III. METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di rumah plastik dan Laboratorium Produksi Perkebunan Fakultas Pertanian Universitas Lampung dari bulan Oktober 2011 sampai dengan Juni 2012.

3.2 Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan adalah benih kelapa sawit (*germinated seed)* jenis dxP, inokulum spora FMA berupa campuran *Glomus* sp.1, *Glomus* sp.2, *Glomus* sp.3, *Gigaspora* sp., dan *Enterophospora* sp. (deskripsi masing-masing spesies disajikan pada Tabel 1), fungisida *basamid*, pupuk Urea dan NPK, pasir dan tanah (*top soil*) yang telah disterilkan secara fumigasi dengan bassamid, air, akuades, *lactophenol tryphan blue* 0,5 %, KOH 1 %, HCl 1%, dan alkohol.

Alat yang digunakan adalah mesin pengaduk tanah (*mollen*), timbangan digital, gelas ukur, oven, mikroskop stereo dan majemuk, pinset spora, gunting, tabung plastik 35 mm (tabung film), para film, kaca preparat, polybag, cangkul, alat pengayak tanah, ember, meteran, dan alat tulis.

3.3 Metode Penelitian

Untuk menjawab pertanyaan dalam perumusan masalah dan untuk menguji hipotesis, rancangan perlakuan disusun secara faktorial (4 x 4). Faktor pertama adalah waktu inokulasi FMA pada bibit kelapa sawit (W), yaitu saat fase kecambah (w_0) , bibit berumur 1 bulan (w_1), bibit berumur 2 bulan (w_2), dan bibit berumur 3 bulan (w_3). Faktor kedua adalah dosis inokulum spora FMA (D) yang terdiri atas 4 taraf, yaitu kontrol (d_0), 200 spora (d_1), 400 spora (d_2), dan 600 spora (d_3).

Perlakuan diterapkan pada petak percobaan dalam rancangan kelompok teracak sempurna (RKTS) (Gambar 8). Pengelompokan berdasarkan keseragaman tinggi bibit. Setiap kombinasi perlakuan diulang sebanyak tiga kali dan setiap satuan percobaan terdiri atas satu polybag yang masing-masing berisi satu bibit kelapa sawit. Kesamaan ragam antar perlakuan diuji dengan Uji Bartlett. Kemenambahan data diuji dengan uji Tukey. Jika asumsi terpenuhi, data dianalisis ragam. Pemisahan nilai tengah diuji dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT). Peluang untuk melakukan kesalahan jenis pertama ditentukan sebesar 0,05.

Ulangan 2				Ulangan 1				Ulangan 3			
w_0d_0	w_1d_0	w_3d_0	w_3d_1	w_1d_3	w_2d_1	w_0d_2	w_0d_1	w_1d_1	w_1d_3	w_2d_0	w_0d_2
w_2d_3	w_2d_1	w_1d_1	w_3d_3	w_0d_0	w_1d_0	w_2d_3	w_3d_1	w_1d_2	w_2d_3	w_3d_1	w_2d_2
w_1d_3	w_2d_0	w_3d_2	w_0d_1	w_2d_0	w_3d_0	w_0d_3	w_1d_1	w_3d_3	w_3d_2	w_0d_3	w_3d_0
w_0d_3	w_2d_2	w_1d_2	w_0d_2	w_1d_2	w_3d_2	w_2d_2	w_3d_3	w_0d_0	w_1d_0	w_2d_1	w_0d_1

Gambar 8. Tata letak percobaan di rumah plastik.

Keterangan:

waktu inokulasi (w):

w_0 = kecambah (germinated seed)
w_1 = Bibit berumur 1 bulan
w_2= Bibit berumur 2 bulan
w_4 = Bibit berumur 3 bulan

dosis spora FMA (d):

d_1 = 200 spora
d_1 = 200 spora
d_2 = 400 spora
d_3 = 600 spora

3.4 Pelaksanaan Penelitian

3.4.1 Sterilisasi Media

Media tanam yang digunakan adalah pasir dan tanah. Media pasir digunakan pada saat *pre nursery*, sedangkan tanah digunakan pada saat *main nursery*. Kedua media tersebut disterilkan dengan fumigasi menggunakan *basamid*. Dosis *basamid* yang digunakan adalah 50 g untuk setiap 200 kg pasir atau tanah. Pencampuran *basamid* dengan pasir atau tanah dilakukan dengan *mollen* selama 15 menit.

Media pasir untuk *pre nursery* dimasukan kedalam polybag berukuran 7 x 15 cm. Media tanah untuk *main nursery* dimasukan ke dalam polybag berukuran 18 x 25 cm dan dilakukan inkubasi selama 30 hari. Setelah 30 hari, media disiram dengan

air sampai kapasitas lapang untuk menghilangkan efek fumigasi. Media tanam siap digunakan setelah dibiarkan selama 2 minggu.

3.4.2 Penanaman di *Pre Nursery*

Benih kelapa sawit yang telah berkecambah ditanam pada media dalam polybag (satu benih per polibag) dan diletakkan di rumah kaca. Setelah bibit berumur 4 minggu, dilakukan pemupukan setiap minggu menggunakan pupuk Urea dengan dosis 2 g/liter untuk 100 bibit.

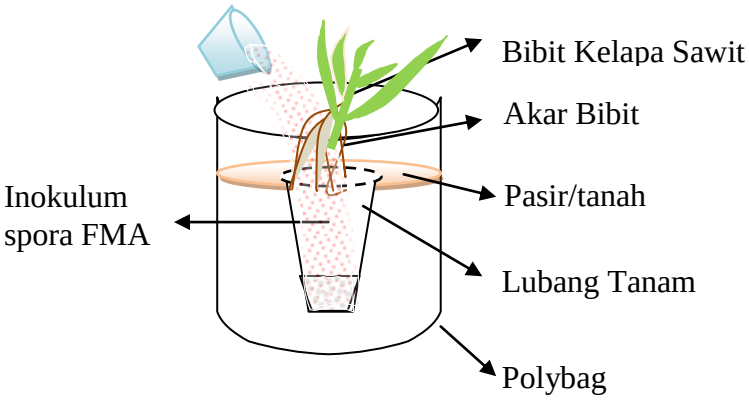
3.4.3 Inokulasi Fungi Mikoriza Arbuskular

Inokulum FMA yang digunakan dalam penelitian ini adalah campuran spora *Glomus* sp.1, *Glomus* sp.2, *Glomus* sp.3, *Gigaspora* sp., dan *Enterophospora* sp. Inokulum tersebut berupa pasir dan zeolit yang mengandung 400 spora FMA untuk setiap 50 gram inokulum.

Inokulasi FMA pada bibit kelapa sawit dilakukan pada empat waktu yang berbeda, yaitu saat fase kecambah (w_0) , bibit berumur 1 bulan (w_1), bibit berumur 2 bulan (w_2), dan bibit berumur 3 bulan (w_3). Pada setiap waktu inokulasi, dosis inokulum yang diberikan adalah kontrol (d_0), 200 spora (d_1), 400 spora (d_2), dan 600 spora (d_3). Inokulasi pada saat kecambah dilakukan bersamaan dengan penanaman benih di *pre nursery*. Inokulasi tahap ke 2 dan 3 dilakukan pada saat benih bibit masih di *pre nursery*. Pada inokulasi keempat dilakukan bersamaan dengan transplanting bibit kelapa sawit dari *pre nursery* ke *main nursery*.

Proses inokulasi spora FMA diawali dengan mengeluarkan akar bibit dari polybag. Pada tahap ini diusahakan bagian-bagian akar tetap utuh agar tidak

mengganggu pertumbuhan bibit. Kemudian dibuat lubang tanam pada media di polybag yang ukurannya disesuaikan dengan morfologi akar bibit. Inokulum FMA ditaburkan merata pada akar yang terletak di atas lubang tanam (Gambar 9). Selanjutnya, perakaran bibit disusun terlebih dahulu sebelum lubang tanam ditutup dengan media. Hal itu dilakukan agar perakar bibit tetap utuh.



Gambar 9. Cara inokulasi spora FMA pada bibit kelapa sawit di *pre nursery* dan *main nursery*.

3.4.3 Penanaman di *Main Nursery*

Transplanting bibit dari *pre nursery* ke *main nursery* dilakukan setelah bibit berumur 3 bulan. Penanaman bibit diawali dengan membuat lubang tanam pada media yang ada di polibag main nursery. Ukuran lubang tanam disesuaikan dengan morfologi akar bibit. Selanjutnya, bibit pada polybag *pre nursery* dibongkar dan diusahakan perakaran bibit tetap utuh. Kemudian, bibit ditanam pada lubang tanam dengan perakaran bibit disusun terlebih dahulu agar akar bibit tidak rusak dan patah. Pada tahap ini juga mulai diterapkan tata letak percobaan (Gambar 8) dan inokulasi FMA untuk bibit berumur 3 bulan.

3.5 Pemeliharaan

Pemeliharaan yang dilakukan selama penelitian sebagai berikut:

1. Penyiraman

Penyiraman dilakukan ketika media tanam mengadung air kurang dari kapasitas lapang. Air disiramkan pada media tanam hingga air keluar dari lubang polybag. Hal tersebut sebagai parameter media tanam telah mengandung air lebih dari kapasitas lapang.

2. Penyiangan gulma

Penyiangan gulma dilakuan secara mekanis dengan mencabut gulma yang tumbuh di permukaan media tanam pada polybag.

3. Perbaikan aerasi media tanam

Perbaikan aerasi media tanam dilakukan dengan mengemburkan permukaan media tanam sedalam 1,5 – 2 cm.

4. Pengendalian hama

Hama yang sering menyerang bibit kelapa sawit pada penelitian adalah belalang (*Dissosteira carolina*). Hama dikendalikan secara manual dengan menangkap dan memusnahkannya.

5. Pengendalian penyakit

Penyakit yang menyerang pada penelitian ini adalah antraknosa yang menimbulkan gejala bercak cokelat pada daun bibit kelapa sawit. Penyakit

antraknosa pada penelitian ini disebabkan oleh fungi *Botryodiplodia* spp dan mulai menyerang setelah dilakukan *transplanting*. Pada awalnya pengendalian dilakukan dengan mengatur jarak tanam dan penyiraman optimal agar iklim mikro disekitar tanaman tidak lembab. Keadaan yang lembab yang akan memacu perkembangan penyakit ini. Ternyata pengendalian ini tidak mampu menghambat penyebaran antraknosa sehingga daun bibit kelapa sawit diolesi dengan alkohol 70%. Pengendalian dengan menggunakan alkohol ternyata tidak mampu menekan perkembangan *Botryodiplodia* sp sehingga dilakukan pengendalian dengan fungisida Dithane M-45 80 WP berbahan aktif *Mankozeb* 80 %. Aplikasi dilakukan hanya pada satuan percobaan yang terserang. Konsentrasi formulasi yang digunakan yaitu 1,5 g/liter. Formulasi tersebut dioleskan pada daun menggunakan tisu.

6. Pemupukan

Jenis dan dosis pupuk yang digunakan pada penelitian ini disesuaikan dengan pertumbuhan bibit. Pemupukan dimulai ketika tanaman berumur 4 minggu menggunakan pupuk Urea dan diganti dengan NPK (15:7:8) ketika berumur 13 minggu atau setelah dilakukan *transplanting*. Jenis dan dosis pupuk yang digunakan terpapar pada Tabel 2.

Tabel 2. Jenis dan dosis pupuk yang digunakan dalam penelitian.

Umur Bibit kelapa Sawit (Minggu)	Jenis Pupuk	Dosis
4-12	Urea	2 g / liter untuk 100 bibit/minggu
13-16	NPK (15:7:8)	0,95 g
17-20	NPK (15:7:8)	1,90 g
21-24	NPK (15:7:8)	4 g
25-28	NPK (15:7:8)	5 g
29-32	NPK (15:7:8)	6 g

3.6 Pengamatan

Setelah bibit berumur 32 minggu setelah semai, untuk menguji kesahihan kerangka pemikiran dan hipotesis dilakukan pengamatan terhadap variabel-variabel sebagai berikut:

1. *Tinggi tanaman*

Tinggi tanaman diukur dari permukaan tanah sampai ujung daun terpanjang. Pengukuran dilakukan menggunakan penggaris dalam satuan cm. Pengukuran tinggi tanaman dimulai setelah bibit kelapa sawit berumur 4 bulan sampai 8 bulan setelah semai (panen).

2. *Jumlah daun*

Jumlah daun yang telah membuka sempurna pada setiap bibit dihitung. Penghitungan jumlah daun dimulai dari bibit berumur 4 bulan hingga 8 bulan setelah semai (panen).

3. *Tingkat kehijauan daun*

Kehijaun daun diukur dengan menggunakan klorofilmeter. Daun yang diambil sampelnya adalah daun termuda yang telah membuka penuh. Pengukuran kehijaun daun dilakukan pada 6 titik pada setiap sampel daun, sehingga nilai tingkat kehijaun daun merupakan rerata dari 6 titik pengukuran tersebut.

4. *Bobot segar tajuk*

Seluruh tajuk pada bibit kelapa sawit dipotong, lalu ditimbang dengan timbangan digital dalam satuan gram. Tajuk bibit merupakan organ tanaman yang tumbuh keatas, dimulai dari pangkal batang hingga ujung daun.

5. *Bobot kering tajuk*

Seluruh tajuk pada bibit kelapa sawit yang telah dipotong, lalu dikeringkan menggunakan oven. Tajuk dikeringkan hingga bobotnya konstan pada suhu 80^0C. Setelah kering, tajuk ditimbang dengan timbangan digital dalam satuan gram.

6. *Bobot segar akar*

Seluruh akar pada bibit kelapa sawit dipotong lalu ditimbang dengan timbangan digital dalam satuan gram. Akar bibit kelapa sawit dipotong dari titik tumbuh akar pada pangkal batang.

7. *Jumlah akar Primer*

Akar primer merupakan akar yang tumbuh pada pangkal batang kelapa sawit. Semua akar primer yang tumbuh tersebut dihitung.

8. *Volume akar*

Seluruh akar pada bibit kelapa sawit yang telah dipotong, lalu dimasukkan kedalam gelas ukur yang telah diisi air. Penambahan volume air pada gelas ukur merupakan volume akar.

9. *Bobot kering akar*

Seluruh akar bibit kelapa sawit dipotong pada bagian titik tumbuh akar (pangkal batang). Kemudian, dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 80^0C. Setelah bobotnya konstan, akar ditimbang dengan timbangan digital dalam satuan gram.

10. *Persentase infeksi akar*

Penghitungan persentase infeksi akar oleh FMA diawali dengan mengambil akar sekunder dan tersier secara acak (± 20 helai), dicuci dengan air sampai bersih dan dimasukkan ke dalam botol film. Botol film yang berisi akar tersebut diisi dengan larutan KOH 10% dan dikukus dalam *water bath* dengan suhu ± 80 ^{0}C selama ± 30 menit. Hal itu dilakukan untuk membersihkan sel dari sitoplasma. Selanjutnya, Larutan KOH dibuang dan akar dicuci kembali dengan dengan air hingga bersih, lalu direndam dalam larutan HCl 1%. Kemudian, akar dikukus kembali dalam *water bath* pada suhu ± 80 ^{0}C. Setelah ± 15 menit, larutan HCl dibuang dan ditambahkan larutan *trypan blue* 0,05% (0,5 g *trypan blue* + 450 ml *glycerol* + 500 ml aquades + 50 ml HCl 1%). Akar tersebut dikukus kembali dalam *water bath* pada suhu ± 80 ^{0}C selama 10 menit. Akar yang telah diwarnai tersebut dipotong sepanjang ±2 cm, kemudian di letakkan di atas preparat untuk diamati di bawah mikroskop majemuk dengan perbesaran 100 kali. Adanya infeksi ditandai dengan adanya struktur pembentuk mikoriza (hifa, vesikel, dan arbuskular) pada jaringan akar dan dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Infeksi akar (\%)} = \frac{\Sigma \text{ pengamatan yang positif terinfeksi}}{\Sigma \text{ total pengamatan}} \times 100$$