

### **III. BAHAN DAN METODE**

#### *Penelitian I. Populasi dan Keanekaragaman Cendawan Mikoriza Arbuskular pada Lahan Sayuran dan Semak*

##### **3.1 Tempat dan Waktu Penelitian**

Sampel tanah untuk penelitian ini diambil dari Desa Bodong Jaya, Kecamatan Sumber Jaya, Lampung Barat. Sampel tanah ini dibawa ke Laboratorium Produksi Perkebunan Fakultas Pertanian Universitas Lampung untuk diproses lebih lanjut. Penelitian ini dimulai dari Mei sampai dengan September 2007.

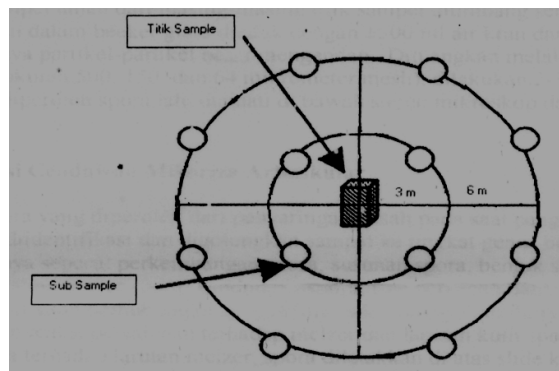
##### **3.2 Alat Dan Bahan**

Alat yang digunakan adalah tali plastik, cetok, beker glass, saringan, spatula kaca, pinset spora, cawan petri, slide, cover glass, tabung film, timbangan, dan mikroskop.

Bahan yang dipakai adalah sampel tanah top soil (0-20 cm), pasir, KOH 10%, HCl 1%, Gliserol, PVLG, Melzer, Aquades, Trypan blue 0,03 % dan benih jagung, sorgum, *Centrocoma pubescen* CP, *Calopogonium mucunoides* CM dan *Pureraria javanica* PJ.

### 3.3 Pelaksanaan Penelitian

Sampel tanah diambil dari dua tipe lahan yaitu lahan yang ditanami sayur dan dari lahan semak (tidak produktif, dibiarkan lebih dari 10 tahun). Pada setiap tipe penggunaan lahan diambil 6 titik sampel. Pengambilan sampel tanah di setiap titik sampel dilakukan menggunakan desain kuadrat lingkaran dengan jari-jari 3 m dan 6 m (dapat dilihat pada Gambar 3).



Gambar 3. Cara pengambilan 12 sub sampel pada setiap titik sampel

Sampel tanah topsoil diambil dari 12 titik dengan kedalaman 0-20 cm dengan menggunakan cetok dan kemudian disatukan. Sampel- sampel tersebut kemudian dimasukkan ke dalam kantong plastik berlabel dan dibawa ke laboratorium. Setelah sampai di laboratorium, penghitungan jumlah spora awal dilakukan untuk setiap sampel tanah, dan pada setiap sampel yang didapat di kultur trapping dengan tanaman inang jagung, sorgum, PJ, CP, serta CM.

### **3.4. Perhitungan Jumlah Spora dengan Metode Penyaringan Basah dan identifikasi spora**

Tanah yang diperoleh dari masing-masing titik sampel ditimbang sebanyak 50 g, dimasukkan ke dalam gelas beker ukuran 1.000 ml, kemudian ditambahkan  $\pm$  500 ml air kran, diaduk rata, dan didiamkan selama 10 detik supaya partikel-partikel besar mengendap. Campuran tanah tersebut dituangkan melalui rangkaian saringan tanah mikro berukuran 500, 250, 150 dan 63 mikrometer, dilakukan sebanyak 5 kali. Spora yang tersaring pada masing-masing saringan dipindahkan ke cawan petri dan diamati di bawah mikroskop stereo untuk dihitung secara manual dan diidentifikasi.

Identifikasi spora dilakukan berdasarkan ukuran, warna, ornamen spora, dan ada tidaknya reaksi spora terhadap larutan Melzer. Proses identifikasi dilakukan 2 tahap yaitu:

1. Spora-spora dalam cawan petri diamati di bawah mikroskop stereo, kemudian spora-spora dipisahkan berdasarkan warna dan ukuran ke dalam masing-masing gelas arloji dengan bantuan pinset spora. Setelah itu spora-spora dalam gelas arloji kembali diamati di bawah mikroskop stereo. Warna, ukuran (kecil, sedang dan besar), dan ciri-ciri khasnya dicatat.
2. Spora kemudian dipindahkan ke atas gelas preparat dan ditetesi dengan larutan Melzer dan PVLG. Preparat kemudian ditutup dengan penutup dan ditekan agar spora pecah dan bereaksi dengan melzer. Pengerjaan dilakukan di bawah mikroskop stereo dan perubahan warna spora diamati.

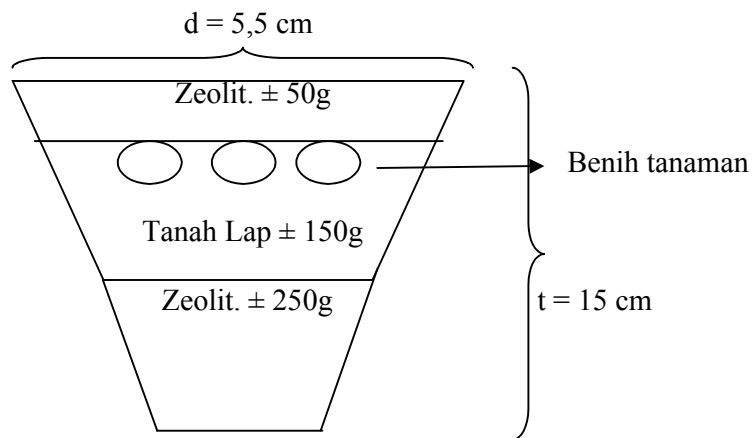
### **3.5 Metode penelitian untuk kultur trapping**

Rancangan perlakuan yang digunakan adalah rancangan faktorial (5x12) yaitu 5 jenis tanaman inang dan 12 jenis tanah asal dari dua tipe penggunaan lahan. Perlakuan diulang sebanyak 4 kali dan diterapkan pada satuan percobaan dengan menggunakan rancangan kelompok teracak sempurna (RKTS). Data yang diperoleh diuji dengan Uji Barlett untuk menguji homogenitas antar perlakuan. Kemenambahan data digunakan uji Tukey. Jika asumsi dipenuhi, data dianalisis ragam dan dilanjutkan dengan pemisahan nilai tengah menggunakan uji BNT pada taraf 5%.

### **3.6 Tehnik kultur trapping**

Perbanyakan CMA dilakukan dengan metode kultur trapping untuk memperoleh spora dengan viabilitas yang tinggi. Tanaman inang yang akan digunakan untuk kultur trapping adalah jagung, sorgum, CP, CM, CM serta PJ.

Benih tanaman inang yang telah disterilkan ditanam di dalam pot gelas (pop ice diameter 5,5 cm) yang berisi media zeolit, serta tanah dari lapang. Pada setiap pot, lapisan paling bawah diberi zeolit  $\pm 250$  g, di atas zeolit diletakkan  $\pm 150$  g sampel tanah dari lapangan dan pada bagian paling atas kembali diberikan zeolit sebanyak 50 g. Bagian luar pot diberi tutup polybag yang diasumsikan agar tanaman seperti ditanam di lapangan dan menyerap panas sehingga spora dapat optimum berkembang pada media.



Gambar 4. Teknik kultur trapping

Tanaman dipelihara di rumah kaca sampai umur 4 bulan. Pemeliharaan dilakukan dengan cara menyiram tanaman setiap hari dan diberikan pupuk hyponex merah dengan konsentrasi 2 g/l sebanyak 25 ml/pot setiap 2 hari. Setelah 4 bulan media zeolit dari masing-masing pot disaring untuk mengisolasi spora yang dihasilkan. Dua jenis spora yang paling dominan diperbanyak untuk memperoleh biakan isolat murni.

*Penelitian 2. Perbanyak Spora Tipe 3 dan Tipe 4 yang Diisolasi dari Lahan Sayuran dan Semak*

### 3.7 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Produksi Perkebunan Fakultas Pertanian Universitas Lampung, mulai dari September sampai dengan Januari 2008.

### **3.8 Metode Penelitian**

Penelitian ini terdiri dari dua sub penelitian yaitu sub penelitian 1 untuk spora Tipe 3 dan sub penelitian 2 untuk spora Tipe 4. Untuk masing-masing spora Tipe 3 dan Tipe 4 rancangan perlakuan yang digunakan adalah rancangan faktorial (2x3) yaitu 2 jenis tanaman inang serta 3 jenis media ( zeolit, pasir, dan gambut). Perlakuan diulang sebanyak 5 kali dan diterapkan pada satuan percobaan dengan menggunakan rancangan teracak sempurna (RTS). Data- data yang diperoleh diuji dengan Uji Barlett untuk menguji homogenitas antar perlakuan. Jika asumsi dipenuhi, data dianalisis ragam dan dilanjutkan dengan pemisahan nilai tengah menggunakan uji BNT.

### **3.9 Perbanyak Spesies Murni (Spora Tunggal)**

Perbanyak spora CMA dilakukan dengan menggunakan tanaman inang jagung dan sorgum. Semua tanaman inang disemai pada media pasir yang telah disterilkan dengan oven dengan suhu 100<sup>0</sup>C selama 60 menit, hingga mengeluarkan akar pada umur ±1 minggu. Spora yang sudah dikumpulkan diinokulasikan ke akar tanaman inang sebanyak 5 spora/tanaman inang. Spora diletakkan di atas kertas saring yang telah dibentuk bulat kemudian ditempelkan ke akar tanaman sampai tertutup.

Tanaman inang ditanam di dalam pot (pop ice diameter 3,5 cm) yang berisi media zeolit, gambut, dan pasir steril sesuai perlakuan. Bagian luar pot ditutup agar spora dapat berkembang optimum pada media. Sebelum ditempatkan di rumah kaca, sampel tanaman yang telah diinokulasi spora disimpan di ruangan

dengan cahaya lampu selama 10 hari supaya tanaman dapat beradaptasi sebelum dipindahkan ke rumah kaca. Tanaman dipelihara sampai berumur 4 bulan dan selama itu dilakukan pemeliharaan seperti penyiraman, pemupukan, pengendalian hama belalang, kutu, semut, dan lain-lain secara manual. Pemeliharaan dilakukan dengan cara menyiram tanaman setiap hari dan memberikan pupuk hyponex merah dengan konsentrasi 2 g/ l sebanyak 20 ml/pot setiap 2 hari.

### **3.10 Peubah yang Diamati**

Untuk menguji hipotesis dan kesahihan kerangka pemikiran, maka dilakukan pengamatan untuk peubah sebagai berikut:

1. Persentase infeksi akar oleh CMA. Setelah 4 bulan, tanaman sorgum dan jagung dipanen, dicabut dari polibag dan dibersihkan akarnya. Akar yang sudah bersih dimasukkan ke dalam botol film untuk pemeriksaan infeksi CMA pada akar tersebut. Akar direndam dengan air, dicuci bersih untuk memisahkan dari kotoran yang menempel, diberi larutan KOH 10% sampai seluruh akar terendam, dan dikukus selama 30 menit dengan suhu 80-90 °C. Setelah dingin larutan KOH dibuang, akar dibilas kembali dengan air kran, diberi larutan HCl 1% dan dibiarkan selama 24 jam. Larutan HCl kembali dibuang dan akar direndam di dalam larutan tryphan blue 0,03 % selama 24 jam. Akar yang telah siap, diamati di bawah miskroskop compound pada perbesaran 40x untuk menghitung persentase infeksi akarnya dengan membuat preparat akar.

Persentase infeksi akar dihitung dengan rumus sebagai berikut:

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

2. Jumlah spora/g media. Spora dalam sampel media tanam diisolasi dengan metode penyaringan basah, sama dengan metode yang ada di halaman 24.