanjutkan dengan proses destilasi. Cairan dipindahkan dari labu pengurai ke labu

destilasi. Sistem destilasi uap ini ditutup dan sebuah labu erlenmeyer 100 ml berisi 25 ml asam borat diletakkan di bawah kondensor. Ditambahkan 20 ml NaOH 40 % dan dilanjutkan destilasi hingga volume destilat mencapai 40 ml. Terakhir dilakukan titrasi dengan larutan HCl 0,1 N dan diamati terjadinya perubahan dari hijau menjadi merah jambu (Utomo and Tom, 1991).

$$\% N = \frac{N \text{ HCl} \times \text{ml HCl} \times 14}{\text{Berat sampel (mg)}} \times 100 \%$$

Keterangan :

% N : % Nitrogen dalam tanah

N HCl : Nilai titrasi larutan HCl

B. Analisis Kadar Fosfor (P)

Seberat 1,5 g tanah dimasukkan ke dalam erlenmeyer 50 ml. Dilanjutkan dengan penambahan 15 ml larutan ekstraksi tanah yang telah disiapkan sebelumnya (larutan baku dan larutan untuk bekerja). Dishaker selama kurang lebih 15 menit, disaring dan dikumpulkan filtratnya dalam erlenmeyer 100 ml.

Selanjutnya sejumlah 5 ml filtrat dipindahkan ke dalam kufet lalu ditambahkan 5 ml larutan pewarna dan dikocok, kemudian ditambahkan 5 tetes larutan pereduksi lalu dikocok. Selama 15 menit larutan didiamkan, kemudian dibaca kerapatan optik dengan spektroskop pada panjang gelombang 660 mμ. Kurva baku dibuat dengan ppm P sebagai sumbu X dan % T atau A sebagai sumbu Y.

$$\begin{aligned}
 \text{P-tersedia (ppm)} &= \text{P dalam larutan (ppm)} \times \frac{15}{1,5} \times \frac{(10 + 5)}{5} \times \frac{100 + \text{KA}}{100} \\
 &= \text{ppm P dalam larutan} \times 30
 \end{aligned}$$

Keterangan :

KA : Kadar air

C. Analisis kadar Kalium (K)

Seberat 1ml filtrat penetapan P-tersedia dimasukkan kedalam tabung reaksi.

Lalu diencerkan menjadi 10 kali lipat, kemudian dimasukkan kedalam tabung plastik dan diukur dengan alat ukur foto-nyala dengan filter K. Bila larutan masih terlalu pekat pengenceran ke dua perlu dilakukan dengan aquades. Kadar K diperhitungkan dari larutan baku.

Rumus

Kadar K (me/100g) =

$$\text{Kadar K dalam larutan (me/l)} \times \text{fp} \times \frac{15}{1,5} \times \frac{100 + \text{KA}}{100} \times 10$$

Keterangan :

fp : Faktor pengoreksi

KA : Kadar air

8. Rancangan Percobaan

Penelitian ini dirancang dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Dengan 11 perlakuan masing – masing 3 ulangan. Dimana P0 adalah kontrol dan P1 – P10 adalah perlakuan 10 kelompok spora isolat fungi. Data yang diperoleh akan dianalisis ragam dan apabila terjadi perbedaan nyata atau sangat nyata, maka dilanjutkan dengan Uji Beda Nyata terkecil (BNT) pada taraf 5%.

RAL (Rancangan Acak Lengkap) Penelitian

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	2	5	4	9	10	7	3	6	0	8
2	0	3	7	5	7	1	4	9	8	10

Gambar 2. Tata letak kelompok perlakuan

Keterangan :

0 : Kontrol

1 – 10 : DIA 1 – DIA 10