

## **1. BAHAN DAN METODE**

### **3.1 Tempat dan Waktu**

Penelitian dilaksanakan di Kebun Kopi Robusta PT. Perkebunan Nusantara XII (Persero) Desa Bangelan, Kecamatan Wonosari, Kabupaten Malang pada bulan Maret – April 2014. Pra survey dan perijinan dilakukan pada bulan Februari 2014. Tahap analisis Laboratorium dilaksanakan di laboratorium mikrobiologi Universitas Negeri Malang pada bulan Maret 2014. Analisis kimia tanah dilakukan di Laboratorium kimia tanah, Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya, Malang.

### **3.2 Kondisi Umum Lokasi**

Perkebunan kopi Robusta PT. Perkebunan Nusantara XII (Persero), pada mulanya wilayah ini merupakan kawasan hutan belantara yang terdiri dari berbagai jenis pohon dan tanaman akibat dari adanya ekstensifikasi, sehingga dilakukan pembukaan lahan untuk dipergunakan sebagai wilayah atau tempat untuk perkebunan kopi Robusta. Wilayah ini berada di ketinggian 400 – 650 Mdpl. Berdasarkan data rerata curah hujan dan kelembapan bulanan dari tahun 2003 – 2013 diketahui bahwa curah hujan rerata sebesar 2.142 mm/th dengan jumlah hari hujan rerata 129 hari per tahun. Jenis tanah pada lokasi penelitian ini adalah Inceptisol, karakteristik dari tanah ini adalah mempunyai kandungan bahan organik berkisar antara 3-5%. Kemasaman tanah berkisar antara pH 4,0-6,5 yaitu dari asam sampai agak masam.

### **3.3 Bahan dan Alat**

Isolasi mikroba tanah menggunakan tanah yang berasal dari areal lahan pertanaman kopi Robusta di lahan PTPN XII Bangelan Malang, Jawa Timur. Sampel tanah yang digunakan terdiri dari 2 lokasi yang berbeda yaitu; 1. Tanaman Kopi perlakuan pupuk organik; 2. Tanaman Kopi perlakuan anorganik (Tabel 2).

Tabel 2. Lokasi Pengambilan sampel.

No	Lokasi/Blok	Jenis pupuk	Umur Tanaman	Luas Blok
1	Blok 1	Pupuk NPK (PNO)	+10 tahun	10 ha
2	Blok 3	Pupuk Kulit Buah Kopi (PO)	+10 tahun	10 ha

Alat yang digunakan pada pengambilan sampel tanah dilapangan adalah bor tanah, penggaris, dan plastik. Sedangkan alat yang digunakan saat analisis di laboratorium adalah tabung reaksi, cawan petri, laminar air flow, pipet mikro, tip, oven, autoclave dan inkubator. Media yang digunakan untuk isolasi mikroba antara lain media LG untuk isolasi bakteri *Azotobacter*, dan media *Nitrogen Fixation Bacteria* (NFb).

### 3.4 Metode Penelitian

Metode penelitian yang dipakai adalah metode survey lalu dilanjutkan dengan percobaan di laboratorium dimana pada tiap perlakuan dilakukan pengulangan sampel sebanyak 3 kali. Pelaksanaan penelitian terdiri dari beberapa rangkaian kegiatan, yaitu: 1) preparasi alat dan bahan, 2) Isolasi bakteri, 3) perhitungan jumlah mikroba, 4) pemilihan mikroba, 5) uji kemurnian bakteri, 6) uji penambatan nitrogen, 7) Karakterisasi bakteri.

Tingkat Kedalaman tanah yang digunakan dalam pengamatan adalah:

1. Kedalaman 0-10 cm.
2. Kedalaman 10-20 cm.
3. Kedalaman 20-30 cm.

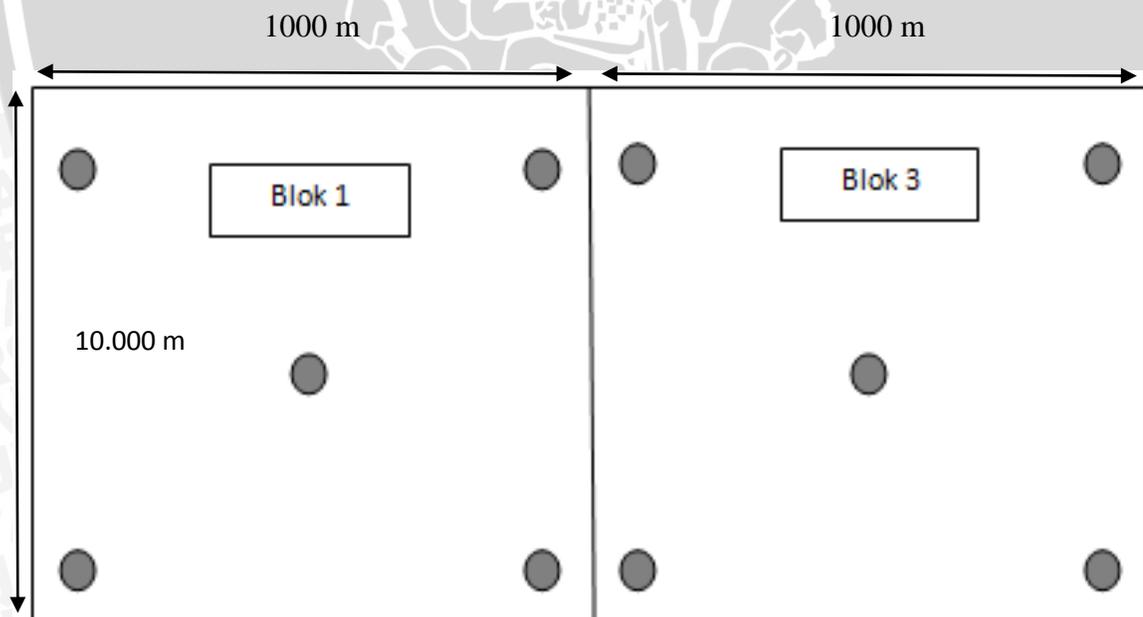
#### 3.4.1 Persiapan Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian harus bersih dan steril. Sterilisasi alat dan bahan menggunakan autoclave. Pembuatan media diawali dengan menimbang bahan – bahan dan dimasukkan ke dalam becker glass selanjutnya

dituang aquades dan diaduk dengan magnetic steril lalu diukur pH. Setelah bahan tercampur lalu dimasukkan ke labu ukur 1000 ml dan ditambahkan aquades sampai tanda batas. Untuk media pertumbuhan pada bahan tersebut ditambahkan agar dan disterilkan.

Pengambilan sampel tanah dilakukan dengan metode acak komposit. Sampel tanah diambil dari 2 lokasi berbeda yaitu tanaman kopi dengan perlakuan pupuk NPK dan tanaman kopi (Gambar 5) dengan perlakuan pupuk kulit buah kopi.

1. Siapkan ring sample dan platik (wadah) sampel tanah beserta labelnya.
2. Pada tiap lokasi diambil sampel tanah yang terdiri dari 3 kedalaman yang berbeda yaitu: a. kedalaman 0-10 cm; b. kedalaman 10-20 cm; c. kedalaman 20-30 cm.
3. Dari 1 petak lahan terdapat 5 titik pengambilan dengan kedalaman 0-10 cm, kedalaman 10-20 cm, dan kedalaman 20-30 cm
4. Kemudian 5 titik dengan kedalaman 0-10 dikompositkan dan di ambil 200 gram begitu juga dengan kedalaman berikutnya kedalaman 10-20 cm, dan kedalaman 20-30 cm.



Gambar 5. Plot Pengambilan Sampel Tanah

### 3.4.2 Isolasi Bakteri

Sampel tanah diambil 10 gram kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi 90 ml larutan fisiologis (0,85% NaCl) dan dihomogenkan selama 30 menit. Dari tabung reaksi pertama dipipet lagi sebanyak 1 ml. Prosedur ini dilakukan sampai pengenceran yang diinginkan dan dilakukan dalam tempat yang steril agar tidak terjadi kontaminan. Pada metode hitung cawan, seri pengenceran yang telah ditentukan dimasukkan ke dalam cawan petri yang telah disediakan. Setelah seri pengenceran dimasukkan ke dalam cawan petri maka siap dituang media yang telah disterilkan sebanyak 10 – 20 ml. Media yang dituang dalam kondisi yang tidak terlalu panas, sekitar 40°C. inkubasi dilakukan 3-7 hari di dalam inkubator pada suhu 35°C (Rasti dkk, 2007).

### 3.4.3 Perhitungan Jumlah Koloni Bakteri

Setelah masa inkubasi, diamati koloni yang tumbuh pada masing-masing cawan petri dan dilakukan penghitungan pada masing-masing pengenceran. Penghitungan dilakukan berdasarkan jumlah koloni (*Plate count*), pada penghitungan dengan cara ini diperlukan beberapa syarat yang harus dipenuhi, yakni :

1. Jumlah koloni tiap cawan petri antara 30-300 koloni, jika tidak ada yang memenuhi syarat maka dipilih koloni yang jumlahnya mendekati 300.
2. Tidak ada koloni yang menutup lebih besar dari setengah luas cawan petri, koloni tersebut dikenal dengan spreader (Balitan, 2007).

#### Perhitungan :

$$\text{Total populasi (Cfu) g}^{-1} \text{ tanah kering} = \frac{\text{jumlah koloni} \times f_p}{b_k \text{ tanah}}$$

Keterangan:

Fp : faktor pengenceran pada cawan petri yang di hitung

Bk : berat kering contoh tanah (g) = berat basah x (1 – kadar air)

#### 3.4.4 Pemilihan Bakteri

Dari koloni yang terbentuk, masing-masing diambil dengan jarum ose dan digores pada media yang telah tersedia, lalu diinkubasi selama 2x24 jam pada suhu kamar. Dari koloni yang tumbuh di ujung goresan, diambil dan digores lagi dan diinkubasi selama 2x24 jam. Kegiatan ini diulang sampai mendapatkan koloni yang tumbuh di ujung menampakkan morfologi koloni yang seragam baik warna, ukuran maupun bentuknya.

#### 3.4.5 Uji Kemurnian Isolat

Dari isolate bakteri penambat N hasil streak plate, di uji kemurniannya dengan metode *pour plate*. Dari kegiatan ini diharapkan memperoleh koloni - koloni yang mempunyai kenampakan seragam sehingga didapat isolat murni. Isolate yang tumbuh di cawan petri dengan morfologi sama selanjutnya ditanam pada media miring dan disimpan sebagai stok.

#### 3.4.6 Uji Penambatan Nitrogen

Isolat yang telah dimurnikan diinokulasikan pada media Nfb semi padat. Inkubasi dilakukan 14 hari dan diamati pelikel yang terbentuk.

#### 3.4.7 Karakterisasi Bakteri

Karakterisasi bakteri terdiri dari uji gram (KOH 3%). Uji ini dilakukan dengan menaruh satu ose biakan bakteri berumur 18 – 24 jam pada preparat steril yang telah ditetesi larutan KOH 3%. Kemudian diamati terbentuk tidaknya lendir. Jika terbentuk lendir maka bakteri tersebut tergolong dalam gram negatif dan sebaliknya jika tidak terbentuk lendir maka bakteri tersebut tergolong dalam gram positif.

### 3.5 Parameter Pengamatan

Metode dan Parameter yang digunakan dalam penelitian ini disajikan dalam tabel berikut ini:

Tabel 3. Parameter Pengamatan

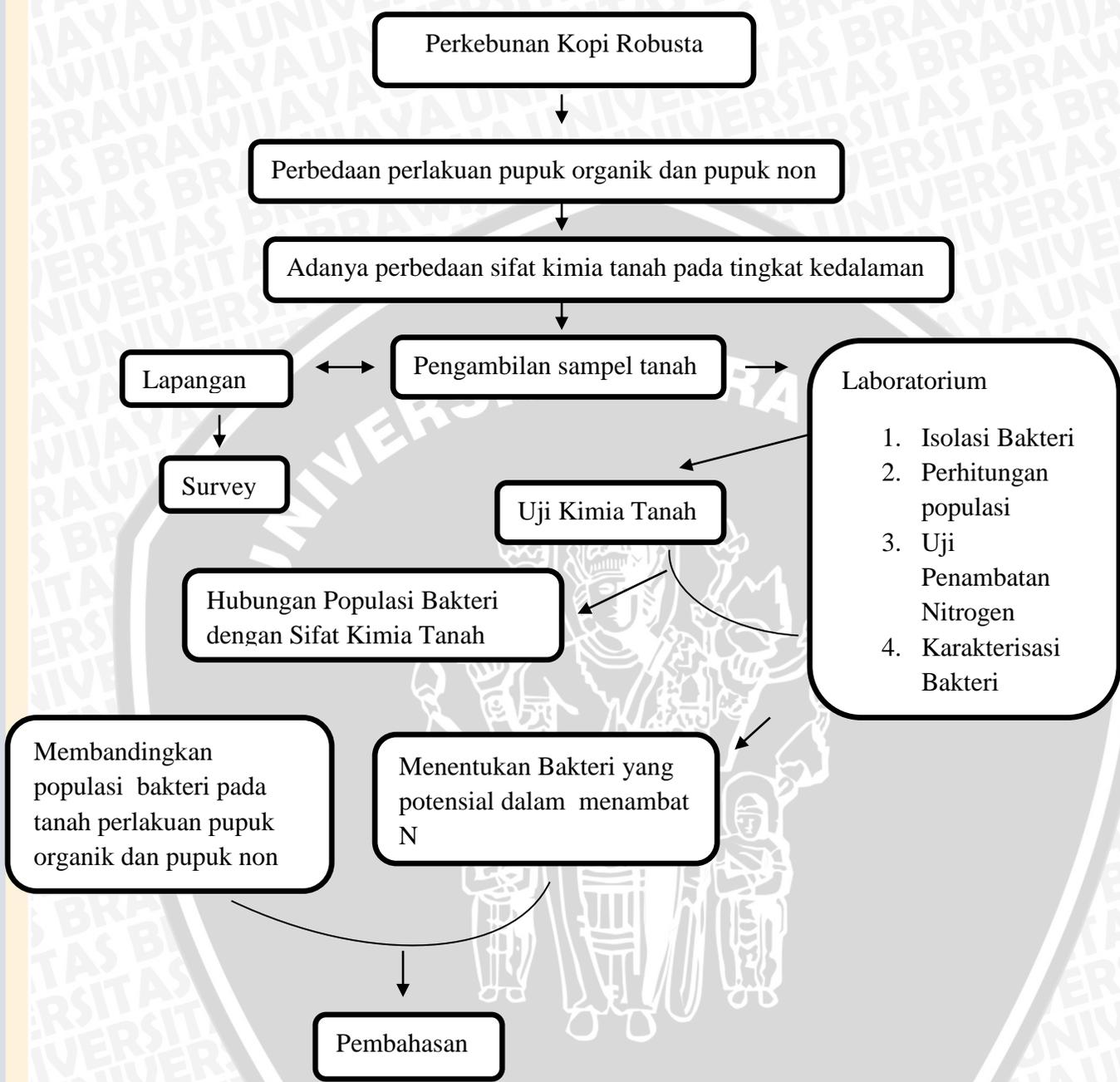
No.	Parameter Pengamatan	Metode	Waktu Pelaksanaan
1.	Kadar N total	Kjedahl	
2.	C Organik Tanah	Walkley dan Black	Awal
3.	pH tanah	Elektroda	
4.	Perhitungan Populasi Bakteri	<i>Total Plate Count (TPC)</i>	
5.	Uji aktivitas nitrogenase	<i>NFb semi padat</i>	Akhir
6.	Karakterisasi	Pewarnaan gram, morfologi	

### 3.6 Analisis Data

Pada penelitian ini menggunakan analisis uji t berpasangan dengan taraf 5% dan uji korelasi dengan menggunakan *software* SPSS 20.0 dan Microsoft Excel 2010.

### 3.7 Kerangka Pelaksanaan Penelitian

Berdasarkan penelitian yang dilaksanakan dapat disusun kerangka pelaksanaan penelitian yang meliputi tahapan survey, eksplorasi, dan karakterisasi bakteri. Pada perkebunan kopi Robusta terdapat perlakuan pupuk yang berbeda yaitu pupuk organik dan pupuk non organik. Dengan penggunaan pupuk kimia atau pupuk non organik secara terus menerus dapat merusak kualitas tanah secara fisika, kimia, maupun biologi. Penggunaan pupuk organik dan sistem pertanian organik maka dapat dikatakan bisa meningkatkan jumlah produksi, mengembalikan ekosistem tanah dan biodiversitas organisme. Dimana aktivitas organisme tanah khususnya mikroba tanah dapat berperan dalam peningkatan asupan nutrisi bagi tanaman (Gambar 6).



Gambar 6. Kerangka Pelaksanaan Penelitian.