

III. METODE PENELITIAN

3. 1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Februari 2016 sampai Juli 2016. Pengambilan sampel dilakukan pada tanah Ultisol di daerah Tenggarong, Kabupaten Kutai Kartanegara, Kalimantan Timur. Ekstrasi, isolasi dan identifikasi spora mikoriza di Laboratorium Biologi Tanah Jurusan Tanah Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya. Setelah didapatkan inokulum berupa spora mikoriza, kemudian dilakukan perbanyakan mikoriza di rumah kaca Jurusan Tanah, Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya.

3. 2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini untuk pengambilan contoh tanah adalah kompas, tali plastik, cangkul, kantong plastik, dan spidol serta kertas label. Alat untuk pengamatan di laboratorium adalah saringan 250 μm , 105 μm dan 53 μm , tabung sentrifuse, cawan petri, pinset spora, mikroskop, kaca preparat, dan kaca penutup. Alat yang digunakan untuk perbanyakan di rumah kaca berupa pot (aqua cup), dan sprayer.

Bahan yang digunakan dalam penelitian Ekstrasi spora, Isolasi dan identifikasi mikoriza adalah contoh tanah dari *rhizosfir* tanaman inang di tanah ultisol, aquadest sebagai pelarut dan air gula dengan konsentrasi 60%, sedangkan untuk menghitung infeksi mikoriza pada akar menggunakan bahan akar tanaman, KOH 10%, HCl 2% dan trypan blue dalam laktofenol 0.05 %. Bahan untuk perbanyakan mikoriza yaitu berupa batuan fosfat alam, tanah ultisol dan kertas saring.

3. 3 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap Faktorial (RALF) dengan 2 faktor perlakuan yaitu faktor pertama komposisi media perbanyakan (M) yang terdiri dari lima perlakuan dan faktor kedua jenis spora (S) yang terdiri dari dua perlakuan jenis spora serta menggunakan tanaman inang jagung

manis sebagai tanaman indikator. Setiap perlakuan diinokulasikan spora mikoriza sebanyak 20 spora/cup sesuai dengan masing-masing jenis spora. Dari 2 faktor tersebut, maka didapatkan 10 kombinasi perlakuan (Tabel 2) dan diulang sebanyak 3 kali ulangan sehingga didapatkan 30 unit percobaan. Perlakuan yang dilakukan dengan 2 faktor sebagai berikut :

Faktor I. Komposisi Media Tanam

M1 : 100 % Tanah Ultisol

M2 : 75 % Tanah Ultisol : 25 % Fosfat Alam

M3 : 50 % Tanah Ultisol : 50 % Fosfat Alam

M4 : 25 % Tanah Ultisol : 75 % Fosfat Alam

M5 : 100 % Fosfat Alam

Faktor II. Jenis Spora

S1 : *Glomussp.*

S2 : *Acaulospora sp.*

Tabel 2. Perlakuan Penelitian

No	Kode	Perlakuan
1.	S1M1	100 % Tanah Ultisol + <i>Acaulospora sp.</i>
2.	S1M2	75 % Tanah Ultisol : 25 % Fosfat Alam + <i>Acaulospora sp.</i>
3.	S1M3	50 % Tanah Ultisol : 50 % Fosfat Alam + <i>Acaulospora sp.</i>
4.	S1M4	25 % Tanah Ultisol : 75 % Fosfat Alam + <i>Acaulospora sp.</i>
5.	S1M5	100 % Fosfat Alam + <i>Acaulospora sp.</i>
6.	S2M1	100 % Tanah Ultisol + <i>Glomus sp.</i>
7.	S2M2	75 % Tanah Ultisol : 25 % Fosfat Alam + <i>Glomus sp.</i>
8.	S2M3	50 % Tanah Ultisol : 50 % Fosfat Alam + <i>Glomus sp.</i>
9.	S2M4	25 % Tanah Ultisol : 75 % Fosfat Alam + <i>Glomus sp.</i>
10.	S2M5	100 % Fosfat Alam + <i>Glomus sp.</i>

3. 4 Pelaksanaan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan 3 tahap yaitu (1) Pengambilan sampel tanah dan akar, (2) Analisis mikoriza di laboratorium yaitu ekstraksi spora, isolasi, identifikasi spora dan analisis Persentase Infeksi Akar, (3) Perbanyak spora yang dilakukan dengan kultur spora pada berbagai komposisi media.

3. 4. 1 Pengambilan Sampel Tanah dan Akar

Pengambilan sampel tanah dan akar dari lapangan merupakan kegiatan untuk menyiapkan bahan atau materi yang akan digunakan untuk menganalisis mikoriza. Pengambilan sampel tanah dan akar dilakukan dengan metode pengambilan sampel nonproporsional yaitu secara acak. Pengambilan sampel tanah dan akar diambil berdasarkan masing-masing tegakan tanaman yang ada pada tanah ultisol.

Pengambilan sampel tanah diambil pada 3 lokasi dengan masing-masing komposisi tanaman yang berbeda. Pada lokasi 1 terdapat tanaman karet, durian dan cempedak. Lokasi 2 diambil pada tanaman sawit, pisang dan durian, sedangkan untuk lokasi 3 diambil pada tanaman singkong dan terong. Pada masing-masing lokasi, tiap jenis tanaman diambil 3 sampel pada daerah *rhizosfir* dengan kedalaman 10-30 cm.

Pada tiap tegakan tanaman, diambil 3 titik di daerah *rhizosfir* tanaman masing-masing sebanyak 2 kg, sehingga didapatkan sampel per tanaman sebanyak 6 kg. Kemudian masing-masing sampel tersebut dikomposit menjadi satu dan diaduk sampai homogen. Setelah dikomposit, maka untuk sampel masing-masing tanaman diambil sebanyak 2 kg yang akan digunakan untuk analisis mikoriza, analisis dasar dan media perbanyakkan mikoriza.

Bersamaan dengan pengambilan sampel tanah, disertakan pula akar tanaman inang yang ada di lokasi. Pengambilan sampel akar dilakukan dengan memilih akar serabut dari masing-masing pohon. Kemudian dimasukkan kedalam plastik dan diberi label sesuai dengan jenis pohon dan lokasi pengambilan serta segera dibawa ke laboratorium untuk disimpan dalam larutan FAA (Formalin Alkohol Aceton).

3. 4. 2 Pengamatan Jumlah dan Identifikasi Spora Mikoriza

Analisis mikoriza yang dilakukan di laboratorium berupa ekstraksi spora, isolasi dan identifikasi spora. Sampel tanah yang digunakan untuk analisis mikoriza yaitu sampel tanah yang berasal dari daerah *rhizosfir* tanaman (tanah yang berasal dari sekitar daerah perakaran sehingga langsung dipengaruhi oleh akar tanaman). Metode yang digunakan dalam ekstraksi dan isolasi spora yaitu metode Ayakan Basah (*Wet Sieving*). *Wet Sieving* digunakan untuk mengisolasi spora mikoriza

sehingga terpisah dengan tanah dan memudahkan untuk perhitungan jumlah mikoriza dan identifikasi mikoriza.

Metode *Wet Sieving* dilakukan dengan tahapan berikut : (1) Membuat suspensi tanah dengan 100 g sampel tanah yang dilarutkan dengan aquadest secukupnya (sekitar 500 – 800 ml), (2) Suspensi tersebut disaring menggunakan saringan bersusun yaitu 250 μm , 105 μm dan 45 μm , (3) Endapan pada saringan terakhir dibilas menggunakan aquadest, (4) Kemudian endapan tersebut dicampur dengan 200 ml aquades didalam *beaker glass*, (5) Setelah dicampur, dilakukan pengadukan hingga merata dengan hati-hati agar tidak merusak spora, (6) Kemudian suspensi tersebut dimasukkan kedalam 12 tabung sentrifuse dan dibagi secara merata sampai batas $\frac{3}{4}$ tabung , (6) Kemudian ditambahkan larutan gula 60% kurang lebih 10 ml dan disentrifuse dengan kecepatan 2700 rpm selama 2 menit untuk memisahkan spora dari bahan pengotor lainnya, bagian teratas yang paling bening diambil menggunakan pipet hisap dan diletakkan pada saringan 45 μm , (7) Endapan dibilas menggunakan aquadest untuk menghilangkan larutan gula yang mengikat spora, (8) Kemudian endapan tersebut disemprot menggunakan aquadest dan diletakkan pada cawan petri, (9) Kemudian dilakukan pengamatan menggunakan mikroskop (Nusantara *et al.*, 2012).

3. 4. 3 Pengamatan Persentase Infeksi (Kolonisasi) Akar

Untuk perhitungan infeksi mikoriza pada akar dilakukan menggunakan sampel akar yang diambil di lapangan. Pengamatan infeksi dilakukan dengan teknik pembersihan dan pewarnaan akar (Brundrett *et al.*, 1996).

Pewarnaan akar dilakukan dengan tahapan yaitu memilih akar halus (rambut akar) segar dengan diameter antara 0.2 hingga 2 mm, dicuci dengan air mengalir hingga bersih. Akar yang sudah dicuci bersih dimasukkan kedalam KOH 10 % dan dibiarkan selama 24 jam. Tujuannya adalah untuk mengeluarkan isi sitoplasma dari sel akar sehingga akan memudahkan dalam pengamatan infeksi MA. Akar akar terlihat berwarna putih atau pucat. Akar tersebut dicuci dengan air mengalir yang kemudian direndam dalam larutan HCl 2% selama satu malam. Lalu setelah direndam, akar dicuci kembali dengan air mengalir kemudian akar direndam dalam

larutan *Trypan Blue* 0,05 %, selanjutnya dalam larutan *Lacto Glycerol* (Nusantara *et al.*, 2012).

Pengamatan total infeksi dilakukan dengan cara mengambil 10 potong akar yang sudah direndam dalam larutan *Lacto Glycerol* disusun di atas kaca preparat dan diamati dibawah mikroskop (Lampiran 25). Lalu diamati akar yang terinfeksi pada potongan akar tersebut serta dimasukkan dalam kriteria persentase akar yang terinfeksi (Tabel 3).

Menurut Musfal (2008), persentase akar yang terinfeksi dapat dihitung menggunakan rumus berikut :

$$\% \text{ Akar terinfeksi} = \frac{\text{Jumlah akar yang terinfeksi}}{\text{Jumlah seluruh akar yang diamati}} \times 100\%$$

Tabel 3. Kriteria efektivitas derajat infeksi mikoriza (Brundett *et al.*, 1996)

No	Derajat Infeksi	Kriteria
1.	0 - 5	Sangat Rendah
2.	>5 - 25	Rendah
3.	>25 - 50	Sedang
4.	>50 - 75	Tinggi
5.	>75 - 100	Sangat Tinggi

3. 4. 4 Persiapan Media Tanam

Dalam tahap ini dilakukan persiapan media tanam untuk perbanyakan terlebih dahulu. Bahan media yang digunakan yaitu tanah ultisol dan fosfat alam. Tanah ultisol diambil dari Loa Kulu, Tenggarong Kalimantan Timur yang diambil secara komposit pada tiga lahan yang berbeda. Fosfat alam berasal dari penambangan fosfat alam di daerah Sumenep, Madura, Jawa Timur.

Sebelum melakukan pencampuran masing-masing komposisi media, tanah ultisol disterilkan terlebih dahulu menggunakan metode uap (Cahyani, 2009). Tanah ultisol sebelumnya dimasukkan kedalam plastik *polypropylene*, kemudian disterilkan dengan dipanaskan (dikukus) selama 2 jam hari⁻¹ selama 3 hari berturut-turut dengan suhu 100 °C. Kemudian dibiarkan sampai dingin, lalu diaduk

(dikompositkan) hingga merata dan dihaluskan menggunakan mesin *grinding* sebelum dimasukkan kedalam *cup* media.

Persiapan fosfat alam yaitu batuan fosfat alam dihaluskan terlebih dahulu menggunakan mesin *grinding* lalu diayak menggunakan ayakan 2 mm agar ukuran yang digunakan sebagai media homogen. Setelah kedua bahan dipersiapkan, kemudian dilakukan pencampuran sesuai perlakuan dan diaduk hingga merata. Masing-masing berat media yang digunakan yaitu dengan komposisi kedua bahan media sebanyak 500 g dan dilebihkan masing-masing 100 g untuk sampel analisis awal (Analisis P-tersedia dan P-total) masing-masing komposisi media. Setelah masing-masing komposisi media sudah disiapkan, kemudian dimasukkan kedalam *cup* media dan disusun pada rak yang sudah disediakan sesuai dengan masing-masing letak perlakuan secara acak.

3. 4. 5 Persiapan Tanaman Inang

Tanaman Inang yang digunakan adalah benih jagung manis (*Zea Mays Saccharata*) dengan varietas Bonanza F1 yang sudah diberi fungisida. Benih-benih dicuci dan direndam aquades steril selama 5 jam. Sebelum dilakukan penanaman, benih tersebut disemaikan terlebih dahulu dengan ditata dalam wadah yang sudah dialasi dengan kapas dan ditutup dengan tisu, kemudian diberikan air untuk menciptakan kondisi lembab. Kondisi lembab dipertahankan selama 3 hari, selanjutnya benih dipilih yang memiliki ukuran seragam dan siap dipindahkan kedalam media tanam (Proborini, 2013).

3. 4. 6 Perhitungan Kadar Air Komposisi Media

Dalam tahap ini dilakukan perhitungan kadar air untuk mengetahui kadar air yang terdapat pada masing-masing komposisi media tanam. Masing-masing komposisi media tanam yang dihitung kadar airnya yaitu Tanah Ultisol dan Fosfat Alam.

Kegiatan dilakukan di Laboratorium Fisika Tanah Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya, yaitu dengan menimbang masing-masing sampel sebesar 50 gr. Selanjutnya tanah dimasukkan kedalam oven dengan suhu 110 °C selama 24 jam.

Kemudian tanah ditimbang untuk mendapatkan nilai Berat Kering Oven (BKO), selanjutnya dilakukan perhitungan kadar air dengan rumus berikut (Enviati, 2009).

$$\text{Kadar Air Sampel} = \frac{(\text{Bobot basah} + \text{Cawan}) - (\text{Bobot kering oven} + \text{Cawan})}{\text{Bobot kering oven}}$$

Setelah mengetahui kadar air, maka dapat dilakukan perhitungan massa padatan setara kering oven masing-masing media sesuai dengan perlakuan masing-masing (Lampiran 2).

3. 4. 7 Penanaman dan Inokulasi

Setelah dilakukan penyiapan media, kemudian akan dilakukan penanaman dan inokulasi pada benih. Bahan yang digunakan dalam tahap ini berupa spora mikoriza hasil isolasi yang dilakukan pada tahap kedua dan benih jagung manis yang sudah dikecambahkan. Jenis mikoriza yang digunakan yaitu *Glomus sp* dan *Acaulospora sp.*, yang sudah dikumpulkan agar dapat digunakan sebagai inokulum pada tahap kultur atau perbanyakan.

Pengaplikasian spora mikoriza dilakukan dengan cara pemberian langsung inokulum berupa spora (Simanungkalit, 2003). Terlebih dahulu spora teridentifikasi dikumpulkan dalam suatu wadah *pial film* yaitu sebanyak 20 spora. Lalu benih jagung yang sudah dikecambahkan dipilih ukuran yang sama (homogen) agar pertumbuhan awal tanaman sama.

Pengaplikasian MA dilakukan setelah dibuat lubang tanam pada masing-masing media sekitar 5 cm. Lalu kertas saring dimasukkan kedalam lubang dibentuk corong (Gambar 5), tujuannya adalah saat benih berkecambah, diharapkan dapat bersinggungan langsung dengan spora. Setelah kertas saring dimasukkan kedalam lubang tanam, lalu benih dimasukkan dalam kertas saring. Spora yang sudah dikumpulkan didalam pial film dituangkan kedalam lubang tanam yang sudah terdapat benih sehingga mikoriza dapat langsung menginfeksi. Setelah dilakukan aplikasi spora, kemudian lubang tanam ditutup menggunakan media tanam (Gambar 5).



Gambar 5. Cara aplikasi MA (*Mikoriza Arbuskula*)

3. 4. 8 Pemeliharaan Tanaman

Pemeliharaan tanaman meliputi penyiraman, penyiangan, dan penyulaman pada setiap perlakuan. Penyiraman dilakukan 2 kali yaitu pagi dan sore untuk mempertahankan keadaan kapasitas lapangan dan berdasarkan bobot tanah dalam kondisi kapasitas lapang sebagai dasar penyiraman selanjutnya. Dalam penyiraman, sebelumnya dilakukan pengukuran kapasitas lapangan masing-masing media yaitu dengan menjenuhkan terlebih dahulu masing-masing media lalu dibiarkan selama 12 jam. Kemudian media tersebut ditimbang untuk mengetahui kapasitas lapangannya (Lampiran 3).

Penyiangan dilakukan satu minggu sekali yaitu membersihkan gulma yang ada disekitar tanaman inang agar tidak mengganggu pertumbuhan tanaman jagung manis dengan cara mekanik (dicabut) menggunakan tangan. Penyulaman dilakukan bila ada tanaman yang mati. Penyulaman dilakukan dengan umur bibit tanaman yang sama agar pertumbuhannya sesuai dengan umur tanaman yang digantikan.

3. 5 Pengamatan dan Pengumpulan Data

Setelah dilakukan perbanyakan mikoriza di rumah kaca, kemudian dilakukan pengamatan dan pengumpulan data pada masing-masing parameter pengamatan yang dilakukan pada mikoriza arbuskula meliputi jumlah spora dan persentase infeksi akar,

pada tanah diamati pH, P-tersedia dan P-total serta pada tanaman Inang diamati tinggi tanaman, jumlah daun dan bobot kering tanaman (Tabel 4).

Tabel 4. Parameter Pengamatan

No	Parameter Pengamatan	Metode Pengukuran	Waktu Pengamatan
1.	Jumlah Spora	Ayakan basah (<i>Wet sieving</i>)	42 HST
2.	Persentase Infeksi Akar	Pewarnaan Akar	42 HST
3.	Tinggi Tanaman	Kuantitatif	7, 14, 21, 28 35, dan 42 HST
4.	Jumlah Daun	Kuantitatif	7, 14, 21, 28 35, dan 42 HST
5.	pH	pH H ₂ O	Sebelum Tanam dan 42 HST
6.	P-tersedia	Spektrofotometri (Pengekstrak Bray-I dan Olsen)	Sebelum tanam dan 42 HST
7.	P-total	Spektrofotometri (Pengekstrak HCL 25%)	Sebelum tanam dan 42 HST
8.	Bobot Kering Tanaman	Gravimetri (Kering Oven)	42 HST

3. 5. 1 Pengamatan Jumlah Spora dan Persentase Infeksi Akar

Dalam pengamatan jumlah spora dan persentase infeksi akar dilakukan pada 42 HST. Sampel yang digunakan dalam pengamatan jumlah spora dan persentase infeksi akar yaitu media tanam masing-masing perlakuan dan sampel akar tanaman jagung.

Sampel dalam pengukuran jumlah spora yaitu masing-masing perlakuan diambil sampel sebanyak 100 g media⁻¹. Sampel diambil secara komposit dari keseluruhan daerah pada media sehingga diharapkan mampu mewakili masing-masing perlakuan.

Pengambilan sampel akar tanaman dilakukan dengan memanen tanaman jagung manis terlebih dahulu pada umur vegetatif (42 HST). Akar tanaman dipotong

dan diambil untuk ditimbang terlebih dahulu kemudian dilakukan pengamatan infeksi mikoriza pada akar dilaboratorium.

Metode yang digunakan dalam menghitung jumlah spora yaitu menggunakan Metode Ayakan Basah (*Wet Sieving*), sedangkan untuk perhitungan Infeksi pada akar tanaman inang menggunakan Metode Pewarnaan Akar yaitu menghitung persentase Infeksi Akar.

3.5.2 Pengamatan Pertumbuhan Tanaman

Pengamatan pertumbuhan jagung manis sebagai tanaman inang dilakukan pada tiap 1 minggu sekali yaitu pada umur 7, 14, 21, 28, 35, dan 42 HST. Pengamatan pertumbuhan tanaman dilakukan pada parameter tinggi tanaman dan jumlah daun secara kuantitatif (perhitungan secara langsung). Tinggi tanaman diukur dari pangkal batang bagian bawah sampai bagian teratas tanaman inang menggunakan penggaris. Jumlah daun yang dihitung pada daun yang masih segar dan terbentuk pada tanaman inang.

3.5.3 Pengamatan Sifat Kimia Tanah (P-total dan P-tersedia)

Pengamatan P-total dan P-tersedia dilakukan dengan pengambilan sampel media tanam yang akan digunakan sesuai dengan komposisi masing-masing perlakuan. Pengamatan P-total dilakukan pada awal sebelum tanam dan akhir (42 HST) dengan metode HCl 25%. Sedangkan untuk pengamatan P-tersedia dilakukan di akhir tanam yaitu pada 42 HST dengan metode Bray-I (jika pH media < 6.5) dan Olsen (jika pH media ≥ 6.5) (Eviati, 2009). Pengamatan P-total dan P-tersedia dilakukan di Laboratorium Kimia Jurusan Tanah Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya.

3.5.4 Pengamatan Bobot Kering Tanaman

Pengamatan bobot kering tanaman dilakukan untuk mengetahui pertumbuhan tanaman jagung pada masing-masing perlakuan. Pada pengamatan bobot kering tanaman, tanaman jagung manis dipanen pada umur 42 HST, kemudian dilakukan penimbangan bobot awal (bobot basah) masing-masing perlakuan. Kemudian masing-masing tanaman dimasukkan kedalam kertas untuk dioven pada suhu 80 °C

selama 48 jam. Lalu ditimbang bobot kering (berat kering) tanaman, kemudian dilakukan penghitung menggunakan rumus :

$$\text{Bobot kering tanaman} = \frac{\text{Bobot kering subcontoh (g)}}{\text{Bobot basah subcontoh (g)}} \times \text{Total bobot basah (g)}$$

3. 6 Analisis Data

Dari data yang telah didapatkan selanjutnya dilakukan tabulasi data dan perhitungan menggunakan MS. Excel. Data yang diperoleh dianalisis keragamannya (ANOVA) menggunakan *software Genstat*. Apabila ANOVA menunjukkan berbeda nyata, maka dilanjutkan dengan uji lanjut *Duncan's Multiple Range Test (DMRT)* taraf 5%. Untuk mengetahui pengaruh kedua variabel dilakukan uji korelasi dan regresi menggunakan software Ms. Excel.

