

BAB III

MATERI DAN METODE

Penelitian telah dilaksanakan pada tanggal 16 April – 15 Agustus 2017 di *green house* dan Laboratorium Fisiologi dan Pemuliaan Tanaman, Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro Semarang, serta Laboratorium Mikologi, Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

3.1. Materi Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian yaitu benih kacang tanah varietas Takar, inokulum cendawan MVA spesies *Glomus fasciculatum* dengan populasi 3 spora/gram, pupuk batuan fosfat (19% P_2O_5), TSP (46% P_2O_5), amonium sulfat (21% N) dan KCl (60% K_2O), tanah, pot kapasitas 10 kg, akuades, larutan buffer pH 7,0 dan 4,0, pereaksi pewarna fosfat, larutan asam klorida (HCl), asam nitrat (HNO_3), asam perklorat ($HClO_4$), pereaksi amonium molibdovanadat, pereaksi asam askorbat, larutan KOH 10%, larutan HCl 1%, larutan *lactophenol tripan blue* sebagai pewarna akar.

Alat yang digunakan adalah pH meter, cangkul, timbangan untuk tanah, drum, spatula, timbangan analitik, meteran, sprayer, ember, label, saringan untuk tanah, erlenmeyer, tabung reaksi, gelas ukur, cawan petri, pipet tetes, kaca objek, gelas beker, tabung falkon, *vortex mixer*, oven, spektrofotometer, mikroskop, mikropipet, alat penyaring ukuran 54 dan 75 μm , botol kaca, kertas saring, kamera dan alat tulis.

3.2. Metode Penelitian

3.2.1. Rancangan Percobaan

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola faktorial 3x2. Faktor pertama adalah jenis pupuk fosfat terdiri dari 3 taraf, yaitu P_0 = kontrol (tanpa pupuk P), P_1 = TSP, dan P_2 = BP. Faktor kedua adalah perlakuan inokulasi cendawan MVA terdiri dari 2 taraf, yaitu M_0 = tanpa inokulasi dan M_1 = inokulasi cendawan MVA sebanyak 50 g/pot. Percobaan terdiri dari 6 perlakuan dan masing-masing perlakuan diulang sebanyak lima kali, sehingga terdapat 30 unit percobaan. Denah pengacakan perlakuan pada tiap unit percobaan tercantum pada Ilustrasi 2.

$P_2M_0U_1$	$P_2M_0U_2$	$P_0M_1U_1$	$P_0M_0U_3$	$P_0M_0U_1$	$P_1M_1U_5$
$P_0M_1U_5$	$P_1M_1U_3$	$P_1M_1U_1$	$P_1M_0U_5$	$P_2M_1U_5$	$P_1M_0U_1$
$P_0M_0U_4$	$P_1M_1U_4$	$P_1M_1U_2$	$P_2M_0U_3$	$P_2M_0U_5$	$P_1M_0U_4$
$P_2M_1U_4$	$P_2M_1U_1$	$P_2M_1U_2$	$P_1M_0U_3$	$P_0M_0U_5$	$P_0M_1U_3$
$P_1M_0U_2$	$P_0M_1U_4$	$P_2M_1U_3$	$P_0M_1U_2$	$P_0M_0U_2$	$P_2M_0U_4$

Ilustrasi 2. Denah Pengacakan Perlakuan pada Unit Percobaan

3.2.2. Prosedur Penelitian

Penelitian dilakukan dengan tahapan persiapan bahan dan media tanam, penanaman, pemupukan sekaligus inokulasi cendawan MVA, perawatan, serta

pengamatan parameter pertumbuhan dan produksi tanaman. Tanah yang digunakan dalam penelitian diambil dari lahan kebun percobaan Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro. Tanah tersebut kemudian dianalisis untuk mengetahui pH, kandungan N, P, K dan C-organik. Kemudian tanah disterilisasi, diinkubasi selama 24 jam. Pot dengan diameter 28 cm dan volume 10 kg tanah sebanyak 30 masing-masing diisi 9 kg tanah. Inokulasi cendawan MVA masing-masing 50 g/pot dengan cara ditanamkan ke dalam tanah. Benih yang ditanam sebanyak 3 benih/pot, selanjutnya pemupukan dengan BP 190 kg/ha (0,85 g/pot), TSP 78 kg/ha (0,35 g/pot), ammonium sulfat 100 kg/ha (0,45 g/pot) dan KCl 40 kg/ha (0,18 g/pot). Penjarangan dilakukan 7 hari setelah tanam (HST) menyisakan 2 tanaman/pot dengan cara memotong tanaman tepat diatas permukaan tanah. Pemeliharaan meliputi penyiraman, penyiangan dan pengendalian organisme pengganggu tanaman yang dilakukan apabila diperlukan.

3.2.3. Parameter Pengamatan

Pengamatan dilakukan pada semua tanaman meliputi aspek pertumbuhan, produksi dan fisiologis dengan cara sebagai berikut.

- 1) Tinggi tanaman (cm) diukur mulai dari pangkal batang hingga titik tumbuh tanaman dengan menggunakan meteran dan diukur setiap minggu hingga akhir pengamatan.
- 2) Jumlah polong dihitung saat panen (95 HST) dengan cara menjumlahkan seluruh polong/ pot.

- 3) Bobot polong (gram) dengan cara seluruh polong/ pot ditimbang setelah panen (95 HST) dengan menggunakan timbangan analitik.
- 4) Bobot biji ditimbang setelah panen (95HST) dengan menggunakan timbangan analitik.
- 5) Produksi P jerami tanaman kacang tanah dilakukan dengan cara mengambil sampel tanaman segar (batang dan daun) yang dikeringkan menggunakan oven pada suhu 105°C selama 48 jam. Produksi bahan kering tanaman total dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{Produksi bahan kering} = \frac{\% \text{ BK}}{100} \times \text{Produksi segar}$$

Kemudian dilanjutkan metode spektrofotometri yaitu di lakukan dengan cara ditanur, destruksi, penyaringan, dan diukur pada spektrofotometer. Hasil absorbansi dimasukkan ke dalam persamaan berikut untuk menghitung P total jerami tanaman kacang tanah :

$$P \text{ Jerami} = \frac{[X] \times \text{volume pengenceran} \times \text{volume sampel} \times \text{BK}}{\text{Berat sampel (mg)} \times \text{larutan induk} \times 10.000}$$

Keterangan :

[X] = Absorban

BK = Bahan Kering

- 6) Kadar P total pada tanah dilakukan dengan metode spektrofotometri yaitu di lakukan dengan cara ditanur, destruksi, penyaringan, dan diukur pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 420 nm.
- 7) Persentase kolonisasi MVA diamati dengan metode *clearing* dan *staining* (Kormanik dan Graw, 1982), yaitu contoh akar dibersihkan dengan air mengalir. Akar dipotong sepanjang 0,5-1 cm, dipindahkan ke dalam botol

film, kemudian dibersihkan dari sitoplasma dengan cara dipanaskan dalam larutan KOH 10% selama 5-10 menit. Larutan KOH 10% dibuang dan contoh akar dibilas dengan air. Contoh akar dinetralisir dengan cara direndam dalam larutan HCl 1% selama 1-2 menit. Larutan HCl 1% dibuang dan dibilas kembali dengan air, kemudian contoh akar direndam dalam larutan pewarna *lactophenol tripan blue* selama 24 jam. Contoh akar yang telah diwarnai, disusun diatas kaca objek, kemudian diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 40 kali. Hasil pengamatan didokumentasi dan jumlah akar yang terkoloni MVA dicatat. Persentase akar terkoloni MVA dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{Akar Terkoloni} = \frac{\sum \text{Akar terkoloni MVA}}{\sum \text{Akar yang diamati}} \times 100\%$$

- 8) Jumlah Spora MVA/50 gram diamati dengan metode tuang-saring (Pacioni, 1992) dan dilanjutkan dengan metode sentrifugasi (Brundrett dkk., 1996). Contoh tanah dikering-anginkan, kemudian ditimbang sebanyak 50 gram. Contoh tanah direndam dalam 40 ml air, diaduk hingga butiran tanah hancur, kemudian dituang dalam saringan bertingkat dengan ukuran pori 75 dan 54 μm secara berurutan dari atas ke bawah. Saringan bagian atas disemprot air kran untuk memudahkan bahan saringan lolos. Contoh tanah direndam kembali dalam 40 ml air, diulang hingga tiga kali, dituang ke dalam tabung falkon dan di sentrifuge dengan kecepatan 3000 *revolutions per minute* (rpm) selama 3 menit. Cairan bening yang berada diatasnya dibuang. Larutan gula 65% ditambahkan sebanyak 1-2 ml ke dalam tabung falkon, kemudian digojog menggunakan *vortex mixer* selama 2 menit dan disentrifuge kembali

selama 5 menit. Cairan pada bagian atas dituang ke dalam cawan petri, lalu diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 40 kali.

3.3. Analisis Data

Model linier yang menjelaskan setiap nilai penganut sesuai dengan percobaan faktorial 3x2 dengan RAL, yaitu:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk} ; \text{ dengan } i = 0, 1, 2, 3, 4; j = 0, 1, 2, 3$$

Keterangan :

Y_{ijk} = Nilai pengamatan pada satuan percobaan yang memperoleh perlakuan taraf ke-i dari faktor pemupukan P, taraf ke-j dari faktor inokulasi cendawan MVA dan ulangan ke-k

μ = Mean populasi

α_i = Pengaruh taraf ke-i dari faktor pemupukan P

β_j = Pengaruh taraf ke-j dari faktor inokulasi cendawan MVA

$(\alpha\beta)_{ij}$ = Pengaruh taraf ke-i dari faktor pemupukan P dan taraf ke-j dari faktor inokulasi cendawan MVA

ε_{ijk} = Pengaruh acak dari satuan percobaan yang memperoleh perlakuan taraf ke-i dari faktor pemupukan P, taraf ke-j dari faktor inokulasi cendawan MVA dan ulangan ke-k

Hipotesis statistika yang diuji adalah :

$$H_0 = P_0 = P_1 = P_2 = P_3 = 0$$

(tidak ada pengaruh dari perlakuan jenis pupuk fosfat terhadap parameter yang diamati)

$$H_1 = P_0 = P_1 = P_2 = P_3 \neq 0$$

(paling sedikit ada satu pengaruh perlakuan jenis pupuk fosfat terhadap parameter yang diamati)

$$H_0 = M_0 = M_1 = M_2 = M_3 = 0$$

(tidak ada pengaruh dari perlakuan inokulasi cendawan MVA terhadap parameter yang diamati)

$$H_1 = M_0 = M_1 = M_2 = M_3 \neq 0$$

(paling sedikit ada satu pengaruh perlakuan inokulasi cendawan MVA terhadap parameter yang diamati)

$$H_0 = M_0P_0 = M_0P_1 = \dots = M_nP_n = 0 \text{ (tidak ada pengaruh interaksi antara perlakuan jenis pupuk fosfat dan inokulasi cendawan MVA terhadap parameter yang diamati)}$$

$$H_1 = M_0P_0 = M_0P_1 = \dots = M_nP_n \neq 0 \text{ (paling sedikit ada satu pengaruh interaksi antara perlakuan jenis pupuk fosfat dan inokulasi cendawan MVA terhadap parameter yang diamati)}$$

Data yang diperoleh dianalisis menggunakan analisis ragam, jika terdapat perbedaan pengaruh perlakuan yang nyata dilanjutkan menggunakan uji *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT) pada taraf 5%.