III. METODOLOGI

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan di Kebun Percobaan (*Green house*) Politeknik Citra Widya Edukasi. Penelitian ini akan dilaksanakan mulai dari Maret 2026 sampai dengan Juni 2026.

3.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *polybag* ukuran 15 x 20, jangka sorong, timbangan analitik, penggaris, ember, cangkul, ayakan, cawan petri, erlenmeyer timbangan digital, spektrofotometer, *sentrifuge,* spatula, gelas ukur, vortex Shaker, mortar, bioreaktor, ose, bunsen spirtus, gelas beaker, mikropipet, parang dan oven. Bahan yang di gunakan yaitu kecambah kelapa sawit varietas damimas d x p, tanah *top soil,* pupuk kandang, arang sekam, bakteri *azotobacter*, *azospirillum, bacillus*, *pseudomonas,* NaCl, alkohol 70%, aseton, luria broth, *dithane* M-45, gula, fermipan, kapas, kasa, aluminium foil dan aquadest.

3.3 Metode Penelitian

Rancangan yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dua faktor perlakuan, yaitu faktor pertama adalah tingkat salinitas atau NaCl sedangkan faktor kedua adalah *Plant Rowth Promoting Rhizobacteria* (PGPR). Berikut adalah taraf perlakuan yang digunakan.

Tabel 1. Kombinasi Perlakuan

Perlakuan	M0	M1	M2	M3
K0	K0M0	K0M1	K0M2	K0M3
K1	K1M0	K1M1	K1M2	K1M3
K2	K2M0	K2M1	K2M2	K2M3

1. K0M0 : Kontrol
2. K1M0 : NaCl 2.000 ppm + PGPR 0 ml
3. K2M0 : NaCl 4.000 ppm + PGPR 0 ml
4. K0M1 : NaCl 0 ppm + PGPR 30 ml
5. K1M1 : NaCl 2.000 ppm + PGPR 30 ml
6. K2M1 : NaCl 4.000 ppm + PGPR 30 ml
7. K0M2 : NaCl 0 ppm + PGPR 40 ml
8. K1M2 : NaCl 2.000 ppm + PGPR 40 ml
9. K2M2 : NaCl 4.000 ppm + PGPR 40 ml
10. K0M3 : NaCl 0 ppm + PGPR 50 ml
11. K1M3 : NaCl 2.000 ppm + PGPR 50 ml
12. K2M3 : NaCl 4.000 ppm + PGPR 50 ml

Keterangan :

ppm : *Part per milion*
ml : *Mililiter*
% : Persen
K0 : NaCl 0 ppm
K1 : NaCl 2.000 ppm
K2 : NaCl 4.000 ppm

M0 : Tanpa PGPR
M1 : PGPR 30 ml (Hastuti *et al.,* 2022).
M2 : PGPR 40 ml (Nufanda, 2024).
M3 : PGPR 50 ml (Kristalisasi *et al.,* 2022)

Percobaan ini terdiri dari 12 kombinasi perlakuan, setiap taraf perlakuan terdiri dari 3 ulangan, setiap ulangan terdiri dari 3 sampel tanaman, sehingga didapatkan 108 tanaman satuan percobaan dengan model Rancangan Acak Lengkap dengan model aditif linear sebagai berikut :

$$\mathbf{Y_{ijk} = \mu + \alpha i + \beta j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}}$$

Keterangan:
Y_{ijk} : Observasi ke-k pada faktor A taraf i dan faktor B taraf j
μ : Rata-rata umum (rata-rata semua perlakuan)
αi : Efek faktor NaCl taraf ke-i (i=1,2,3)
βj : Efek faktor PGPR taraf ke-j (j=1,2,3)
$(\alpha\beta)_{ij}$: Efek interaksi NaCl × PGPR
ε_{ijk} : Galat/sisaan acak

3.4 Prosedur Percobaan

3.4.1 Persiapan Lahan

Persiapan lahan dilakukan dengan membersihkan area yang akan digunakan dari gulma, sisa tanaman, serta benda-benda yang dapat mengganggu proses penanaman.

3.4.2 Persiapan Media Tanam

Media tanam yang digunakan berupa top soil yang diambil dari lapisan atas (0-20 cm) kemudian diayak menggunakan saringan untuk menyaring dan membersihkan akar tanaman, serasah daun, gumpalan tanah keras, batu kerikil agar tekstur media menjadi gembur. Top soil, pupuk kandang dan arang sekam (2:1:1) diisi ke dalam *polybag pre nursery* berukuran 15 × 20 cm sebanyak 1 kg per *polybag* (Setiawan *et al*., 2025). Larutan NaCl ditambahkan pada media tanam dengan tiga tingkat konsentrasi salinitas, yaitu 0 ppm, 2000 ppm dan 4000 ppm (Aisy dan Rachmawati 2022) untuk mensimulasikan kondisi media salin.

3.4.3 Seleksi Kecambah

Kecambah yang digunakan dalam penelitian ini yaitu kecambah kelapa sawit varietas Damimas DxP. Kecambah diseleksi dengan memperhatikan kecambah-kecambah yang patah, busuk dan bejamur sebelum ditanam di *polybag*. Kecambah terpilih direndam dalam larutan fungisida (Dithane M-45 2 g/L) selama 10-15 menit untuk sterilisasi permukaan dan pencegahan infeksi awal (Yabani, 2025).

3.4.4 Penanaman Kecambah

Kecambah yang telah diseleksi kemudian Penanaman kecambah harus dilakukan dengan hati-hati, di mana radikula (calon akar) ditanam mengarah ke bawah, sedangkan plumula (calon batang) ditanam mengarah ke atas. Setelah kecambah ditanam, tutuplah dengan tanah setebal 1 sampai 1,5 cm di atas

permukaan tanah, kecambah yang telah diseleksi kemudian ditanam dengan hati-hati di *polybag*, di mana radikula (calon akar) ditempatkan mengarah ke bawah, sedangkan plumula (calon batang) ditempatkan mengarah ke atas. Lubang tanam dibuat sedalam 3-4 cm. Setelah kecambah ditanam, media tanam ditutup dan ditekan di sekitar kecambah setebal 1-1,5 cm di atas permukaan tanah menggunakan telapak tangan hingga padat sempurna.

3.4.5 Perbanyakan Bakteri

Perbanyakan bakteri *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR) dilakukan menggunakan metode fermentasi cair dalam bioreaktor. Bahan yang digunakan terdiri atas isolat mikroba PGPR masing-masing sebanyak 10 ml, gula pasir 1 kg, singkong rebus 1kg, dan ragi 15 gram. Sebelum digunakan, bioreaktor dibersihkan dan disterilkan menggunakan alkohol 70%, kemudian didiamkan selama 1 hari untuk memastikan kondisi alat steril dan bebas kontaminan. Setelah itu, singkong yang telah direbus dan dihaluskan dimasukkan ke dalam bioreaktor, kemudian ditambahkan gula pasir dan ragi. Selanjutnya, seluruh bahan dicampur hingga homogen. Isolat mikroba PGPR kemudian ditambahkan ke dalam bioreaktor dan diaduk merata. Campuran difermentasikan dalam kondisi tertutup selama 14 hari untuk mendukung proses perbanyakan mikroba. Selama fermentasi, bioreaktor sesekali dibuka dan diaduk untuk menjaga sirkulasi udara, mencegah penumpukan gas hasil fermentasi. Setelah fermentasi selesai, larutan PGPR siap digunakan sebagai pupuk mikroba cair dan diaplikasikan sesuai dosis perlakuan pada bibit kelapa sawit fase *pre nursery*.

3.4.6 Pengaplikasi PGPR

Dosis PGPR diaplikasikan pada bibit kelapa sawit menyesuaikan dengan perlakuan yang diujikan dalam penelitian. Pengaplikasian tidak dilakukan sekaligus, melainkan secara berkala mulai umur bibit 4 minggu setelah tanam hingga 12 minggu, dengan interval 2 minggu sekali (total 6 aplikasi). PGPR diberikan dengan dosis 30 ml, 40 ml, dan 50 ml/*polybag* sesuai perlakuan. Aplikasi dilakukan pagi hari pukul 07.00-09.00 WIB atau sore hari pukul 15.00-17.00 WIB.

3.4.7 Pemeliharaan Bibit Kelapa Sawit

Pemeliharaan merupakan salah satu hal yang penting pada saat pembibitan kelapa sawit, karena bibit kelapa sawit akan menentuan pertumbuhan dan produktivitas tanaman nantinya. Salah satu pemeliharaan yang harus dilakukan pada bibit kelapa sawit yaitu penyiraman. Penyiraman bibit dilakukkan 2 kali sehari (pagi dan sore) dengan manual. Kebutuhan air untuk satu *polybag* adalah 100 ml. Menurut Wibisono (2014) Kebutuhan air pada bibit *pre nursery* berkisar antara 0,1 – 0,3 liter/hari,

3.5 Parameter Pengamatan

Parameter pengamatan digunakan untuk mengetahui pengaruh pemberian *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR) terhadap pertumbuhan dan kondisi morfofisiologi bibit kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) pada fase *pre nursery* dengan media salin.

3.5.1 Tinggi Tanaman (cm)

Pengamatan tinggi bibit kelapa sawit dilakukan mulai saat bibit berumur 4 MST dengan interval setiap 2 minggu hingga umur 12 MST. Pengukuran dilakukan

dari permukaan media tanam sampai titik tertinggi daun, menggunakan penggaris dengan satuan centimeter (cm).

3.5.2 Jumlah Daun (helai)

Jumlah daun dihitung dengan menjumlahkan semua daun fungsional, yaitu daun muda yang sudah membuka sempurna hingga daun tertua yang masih hijau. Pengamatan dilakukan mulai umur 4 MST dengan interval 2 minggu sekali hingga bibit berumur 12 MST. Parameter ini digunakan untuk menilai pertumbuhan vegetatif serta ketersediaan unsur hara yang menunjang pembentukan daun baru.

3.5.3 Diameter Batang (cm)

Diameter batang diukur pada bagian pangkal batang di dekat permukaan media tanam menggunakan jangka sorong yang memiliki ketelitian tinggi. Pengamatan dilakukan mulai umur 4 MST dengan interval 2 minggu sekali sampai bibit berumur 12 MST. Diameter batang merupakan parameter utama yang mencerminkan pertumbuhan fisik dan kekokohan bibit, karena batang berdiameter lebih besar menunjukkan perkembangan jaringan *xilem* dan *floem* yang lebih baik sehingga mampu mengalirkan air dan unsur hara secara optimal.

3.5.4 Analisis Klorofil

Konsentrasi pigmen fotosintesis, termasuk klorofil a, klorofil b, dan klorofil total serta karoten, dianalisis berdasarkan Lichtenthaler (1987). Uji kandungan pigmen fotosintesis dilakukan untuk mengukur kandungan klorofil dalam daun setelah tanaman mengalami cekaman limbah tailing. Sampel daun segar ditimbang dengan massa 0,1 gram, kemudian dihaluskan dengan mortar dan alu serta ditambahkan 10 ml aseton 80%. Sampel ditempatkan dalam tabung Falcon 15 ml dan disentrifugasi pada 3000 rpm selama 10 menit pada suhu 4 °C (Heraeus Labofuge 400R, Jerman). Nilai absorbansi supernatan diukur dengan spektrofotometer Thermospektronik Genesys 20 (Thermo, USA) pada panjang gelombang (λ) 470, 647, dan 663 nm. Kadar pigmen selanjutnya dihitung berdasarkan rumus sebagai berikut:

Ca = 12,25 A663 − 2,79 A647
Cb = 21,50 A647 − 5,10 A663
Ca+b = 7,15 A645 + 18,71 A663
Cx+c = (1000 A470 − 8,71 Ca − 85,02 Cb) / 198

Keterangan:
Ca = klorofil a
Cb = klorofil b
Ca+b = klorofil total
Cx+c = karoten
A470 = absorbansi pada panjang gelombang (λ) 470 nm
A663 = absorbansi pada panjang gelombang (λ) 663 nm
A647 = absorbansi pada panjang gelombang (λ) 647 nm

3.5.5 Bobot Basah Tajuk dan Akar

Bobot basah tajuk dan akar diamati pada akhir penelitian untuk mengetahui total biomassa segar bibit kelapa sawit pada setiap perlakuan. Tajuk yang terdiri atas daun, pelepah, dan batang dipotong pada bagian pangkal, kemudian

dibersihkan dari sisa media atau kotoran yang menempel sebelum ditimbang menggunakan timbangan analitik sehingga diperoleh bobot basah tajuk dalam satuan gram. Akar dipisahkan dari tajuk dengan memotong pangkal batang, lalu akar dibersihkan dari media tanam dengan air mengalir dan dikeringkan permukaannya menggunakan tisu, kemudian ditimbang untuk mendapatkan bobot basah akar. Bobot basah tajuk dan akar mencerminkan kemampuan tanaman membentuk jaringan segar yang berhubungan dengan serapan air dan hara selama fase *pre nursery*.

3.5.6 Bobot Kering Tajuk dan Akar

Bobot kering tajuk dan akar diukur setelah sampel tajuk dan akar yang sudah ditimbang bobot basahnya dikeringkan di dalam oven pada suhu sekitar 100°C selama 24 jam hingga mencapai berat konstan. Setelah proses pengeringan selesai, tajuk dan akar ditimbang kembali dengan timbangan analitik untuk memperoleh bobot kering tajuk dan bobot kering akar dalam satuan gram.

3.5.7 Kadar Air Tajuk dan Akar

Pengukuran kadar air dilakukan dengan menghitung selisih dari berat basah tanaman dengan berat kering tanaman. Selisih berat tersebut kemudiana dibagi dengan berat sebelum dioven dan dikalikan dengan 100%. Hasil perhitungan kadar air tanaman berupa persen. Menurut Robi`in (2007) perhitungan kadar air tanaman dinyatakan dalam rumus sebagai berikut:

$$\text{Kadar Air} = \frac{(\text{Berat Basah} - \text{Berat Kering}) \text{ X } 100\%}{\text{Berat Kering}}$$

3.5.8 Panjang Akar (cm)

Pengukuran panjang akar dilakukan pada saat pengamatan terakhir. Bibit kelapa sawit yang sudah tumbuh dicabut dari *polybag*, kemudian dibersihkan akarnya dari media tanam yang menempel dengan menggunakan air. Setelah bersih panjang akar diukur mulai dari pangkal batang sampai ujung akar. Panjang akar diukur dengan menggunakan penggaris (Sirait *et al.,* 2023).

3.6 Analisis Data

Data diolah dengan menggunakan analisis statistik pada taraf 5% dengan menggunakan *software statistical tools* STAR (*Statistical tool for Agricultural Research*). Apabila hasil uji-F nyata, maka akan dilakukan uji lanjut dengan menggunakan Uji *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT) dengan taraf α 5%.