

BAB I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kawasan karst merupakan bentang alam yang tersusun dari hasil pelarutan batuan seperti batu gamping. Salah satu kawasan karst yang terkenal di Indonesia adalah kawasan karst Maros-Pangkep yang merupakan terbesar kedua di dunia setelah Cina dengan total luas sebesar ±43.750 hektar (Sulistiawaty et al., 2014). Komposisi spesies dan vegetasi di kawasan karst berbeda dengan tipe spesies di kawasan lainnya. Hal ini dikarenakan struktur tanah pada kawasan karst cenderung memiliki kandungan hara yang rendah kecuali kalsium dan magnesium (Budiyanto, 2015). Pada kawasan karst inilah terbentuk sebaran batuan hasil yang tidak teratur dengan vegetasi yang tumbuh di atasnya sehingga menghasilkan pemandangan yang unik (Wulandari et al., 2023).

Vegetasi di kawasan karst dapat tetap tumbuh meskipun dalam kondisi minim unsur hara karena adanya mikroorganisme tanah yang disebut mikoriza. Mikoriza merupakan suatu hubungan simbiotik mutualisme antara cendawan dengan akar tanaman, dimana tanaman menyediakan hasil fotosintat untuk mikoriza sebagai energi dan mikoriza akan menyuplai zat dan mineral yang dibutuhkan tanaman untuk terus berkembang. Salah satu kelompok mikoriza yang sering dijumpai yaitu endomikoriza. Pada endomikoriza, jaringan hifa cendawan masuk ke dalam sel korteks akar dan membentuk struktur khas berbentuk oval yang disebut vesikula dan sistem percabangan hifa yang disebut arbuskula, sehingga endomikoriza disebut juga *fungi micorrhizae arbuscular* (FMA) (Indriyani, 2017).

Fungi Mikoriza Arbuskular (FMA) merupakan mikoriza yang hidup bersimbiosis dengan akar tanaman dan tersebar secara luas pada lapisan tanah. FMA diketahui memiliki ragam manfaat bagi kesuburan tanaman karena dapat membantu dalam menyerap unsur hara dan air dari dalam tanah, melindungi dari cekaman biotik maupun abiotik, serta memperkuat akar tanaman. Selain itu, FMA juga dapat memperbaiki struktur tanah dan meningkatkan ketersediaan unsur hara Fosfat (P) yang sangat rendah pada kawasan yang penyerapan haranya kurang efisien seperti kawasan dengan kondisi tanah berkapur (Prayudyaningsih & Sari, 2016). Oleh karena perannya yang fungsional dalam pertumbuhan tanaman sehingga produksi FMA dengan berbagai teknik perbanyakan terus dikembangkan untuk memperoleh hasil yang maksimal (Rini et al., 2020).

Menurut penelitian yang dilakukan oleh Mony et al (2024), FMA bersifat obligatif simbiotik yang memerlukan tanaman inang dan media pembawa yang baik untuk berkolonisasi dan menginfeksi akar. Pemilihan jenis tanaman inang dan media pembawa yang kompatibel sangat mempengaruhi produksi spora FMA karena setiap jenis media memiliki kemampuan yang berbeda-beda dalam meningkatkan pertumbuhan tanaman. Salah satu jenis tanaman inang yang sering digunakan untuk perbanyak FMA adalah *Pueraria javanica* karena lebih tahan terhadap kelembaban dan suhu rendah (Charisma et al., 2024).

Media pembawa (*carrier*) merupakan salah satu faktor yang penting dalam perkembangbiakan FMA. Penggunaan media *carrier* dalam sporulasi isolat FMA berperan penting dalam meningkatkan viabilitas propagul, dengan syarat dapat diperoleh

dalam jumlah besar, ringan, bersifat porus, homogen dan murah. Salah satu sifat terpenting yang diperlukan dari bahan *carrier* adalah kemampuannya dalam memacu sporulasi isolat FMA agar kepadatannya tetap tinggi selama jangka waktu penyimpanan (Burton, 2008; Kurniawan, 2025). Sporulasi merupakan proses pembentukan spora FMA dengan tujuan untuk bereproduksi dan menghasilkan spora baru. Salah satu teknik yang digunakan untuk merangsang sporulasi FMA yaitu dengan kultur spora tunggal. Teknik perbanyakkan secara kultur tunggal (spora tunggal) merupakan teknik perbanyakkan FMA menggunakan jenis spora tertentu yang diletakkan pada perakaran tanaman inang dalam keadaan steril dan ditumbuhkan pada media *carrier* yang kompatibel untuk perbanyakkan FMA. Media *carrier* yang kompatibel dalam perbanyakkan FMA perlu diperhatikan untuk pertumbuhan tanaman inang. Media *carrier* yang biasa digunakan diantaranya tanah, pasir, dan zeolit, dan bahan organik seperti sekam padi (Pratifthiasari & Nurbaity, 2010)

Pemilihan media *carrier* memiliki beberapa syarat penting untuk menjadi sumber inokulum dalam perbanyakkan spora dan kolonisasi infeksi FMA pada akar tanaman. Penelitian ini menggunakan berbagai kombinasi media seperti pasir pinrang, *perlite*, *cocopeat* dan arang sekam dengan semai *Pueraria javanica* sebagai tanaman inang. Pemanfaatan bahan organik seperti *cocopeat* sangat potensial digunakan sebagai media *carrier* alternatif untuk mengurangi penggunaan top soil karena dapat menjaga keseimbangan aerasi (Irawan, 2015), sedangkan Ramlin et al (2023) menyimpulkan bahwa penggunaan arang sekam sebagai media tanam dapat memperbaiki sifat tanah diantaranya adalah mengefektifkan pemupukan dan berfungsi sebagai pengikat hara. FMA juga diketahui mendapatkan energi dan sumber makanan untuk penyediaan unsur hara tanaman dari bahan organik seperti arang sekam (Agus et al., 2022) sehingga dapat berperan sebagai media pembawa (*carrier*).

Penelitian mengenai eksplorasi keanekaragaman fungi mikoriza arbuskula pada Kawasan Karst telah dilakukan oleh Tandi & Sari (2025), namun tahap selanjutnya yaitu kultur *trapping* spora dengan berbagai media *carrier* yang dilanjutkan dengan kultur spora tunggal dengan beberapa jenis komposisi media *carrier* perlu dilakukan. Oleh karena itu penelitian ini bertujuan mengevaluasi formulasi media *carrier* yang efektif untuk meningkatkan sporulasi isolat tunggal FMA hasil *trapping* dari kawasan karst Maros-Pangkep. Manfaat dari penelitian ini adalah sebagai bahan penyajian informasi terkait efektifitas media *carrier* untuk perbanyakkan spora tunggal hasil *trapping* asal Kawasan Karst Maros-Pangkep.

1.2 Landasan Teori

Kawasan Karst Maros-Pangkep terbentang mulai dari Kabupaten Maros-Pangkep, sekitar 30 km dari kota Makassar dengan total luas kawasan 43.750 hektar. Karst sendiri diambil dari bahasa Jerman yang diturunkan dari bahasa Slovenia yaitu *kras* yang berarti lahan gersang berbatu (Karongi et al., 2023). Keunikan kawasan karst sendiri terletak pada fenomena melimpahnya air bawah permukaannya yang membentuk jaringan sungai bawah tanah, namun di sisi lain di permukaan tanahnya sangat kering. Kawasan karst juga mudah rusak karena batuan dasarnya mudah larut sehingga mudah membentuk gua bawah tanah dari celah dan retakan. Topografi kawasan karst disebut memiliki kandungan yang berbeda akibat proses pelapukan sehingga struktur tanah untuk tiap kawasan karst pun berbeda-beda, sehingga jika digunakan sebagai daerah

bercocok tanam perlu ada pengetahuan khusus untuk mengolah tanah tersebut agar lebih produktif (Sulistiawaty et al., 2014).

Salah satu upaya untuk meningkatkan daya dukung tanah terhadap pertumbuhan tanaman adalah dengan pemanfaatan mikoriza yang dapat diaplikasikan pada lahan marjinal juga lahan kering. Mikoriza mampu meningkatkan ketahanan terhadap serangan patogen dengan menghasilkan selubung akar atau antibiotik dengan cara menginfeksi akar tanaman. Infeksi mikoriza dapat meningkatkan pertumbuhan tanaman dan kemampuannya memanfaatkan nutrisi yang ada dalam tanah, terutama unsur P, Ca, N, Cu, Mn, K, dan Mg. Kolonisasi mikoriza pada akar tanaman dapat memperluas bidang serapan akar dengan adanya hifa eksternal yang tumbuh dan berkembang melalui bulu akar (Fauziah et al., 2024).

Fungi Mikoriza Arbuskular (FMA) merupakan salah satu kelompok fungi mikoriza yang juga memiliki kemampuan bersimbiosis mutualistik dengan jaringan akar tanaman. Hubungan simbiotik antar keduanya saling menguntungkan karena FMA memperoleh energi dan karbohidrat dari tanaman dan tanaman memperoleh banyak manfaat seperti peningkatan serapan hara seperti fosfor (P), resistensi dari cekaman kekeringan, patogen, dan perbaikan struktur tanah (Akib et al., 2020). Endomikoriza yang termasuk pada FMA yang memiliki ciri khas yaitu membentuk vesikel di dalam akar. Beberapa jenis mikoriza yang berperan dalam meningkatkan pertumbuhan tanaman yaitu *Glomus*, *Gigaspora*, *Scutelospora*, dan *Acaulospora* (Masfufah et al., 2016).

FMA dapat meningkatkan sifat fisik tanah dengan cara berkontribusi dalam pembentukan agregat tanah sehingga tanaman yang berasosiasi dengan FMA mampu beradaptasi pada lahan kritis yang kondisi haranya terbatas (Prayudyaningsih et al., 2021). Lahan yang terdegradasi dan memiliki tingkat kesuburan yang rendah dapat dibantu oleh mikoriza memperluas fungsi perakaran untuk memperoleh nutrisi dengan cara meningkatkan luas serapan akar hingga 47 kali lipat karena mampu memperluas permukaan kontak dengan tanah dan dapat meningkatkan ketahanan terhadap cekaman biotik dan abiotik (Fauziah et al., 2024). Hasil interaksi yang terjadi antara FMA dan inangnya menghasilkan pengaruh positif pada lahan dengan kondisi tanah yang kurang subur sehingga FMA berpotensi untuk dimanfaatkan sebagai agen *biofertilizer*.

Peran FMA sebagai mikroorganisme simbiotik dapat terus dikembangkan melalui perbanyak inokulum spora dengan berbagai metode. Salah satu teknik perbanyak inokulum FMA yang sering digunakan adalah kultur pot ataupun kultur spora tunggal memanfaatkan tanaman inang dengan media pembawa yang steril untuk mendukung asosiasi antara mikoriza dan inangnya. Teknik perbanyak secara kultur tunggal (spora tunggal) merupakan teknik perbanyak FMA menggunakan jenis spora FMA tertentu yang diletakkan pada perakaran tanaman inang (Tuheteru et al., 2024). Simbiosis antara tanaman inang dengan mikoriza melibatkan pertukaran mutualistik, dimana tanaman menyediakan karbohidrat hasil fotosintesis untuk FMA, sedangkan FMA membantu meningkatkan akses tanaman terhadap penyerapan unsur hara dan air yang terdapat dalam media. Mikoriza juga dapat berperan dalam perlindungan terhadap patogen dan meningkatkan toleransi tanaman terhadap stres lingkungan (Melinda et al., 2023).

Salah satu faktor pendukung utama dalam perbanyak inokulum FMA adalah media pembawa (*carrier*). Pemilihan media yang tepat dapat meningkatkan produksi spora FMA. Media *carrier* yang akan digunakan harus memenuhi beberapa persyaratan

antara lain bebas mikroorganisme, mengandung unsur hara yang cukup dan tidak mengandung bahan kimia lainnya, tidak mempengaruhi aktivitas spora, mudah dibentuk, dan mudah diperoleh dengan harga yang murah. Selain itu, media *carrier* harus memiliki masa simpan yang lama dan memiliki sistem aerasi yang baik agar spora dapat berperan aktif dalam menginfeksi akar tanaman. Menurut Prayudyaningsih (2012), media yang mempunyai aerasi bagus akan mendukung perkembangan mikoriza.

Bahan yang dapat digunakan sebagai media perkembangan FMA dapat berupa tanah, pasir, *expanded clay* (agregat liat), gambut dan zeolit (Pratifithiasari & Nurbaity, 2010). Zeolit adalah mineral kristal alumina silika tetrahidrat yang membentuk struktur dan berpori yang saling tertaut membentuk saluran panjang dengan beragam ukuran tergantung pada mineralnya. Zeolit bersifat stabil sehingga tidak mudah rusak akibat siraman air dan dapat meningkatkan nilai kapasitas tukar kation (KTK) dan aktivitas mikroorganisme. Namun, harga zeolit umumnya cukup mahal jika dibandingkan kandidat material pembawa lain seperti pasir dan arang sekam (Siregar et al., 2020). Untuk itu diperlukan bahan alternatif sebagai media perbanyak FMA. Saat ini, alternatif media pengganti tanah yang telah dikenal dan digunakan masyarakat contohnya pasir, arang sekam padi dan *cocopeat* (Febriani et al., 2017).

Penggunaan media dari bahan organik seperti arang sekam dan *cocopeat* dinilai dapat merangsang pertumbuhan akar sehingga mendukung kolonisasi FMA. *Cocopeat* memiliki tekstur yang halus sehingga apabila dijadikan sebagai media tanam tidak akan melukai akar tanaman. Arang sekam merupakan salah satu campuran media tanam yang dapat mengikat nutrisi dengan baik dan merupakan bahan pembenah tanah yang mampu memperbaiki sifat-sifat tanah (Ezperanza et al., 2023). Media berbahan dasar organik dapat digunakan sebagai media pembawa (*carrier*) untuk mendukung sporulasi FMA. Kombinasi antara arang sekam, pasir, *cocopeat* dapat berpotensi digunakan sebagai media pembawa karena karakteristiknya yang ringan, porus, mudah ditemukan dan lebih terjangkau (Akib, 2024).

BAB II. METODE PENELITIAN

2.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei 2024 hingga Juni 2025. Penanaman dan pemeliharaan tanaman dilakukan di *Green House* Persemaian Permanen, Balai Perbenihan Tanaman Hutan (BPTH) Wilayah II, Desa Simbang, Kecamatan Samangki, Kabupaten Maros. Pengamatan sampel dilakukan di Laboratorium Pusat Kolaborasi Riset (PKR) Mikroba Karst, Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat (LPPM) Universitas Hasanuddin Makassar.

2.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain skop tanaman, ember 100L, pot tray ukuran 5x3 lubang, bak tabur, spatula, timbangan, gelas beker ukuran 1000 ml, batang pengaduk, saringan bertingkat dengan diameter lubang 425 μm , 250 μm , 45 μm , cawan petri, cawan disposable, *centrifuge*, *tube centrifuge*, pinset twister, mikropipet, kaca preparat, box preparat, *deck glass* dan mikroskop.

Bahan yang digunakan antara lain gelas plastik, fumigan (dazomet 98%), plastik tahan api, larutan gula, larutan PVLG (*Polyvinyl Lactic Acid Glycerol*) dan Melzer's, aquades, alkohol 70%, KOH 10%, HCl 2%, larutan *staining* (asam laktat, gliserin, *trypan blue*), larutan *destaining* (asam laktat, gliserin), H₂O₂ 10%, label sampel, dan ATM (Alat Tulis Menulis). Jenis spora yang akan diinokulasi berasal dari Kawasan Karst Maros-Pangkep. Benih tanaman inang yang digunakan adalah *Pueraria javanica*. Media carrier yang digunakan yaitu pasir pinrang, arang sekam, cocopeat, dan perlite.

2.3 Rancangan Penelitian

2.3.1 Trapping Spora FMA

Rancangan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan komposisi media hanya 1 perlakuan yaitu pasir dan arang sekam (1:1). Setiap sampel pada 4 tutupan lahan memiliki pengulangan sebanyak 10x sehingga diperoleh total 40 unit sampel.

2.3.2 Kultur Spora Tunggal

Rancangan yang digunakan yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL) Faktorial yang terdiri dari kombinasi antara variasi media *carrier* dan jenis spora. Setiap media *carrier* yang digunakan dikombinasikan dengan pasir dengan perbandingan (2:1). Kombinasi variasi media *carrier* dan jenis spora dapat dilihat pada **Tabel 1**.

Tabel 1. Kombinasi Media dan Jenis Spora Kultur Spora Tunggal

No.	Media Carrier	Jenis Spora	Kombinasi
1.	perlite:pasir		A1PR
		2 jenis spora	B1PR
2.	arang sekam:pasir	dominan hasil	A2AS
		<i>trapping</i> spora	B2AS
3.	cocopeat:pasir		A3CP
			B3CP

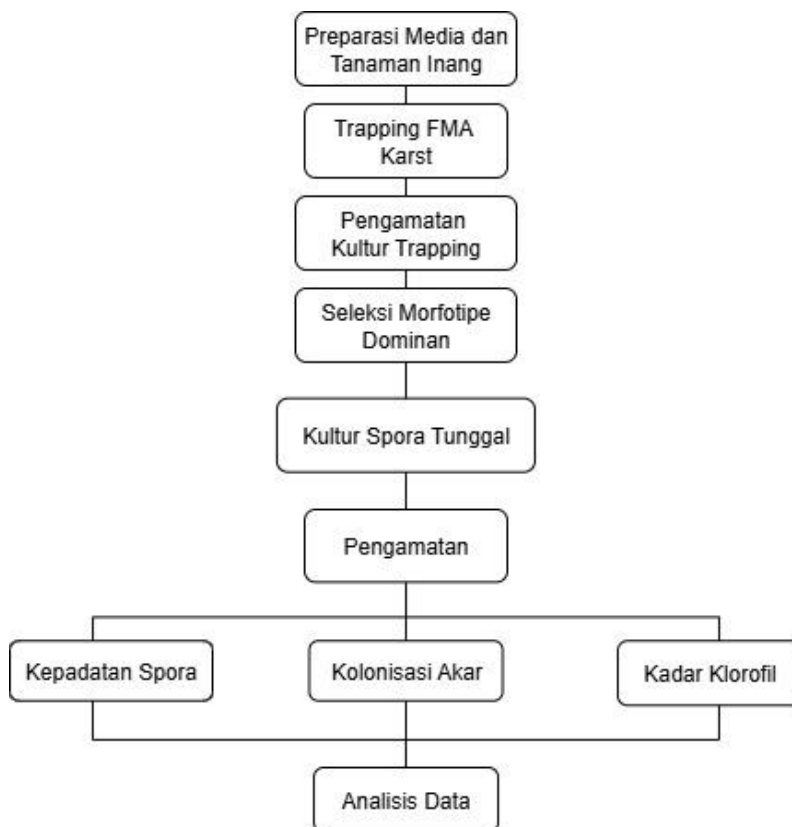
Masing-masing kombinasi dilakukan pengulangan sebanyak 10 kali sehingga diperoleh total seluruh unit percobaan sebanyak 60 unit. Variasi jenis media *carrier* dapat dilihat pada **Gambar 1**.



Gambar 1. Media *Carrier* Kultur Spora Tunggal: (M1: Perlite), (M2: Arang Sekam), (M3: Cocopeat).

2.4 Prosedur Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan menambahkan isolat spora hasil *trapping* asal kawasan karst yang diseleksi berdasarkan morfotipe dominan kemudian diinokulasikan langsung pada akar tanaman inang yang ditumbuhkan dalam berbagai variasi media *carrier* yang terlihat pada **Gambar 2**.



Gambar 2. Alur Penelitian

2.3.1 *Trapping Spora FMA* asal Kawasan Karst Maros-Pangkep

Kultur *trapping spora* merupakan teknik penangkaran spora FMA dengan cara mengkulturkan spora FMA pada sampel tanah asal kawasan karst menggunakan media *carrier* baru yang diinokulasikan pada tanaman inang.

a. Preparasi media kecambah, media sapih dan benih

Jenis media yang digunakan adalah pasir pinrang dan arang sekam yang telah disterilisasi dengan larutan fungisida dan diinkubasi dalam ember 100L selama 10 hari. Media sapih menggunakan pasir pinrang dan arang sekam yang dikombinasikan dengan tanah dari Kawasan Karst Maros-Pangkep dengan perbandingan 1:1. Benih tanaman inang yang digunakan adalah *Pueraria javanica* yang sudah direndam selama 24 jam dalam aquades.

b. Penyapihan, penanaman dan pemeliharaan

Penyapihan benih dilakukan setelah 14 hari atau kecambah memiliki 2 helai daun. Semai *Pueraria javanica* dipindahkan ke media *trapping* dalam wadah gelas plastik yang sudah diberi label. Sampel kultur *trapping* dipelihara selama 3 bulan dengan sesekali dilakukan pemupukan dan pemangkasan.

c. *Stressing* dan pemanenan spora

Kultur diberi perlakuan *stressing* dengan menghentikan proses penyiraman untuk mengondisikan kultur dalam keadaan kering. *Stressing* dilakukan selama ± 2 minggu hingga tanaman inang siap dipisahkan dari media *carrier* untuk dilakukan ekstraksi dan isolasi spora. Selanjutnya sampel media *trapping* dipindahkan ke dalam plastik dengan kode sampel sesuai pot untuk diamati.

2.3.2 Pengamatan Spora

a. Ekstraksi dan Isolasi Spora

Ekstraksi spora dilakukan untuk memisahkan spora dengan tanah sebelum dilakukan pengamatan menggunakan teknik penyaringan basah oleh Gerdemann & Nicolson (1963) yang dimodifikasi oleh Prayudyaningsih (2008). Ekstraksi dilakukan dengan menimbang sampel tanah 30 gram kemudian dituang ke dalam gelas ukur 1L lalu ditambahkan air sebanyak 700mL. Sampel kemudian diaduk selama ± 2 menit hingga homogen kemudian dидiamkan hingga partikel tanah mengendap ke dasar gelas. Selanjutnya suspensi dituang ke saringan bertingkat dengan diameter lubang 425 μm , 250 μm , dan 45 μm (prosedur diulang sebanyak 3 kali).

Kemudian saringan dibilas dengan air mengalir secara berturut-turut, sisa partikel tanah pada saringan kedua kemudian dituang ke saringan ketiga lalu dibersihkan dengan botol semprot. Sisa partikel tanah dipindahkan ke dalam tube 15ml, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 2000 rpm selama 5 menit. Residu yang mengambang pada supernatan dibuang hingga tersisa 5 ml. Tambahkan larutan gula sebanyak 2 kali banyaknya air dalam tube, lalu disentrifugasi dengan kecepatan 2000 rpm selama 1 menit (Brundrett et al., 1996). Supernatan kemudian dituang ke saringan 45 μm dan dibilas dengan air mengalir dengan bantuan botol semprot lalu dituang ke cawan petri untuk dilakukan pengamatan di bawah mikroskop.

b. Perhitungan Populasi Spora

Hasil saringan yang telah dipindahkan ke cawan petri kemudian diamati kepadatan spora dan dihitung di bawah mikroskop *dissecting* dengan pembesaran 4X. Kemudian spora dipindahkan berdasarkan morfotipenya ke kertas saring dengan garis vertikal dan horizontal dalam cawan berukuran 60 x 15 mm untuk memudahkan pengamatan (Brundrett et al., 1996).

c. Identifikasi Spora

Identifikasi dilakukan dengan membuat preparat spora menggunakan larutan *polyvinyl lacto-glycerol* (PVLG) dan larutan pewarna Melzer. Larutan PVLG tidak mengubah warna asli spora dan memiliki daya simpan permanen, sedangkan larutan Melzer akan bereaksi dengan mengalami perubahan warna pada genus spora tertentu. Sebanyak 5-10 spora dengan morfotipe yang sama dipindahkan dalam kaca preparat (*object glass*) menggunakan pinset spora dan mikroskop. Teteskan masing-masing larutan Melzer dan PVLG pada kaca preparat dan tutup dengan *deck glass* kemudian tekan sedikit bagian tengah *deck glass* agar spora pecah untuk melihat lapisan dinding bagian dalam untuk mempermudah identifikasi. Identifikasi jenis spora FMA dilakukan berdasarkan morfologi, ukuran, warna, dan struktur subseluler pada spora.

2.3.3 Seleksi Morfotipe Dominan

Seleksi morfotipe dominan spora hasil *trapping* dilakukan untuk memilih jenis spora yang akan digunakan dalam isolasi spora tunggal. Morfotipe dominan dipilih berdasarkan morfotipe yang mempunyai kepadatan spora tertinggi.

2.3.4 Kultur Spora Tunggal

a. Sterilisasi Media

Jenis media yang digunakan yaitu *cocopeat*, *perlite*, dan arang sekam yang masing-masing dikombinasikan dengan pasir pinrang dengan perbandingan 2:1. Sterilisasi dilakukan dengan menyiram media dengan larutan fumigan (dazomet 98) hingga rata. Setelah homogen media diinkubasi dalam ember 100L kemudian didiamkan selama 10 hari dalam keadaan tertutup. Setelah 10 hari, media dibiarkan dalam keadaan terbuka dan didiamkan lagi selama 4 hari.

b. Perkecambahan benih tanaman inang (*Pueraria javanica*)

Perkecambahan benih tanaman inang dilakukan dengan menyiapkan bak tabur kemudian diisi dengan media sebanyak setengah bak tabur. Benih *P. Javanica* kemudian ditabur secara merata lalu dilapisi lagi dengan media hingga seluruh benih tertutup merata. Benih tanaman inang kemudian disiram dan diamati pertumbuhannya hingga 14 HST hingga siap disapih.

c. Inokulasi Spora FMA dan Penanaman

Kultur spora tunggal menggunakan teknik isolasi spora oleh Brundrett et al (1996). Spora FMA yang telah diisolasi di kertas saring sebanyak 5-10 spora diinokulasikan langsung pada kecambah *Pueraria javanica* yang telah memiliki 2 helai daun sebagai tanaman inang lalu ditanam ke dalam pot berisi media pembawa dengan masing-masing perlakuan yang ditandai dengan pemberian label pada pot. Setiap pot ditanami semai

P.Javanica sebanyak satu semai. Pemeliharaan kultur spora tunggal dilakukan dengan cara melakukan penyiraman menggunakan botol semprot setiap 2 hari sekali pada waktu awal pemeliharaan selama ± 3 minggu, selanjutnya setelah akar tanaman cukup kuat dilakukan penyiraman menggunakan gembor dan diamati pertumbuhannya selama 3 bulan.

d. **Stressing dan Pemanenan Spora**

Sampel tanaman diberi perlakuan *stressing* yang dilakukan selama ± 2 minggu sebelum tanaman siap dibongkar dari material pembawanya untuk dilakukan isolasi spora. Selanjutnya sampel media pembawa dipindahkan ke dalam plastik dengan kode sampel sesuai pot untuk dilakukan pengamatan.

e. **Pengamatan**

1) **Ekstraksi dan Isolasi Spora**

Perhitungan kepadatan spora tunggal diawali dengan melakukan ekstraksi dan isolasi spora. Prosedur ekstraksi dan isolasi pada kultur spora tunggal sama dengan prosedur yang dilakukan pada tahap ekstraksi dan isolasi *trapping* spora karst (**2.3.2.a**).

2) **Kolonisasi FMA**

Pengamatan kolonisasi FMA dilakukan dengan mengambil setiap sampel akar tanaman inang dari masing-masing variasi media dari setiap ulangan. Ambil sebagian akar menggunakan spatula lalu digunting, cuci bersih dan masukkan dalam tabung 15ml lalu beri alkohol 50% sesuai ukuran tabung. Beri kode sesuai dengan pot tempat akar diambil. Bersihkan akar lalu masukkan kedalam tabung reaksi lalu rendam selama 24 jam dengan larutan KOH 10% untuk membersihkan sitoplasma inti akar sehingga zat warna akar lebih mudah meresap. Apabila warna akar belum terang buang larutan KOH sebelumnya lalu ganti dengan larutan H_2O_2 10% dan di rendam selama 24 jam. Apabila warna akar sudah terang, sampel akar di cuci dengan air mengalir kemudian direndam kembali selama 24 jam di larutan HCL 2% untuk proses netralisasi. Kemudian sampel akar direndam menggunakan larutan *staining* selama 24 jam. Setelah itu larutan *staining* diganti larutan *destaining*.

Pengamatan kolonisasi FMA dilakukan dengan memilih secara acak 10 potongan rambut akar yang sudah diwarnai sepanjang 1 cm lalu disusun pada slide mikroskop yang selanjutnya dilakukan pengamatan dengan mikroskop *compound*. Satu jenis sampel penelitian menggunakan satu slide mikroskop yang berisi 10 potong rambut akar ukuran 1 cm memiliki 6 bidang pandang. Pendapat yang dikemukakan oleh Giovannetti & Mosse (1980), slide pada mikroskop yang memperlihatkan beberapa tanda kolonisasi dihitung jumlahnya.

3) **Kadar Klorofil**

Pengamatan kadar klorofil dilakukan pada saat umur tanaman inang sudah berumur 3 bulan. Pengamatan dilakukan dengan dengan cara memilih daun yang sehat dan bagian tertentu (daun tengah), lalu jepit daun dengan sensor SPAD-502 dan catat nilai SPAD. Ulangi pengukuran pada beberapa titik untuk mendapatkan rata-rata nilai. mengukur kandungan klorofil pada daun dengan menggunakan alat *chlorophyll meter* untuk mengetahui persentase kadar klorofil pada daun tanaman *Pueraria javanica*.

2.3.5 Analisis data

a. *Trapping Spora*

Spora hasil kultur *trapping* FMA yang telah diidentifikasi kemudian dihitung jumlah kepadatannya dengan cara mencatat jumlah spora terbanyak dalam 30gr sampel tanah. Populasi spora FMA diklasifikasikan berdasarkan kepadatan spora menurut Daniels & Skipper (1982) dalam Prayudyaningsih et al., (2018) yaitu <10/g tanah (rendah), 10-20/g tanah (sedang), 20-50/g tanah (tinggi), > 50/g tanah (sangat tinggi).

b. **Kultur Spora Tunggal**

Data hasil pengamatan di laboratorium dianalisis dengan menggunakan sidik ragam Rancangan Acak Lengkap (RAL) Faktorial dan diuji lanjut menggunakan Uji jarak Tukey HSD dengan tingkat kepercayaan 95%. Parameter yang diamati pada penelitian ini antara lain kepadatan spora, tingkat kolonisasi FMA pada akar tanaman, dan kadar klorofil pada variasi tiga media *carrier*.

Jumlah kepadatan spora pada kultur spora tunggal dapat dihitung dengan rumus:

$$\text{Kepadatan spora} = \text{jumlah spora dalam 30g media}$$

Klasifikasi populasi spora FMA kultur spora tunggal sama dengan yang digunakan pada tahap *trapping* spora karst (**2.3.5.a**) yaitu menurut Daniels & Skipper (1982) dalam Prayudyaningsih et al (2018).

Persentase infeksi FMA pada akar tanaman inang menurut menurut Giovannetti & Mosse (1980) dihitung dengan rumus:

$$\text{Akar terinfeksi (\%)} = \frac{\sum \text{bidang pandang yang terinfeksi}}{\sum \text{bidang pandang keseluruhan}} \times 100\%$$

Persentase kolonisasi akar FMA kemudian diklasifikasikan dalam beberapa kategori berdasarkan pendapat O'Connor et al (2001), yaitu, 0 (tidak ada kolonisasi), <10% (kolonisasi rendah), <30% (kolonisasi sedang), dan >30% (kolonisasi tinggi).