

IV. METODE PENELITIAN

4.1. Waktu dan tempat penelitian

Penelitian ini berlangsung dari bulan September 1999 selama 10 bulan. Pengambilan sampel dilakukan di desa Simpang Kubu Kec. Kampar. Penelitian menggunakan fasilitas laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi dan Biokimia Jurusan Kimia FMIPA UNRI.

4.2. Bahan dan alat

Bahan-bahan utama yang diperlukan adalah isolat *Rhizobium* spp. dan *Azotobacter* spp., medium SEA, Nutrien Agar, Nitrogen Free Broth, medium Mineral salt, reagen pewarnaan Gram dan 2⁴-D. Alat-alat yang digunakan antara lain adalah alat-alat gelas, inkubator, otoklaf, "laminar air flow", pH meter dan mikroskop.

4.3. Metode penelitian

1. Isolasi Bakteri Pengfiksasi Nitrogen

a. *Rhizobium* spp.

Isolasi *Rhizobium* dilakukan dengan mengambil nodul efektif berwarna merah muda. Nodul yang diperoleh disterilisasi permukaan dengan cara mencucinya dengan alkohol 70 %. Nodul tersebut dipotong dan bagian tengahnya yang berwarna merah dihancurkan dengan bantuan skalpel dan jarum steril. Jaringan nodul dibuat suspensi dengan penambahan 1 ml akuades steril. Suspensi inokulum diinokulasi pada cawan petri berisi medium "Soil Extract Agar" (SEA). Isolat yang diperoleh disubkultur.

Hal ini dilakukan beberapa kali sehingga diperoleh isolat *Rhizobium* murni yang selanjutnya ditanam pada agar miring. Isolat yang didapat dilakukan pewarnaan Gram, bakteri *Rhizobium* dicirikan dengan bentuk batang, gembung, pleomorfik dan gram negatif (Harley & Prescott, 1993).

b. *Azotobacter* spp

Azotobacter diisolasi dari tanah kebun yang telah diketahui menggunakan sebagai herbisida. Tanah kebun sebanyak 1 gram dibuat pengenceran dengan larutan fisiologis (NaCl 0,9%). Larutan tersebut sebanyak 1 ml diinokulasi dalam medium selektif "Nitrogen Free Broth" steril dengan komposisi (g/l) MgSO₄ 7H₂O 0,5 ; FeSO₄ 7H₂O 0,03 ; NaCl 0,3 NaCO₃ 15 ; K₂HPO₄ 1 (Lampiran 1). Hal ini dilakukan dengan lima kali ulangan. Setelah diinkubasi, diambil lendir (pelikel) yang terdapat dipergunakan medium. Pelikel ini merupakan isolat bakteri (Herley dan Prescott, 1993). Pelikel tersebut ditanam ulang pada medium NA dengan metode tuang dan goresan. Prosedur ini dilakukan sampai diperoleh isolat bakteri yang murni. Isolat bakteri dilakukan pewarnaan Gram dan diamati dengan mikroskop. *Azotobacter* berbentuk batang dengan ukuran lebih besar dan gram negatif. Isolat bakteri murni ditanam pada agar miring untuk uji selanjutnya.

2. Seleksi isolat *Rhizobium* spp dan *Azotoceter* spp pengurai herbisida 2, 4 D

Seleksi isolat bakteri murni pengurai 2, 4 D dilakukan melalui 2 tahap.

a. Seleksi Tahap I

Isolat bakteri murni ditumbuhkan pada medium selektif I yang merupakan garam mineral (MS) yang terdiri dari 10 mM K₂HPO₄ ; 3mM NaH₂PO₄, 1mM MgSO₄

dan 10 ml larutan stok bebas klorida dengan komposisi (mg/l) ; CaSO₄, 200 ; FeSO₄ 7H₂O, 200 ; MnSO₄ H₂O, 20 ; NaMoO₄ 2H₂O, 10 ; CuSO₄, 20 ; CoSO₄ 7H₂O, 10 ; H₃BO₃, 2. (de Souza, 1998) dimodifikasi dengan penambahan glukosa 10 mg/l dan agar 15 g/l. Masing-masing medium ditambah 2, 4 D sebanyak 20 mg/l. Kultur bakteri murni dalam larutan garam fisiologis 0,9% dibuat pengenceran dan kemudian diambil 1 ml untuk ditumbuhkan dalam cawan petri berisi medium MSA. Kultur diinkubasi pada suhu 28°C sampai tumbuh koloni bakteri. Isolat bakteri yang tumbuh dinyatakan sebagai isolat bakteri terpilih I yang akan dilanjutkan seleksi tahap II.

b. Seleksi Tahap II

Isolat bakteri terpilih I ditumbuhkan dalam medium selektif II yaitu medium garam mineral (MS). Medium MS dimodifikasi dengan penambahan glukosa 10 mg/l, 2, 4 D 50 mg/l dan "Bromothymol Blue" 20 mg/l sebagai indikator warna.

Isolat bakteri terpilih I sebanyak 10⁴ sel ditumbuhkan ke dalam medium MS melalui kertas cakram. Kultur diinkubasi pada suhu 28°C sampai 14 hari. Degradasi 2, 4 D oleh bakteri ditandai dengan terbentuknya zona perubahan warna disekitar kertas cakram. Pada zona perubahan warna diukur diameternya untuk mengetahui tingkat kemampuan *Rhizobium* spp dan *Azotobacter* mendegradasi 2, 4 D