

BAB. IV METODE PENELITIAN

4.1. Desain Penelitian

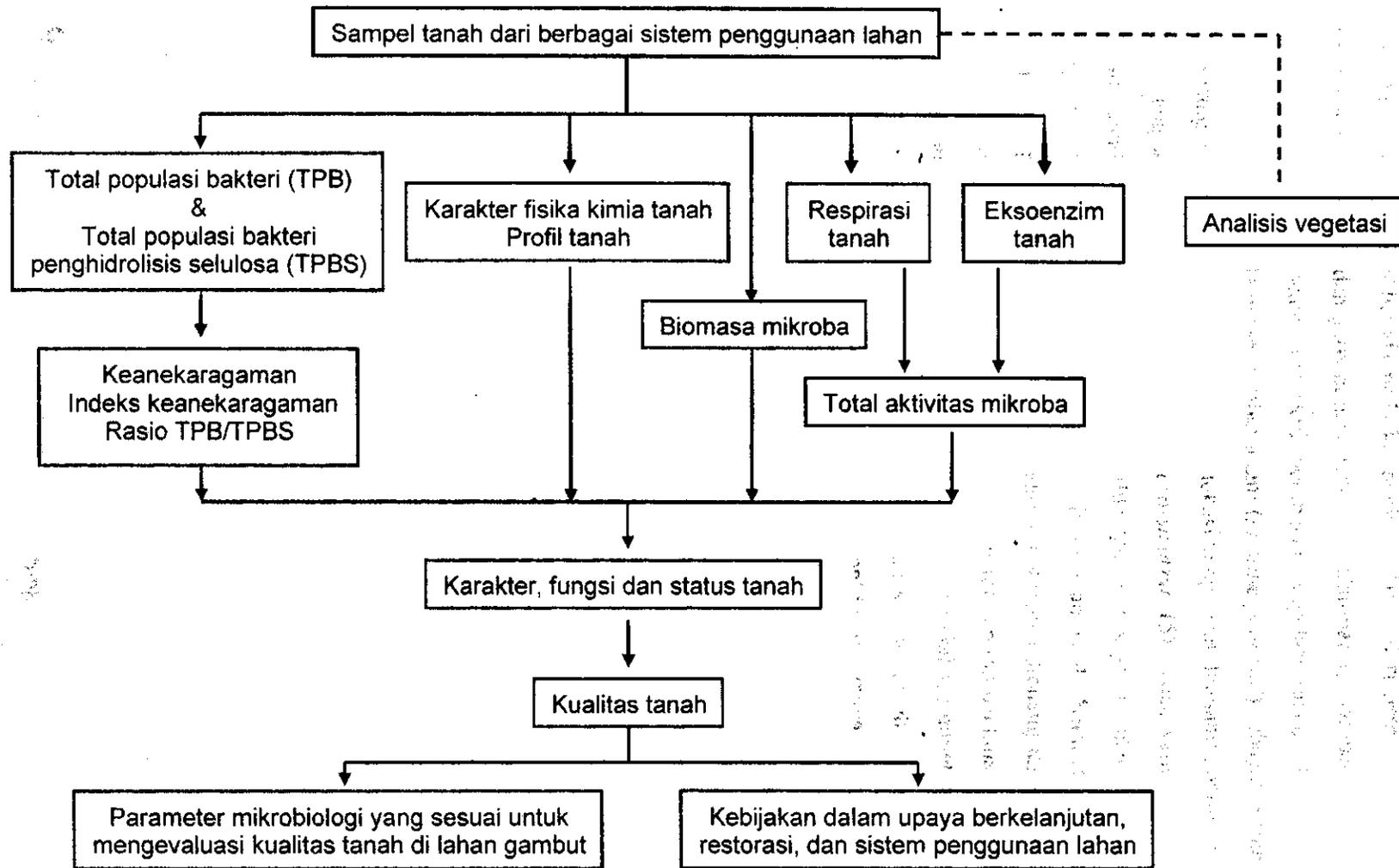
Desain penelitian ini disajikan pada Gambar 2. Secara singkat dapat dijelaskan bahwa sampel tanah dari berbagai variasi penggunaan lahan dievaluasi menggunakan metode mikrobiologi meliputi: karakterisasi sifat fisika kimia tanah, penghitungan total populasi bakteri dan total populasi bakteri selulolitik, respirasi tanah, dan eksoenzim tanah. Parameter-parameter tersebut diharapkan dapat memberikan informasi tentang karakter, fungsi dan status tanah di kawasan Cagar Biosfer Giam Siam Kecil/Bukit Batu.

4.2. Metode Penelitian

Penelitian ini merupakan gabungan eksperimen di lapangan dan di laboratorium. Kegiatan penelitian terbagi dalam beberapa tahapan (memerlukan waktu 3 tahun), sebagaimana disajikan pada tabel berikut:

Tabel 2. Tahap-tahap kegiatan penelitian

Tahun kegiatan ke-	Uraian kegiatan	Keterangan
I (Tahun 1)	<ol style="list-style-type: none">1. Persiapan bahan2. Pengambilan sampel tanah3. Karakterisasi fisika kimia tanah4. Penghitungan total populasi bakteri5. Penghitungan total populasi bakteri selulolitik6. Pengukuran biomasa mikroba7. Pengukuran kecepatan respirasi tanah8. Pengukuran aktivitas eksoenzim	Telah dikerjakan
II (Tahun 2)	<ol style="list-style-type: none">1. Purifikasi isolat bakteri (dari kegiatan penghitungan total populasi bakteri)2. Identifikasi isolat bakteri secara konvensional3. Penghitungan indeks keanekaragaman	Usulan
III (Tahun 3)	<ol style="list-style-type: none">1. Purifikasi isolat bakteri selulolitik2. Seleksi semikualitatif isolat bakteri selulolitik3. Identifikasi isolat bakteri terseleksi secara konvensional dan molekular	Usulan

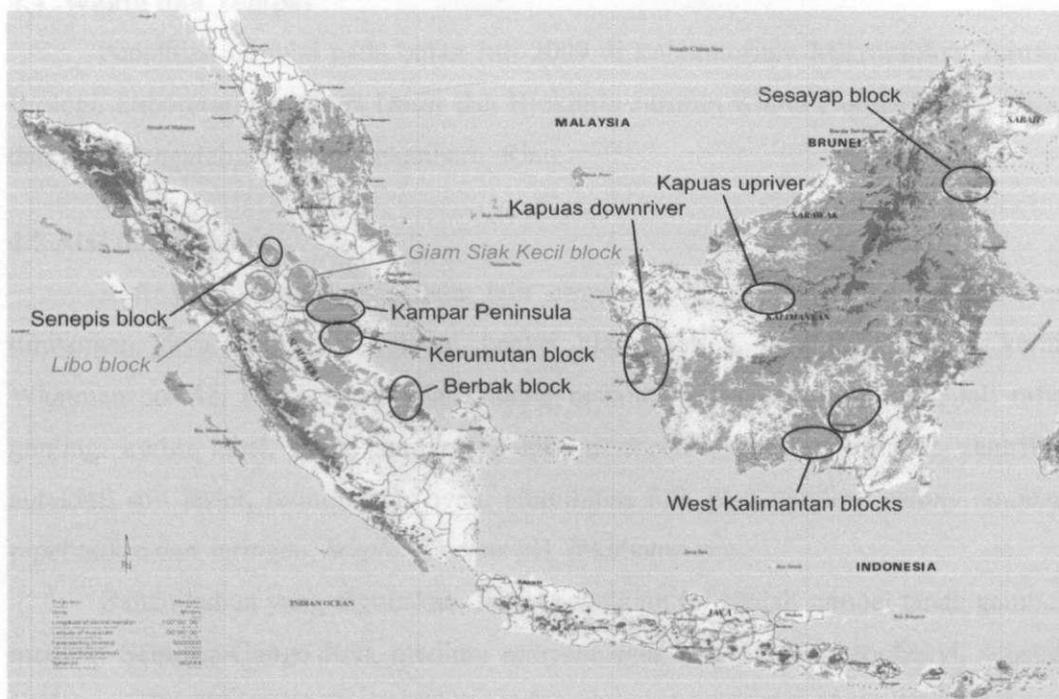


akukan oleh Tim Biodiversitas LIPI

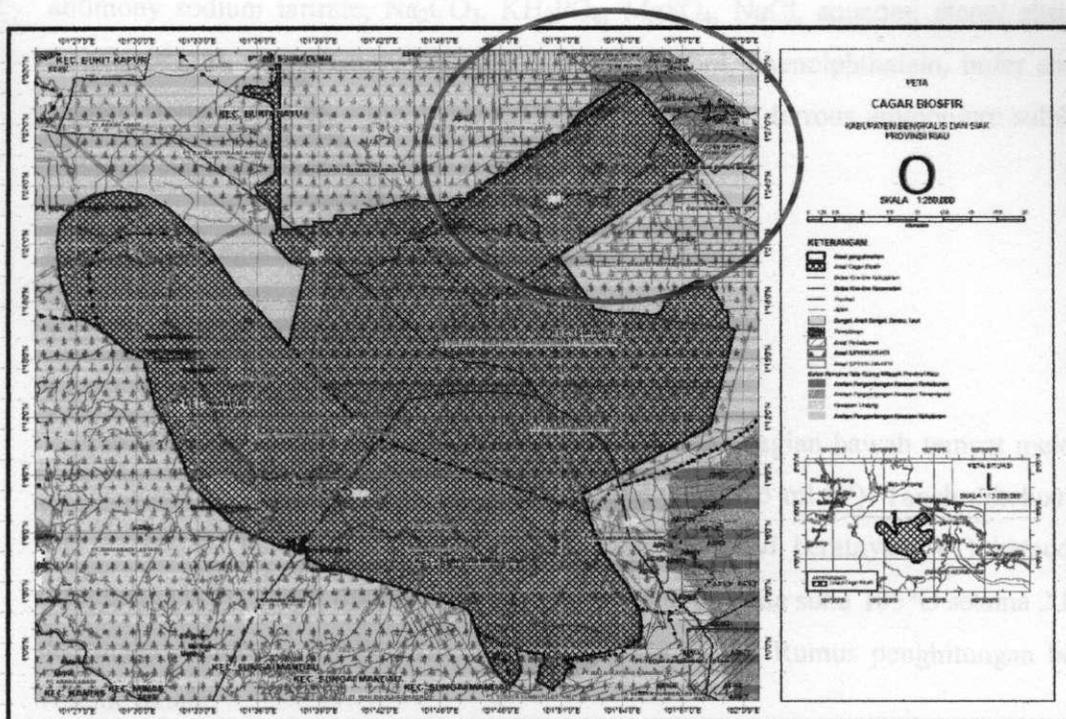


4.3 Deskripsi Lokasi dan Teknik Pengambilan Sampel Tanah

Sampel tanah gambut diambil dari daerah Cagar Biosfer Giam Siak Kecil/Bukit Batu, Provinsi Riau yang berada pada ketinggian 5-10 m dari permukaan laut, pada garis lintang $1^{\circ}12'4''$ N dan garis bujur $101^{\circ}41'3''$ (Gambar 3). Sampel tanah diambil dari 6 lokasi berbeda yang mewakili perubahan vegetasi lahan akibat aktivitas antropogenik meliputi: (1) hutan gambut alami (*pristine peat soil*) sebagai kontrol, (2) lokasi yang telah ditanami kelapa sawit, (3) lokasi yang telah ditanami pohon karet, (4) lokasi yang telah ditanami pohon *Acacia crassicarpa*, (5) lokasi yang telah diubah menjadi areal pemukiman penduduk dan ditanami ubi kayu tumpang sari dengan jagung, (6) lokasi bekas terbakar yang belum diolah (Gambar 4). Sampel tanah diambil pada lapisan permukaan antara 0-15 cm setelah sebelumnya dibuang lapisan atas. Dua garis silang sepanjang 20 m dipetakan di lokasi pengambilan sampel tanah dan sembilan sampel diambil sepanjang tali pada setiap jarak 5 m. Sembilan sampel tanah tersebut digabung dan dihomogenkan untuk memperoleh satu sampel tanah pada setiap lokasi (Zul *et al.* 2009). Pada setiap lokasi diambil 4 sampel tanah sebagai ulangan sehingga diperoleh 24 sampel (6 lokasi x 4 ulangan). Sekitar 250 g sampel tanah diambil dan dimasukkan ke dalam plastik, serta disimpan pada suhu 4°C setelah proses pengambilan dan selama transportasi ke laboratorium.



Gambar 3. Lokasi Cagar Biosfer Giam Siak Kecil-Bukit Batu yang terletak di Kabupaten Bengkalis dan Kabupaten Siak, Provinsi Riau



Gambar 4. Peta Cagar Biosfir Giam Siak Kecil-Bukit Batu. Daerah dalam lingkaran merah merupakan posisi pengambilan sampel tanah.

4.4 Waktu dan Tempat

Penelitian dimulai pada bulan Juli 2009 di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi, Laboratorium Kimia Dasar dan Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Pekanbaru, Riau.

4.5 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan antara lain cawan petri, tabung reaksi, erlenmeyer, timbangan, dryglaski, pipet volume, beaker glass, vortex, pembakar bunsen, kertas Whatman no. 42, buret, botol selai, kaleng biskuit, sekop, ember, plastik, tali rafia, gunting, kertas label, jarum suntik (10 ml), *desiccator*, spektrofotometer, sentrifus, autoklaf, soil tester, termometer, oven, aluminium foil, pipa paralon, *colony counter*, pipet mikro dan saringan, *hotplate*, kertas pH, inkubator, ose.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel tanah gambut, medium Selulosa-Congo Red, medium *nutrient agar* (Sigma), *p*-nitrophenyl, substrat analog *p*-nitrophenyl β -D-glucopiranoside, *p*-nitrophenyl phosphate, *p*-nitrophenyl cellobioside, sigmacell selulosa type 20 (20 μ m), asam askorbat, amonium molibdat,

antimony sodium tartrate, Na₂CO₃, KH₂PO₄, MgSO₄, NaCl, aquades, etanol absolut, CH₃COOH, H₂SO₄, HCl, KOH, CHCl₃ bebas alkohol, phenolphthalein, bufer asetat, triphenyltetrazolium chloride, triphenyl formazan, K₂SO₄, ferrous ammonium sulphate hexahydrate, phenanthroline monohydrate.

4.6 Uraian Kegiatan (Hanya untuk Kegiatan Tahun I)

4.6.1 Karakterisasi Fisika Kimia Tanah

4.6.1.1 Bulk density (berat volume tanah)

Sampel tanah dimasukkan ke dalam jarum suntik (bagian bawah tempat melekat jarum dipotong terlebih dahulu) hingga mencapai volume 5 ml (V). Tanah dikeluarkan dan diletakkan pada aluminium foil yang telah diketahui beratnya (W1) kemudian ditimbang (W2). Tanah dikeringkan menggunakan oven pada suhu 105°C selama 2 hari dan tanah ditimbang (W3) (Anderson dan Ingram 1992). Rumus penghitungan berat volume tanah:

$$\text{Berat volume tanah (g/cm}^3\text{)} = \frac{(W2 - W3) - W1}{V}$$

4.6.1.2 Berat Kering Tanah

Sampel tanah sebanyak 1 gram dimasukkan ke dalam aluminium foil yang telah dibentuk seperti kotak lalu ditimbang beratnya (W1). Aluminium yang telah berisi sampel tanah kemudian ditutup dengan aluminium foil yang sebelumnya dilubangi. Sampel tanah dikeringkan menggunakan oven pada suhu 105°C sampai beratnya konstan. Setelah pengeringan, aluminium yang berbentuk kotak ditimbang tanpa berat aluminium foil penutupnya (W2). Berat kering tanah dihitung dengan mengurangi berat awal aluminium foil berbentuk kotak dengan berat aluminium foil setelah dikeringkan (Anderson dan Ingram 1992).

4.6.1.3 pH dan Kelembaban Tanah

pH dan kelembaban tanah diukur dengan menggunakan soil tester sebelum pengambilan sampel tanah dilakukan. Soil tester dimasukkan ke dalam tanah pada tiap-tiap lokasi sehingga diperoleh data pH sampel tanah. pH sampel tanah digunakan sebagai dasar penentuan pH medium.

4.6.1.4 Suhu tanah

Suhu tanah saat pengambilan sampel diukur dengan menggunakan termometer. Pipa paralon dengan panjang 20 cm dimasukkan ke dalam tanah sampai kedalaman 15 cm. Pipa dicabut hingga terbentuk lubang dan termometer ditancapkan ke dalam lubang tersebut dan diamkan beberapa saat. Selanjutnya dicatat suhu tanah.

4.6.2 Pembuatan Medium

4.6.2.1 Medium NA

Tepung NA dimasukkan sebanyak 25 gram ke dalam 1000 ml aquades dan dimasak hingga mendidih. Setelah itu, medium disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit (medium NA konsentrat). Hal yang sama dilakukan untuk medium NA 1:10, hanya saja tepung NA yang dilarutkan adalah sebanyak 2,5 gram ke dalam 1000 ml aquades.

4.6.2.2 Medium Selulosa-Congo Red

Komposisi medium Selulosa-Congo Red terdiri dari (g/L) yaitu 0,05 K₂HPO₄; 0,25 MgSO₄; 0,2 Congo Red; 1,88 selulosa dengan ukuran kristal 20 µm (Sigma), 20 agar bacto; 900 ml air tanah/sumur (sebagai elemen minor untuk bakteri tanah). Semua bahan dilarutkan hingga mencapai 1000 ml di atas *hoplete* sampai homogen. Selanjutnya disterilkan dengan menggunakan autoklaf selama 20 menit pada suhu 121°C dan tekanan 15 psi (Hendrick *et al.* 1995).

4.6.3 Total Populasi Bakteri yang Mampu Membentuk Koloni Tampak

Total populasi bakteri dihitung dengan metode *plate count* menggunakan medium NA. Sebanyak 10 gr sampel tanah ditimbang dan dilarutkan dalam 90 ml larutan NaCl 0,85% steril dan dihomogenkan selama 10 menit. Aliquot larutan tanah sebanyak 100 µl dengan faktor pengenceran antara 10⁻⁴ - 10⁻⁵ diinokulasi ke medium yang telah padat dan diratakan menggunakan dryglaski. Diinkubasi pada suhu kamar selama 5 hari dan dihitung jumlah koloni yang tampak. Dengan menggunakan sampel tanah yang sama, sampel diinokulasi dari pengenceran 10⁻⁴-10⁻⁵ ke medium NA 1:10. Koloni yang tumbuh dihitung dan diamati setiap hari.

4.6.4 Total Populasi Bakteri Selulolitik

Total populasi bakteri selulolitik dihitung pada medium *Selulosa-Congo Red Agar* yang ditandai dengan zona bening yang terbentuk disekitar koloni (Hendricks *et*

al. 1995). Seratus μ l aliquot larutan tanah dengan faktor pengenceran $10^{-3} - 10^{-4}$ diinokulasikan ke medium dan diratakan dengan dryglaski. Kultur selanjutnya diinkubasi pada suhu kamar selama 2-10 hari. Koloni tampak yang membentuk zona bening diamati dan dihitung setiap hari.

4.6.5 Respirasi Tanah

Respirasi tanah diukur berdasarkan produksi CO_2 oleh biota tanah. Kecepatan respirasi tanah diukur *in situ* dengan cara sebagai berikut: wadah silinder (W1) berkapasitas 50 ml volume diisi dengan 20 ml larutan 1 M KOH dan diletakkan di atas tanah pada lokasi yang telah ditentukan. Wadah W1 selanjutnya dilingkupi dengan wadah silinder dengan kapasitas volume 500 ml (W2) yang diletakkan terbalik hingga menancap ke dalam tanah. Gas CO_2 yang dilepaskan oleh biota tanah akan terperangkap dalam wadah W2 dan berikatan dengan larutan KOH. Pada lokasi yang sama, wadah W1 diisi dengan 20 ml larutan 1 M KOH yang ditutup rapat dan diletakkan di atas tanah (kontrol). Wadah W1 dilingkupi dengan wadah W2 yang diletakkan terbalik. Setelah inkubasi selama 24 jam, wadah W1 ditutup rapat dan dibawa ke laboratorium untuk analisis titrasi. Sebelum titrasi dilakukan, wadah W1 terlebih dahulu ditambahkan beberapa tetes phenolphthalein (indikator warna). Titrasi dimulai dengan penambahan larutan 1 M HCl ke dalam wadah W1 dan dihentikan ketika larutan KOH berubah warna dari bening menjadi merah muda. Kecepatan respirasi tanah ($\text{mg CO}_2/\text{hr}/\text{m}^2$) dihitung berdasarkan konsentrasi CO_2 yang terukur dengan memperhitungkan luas area (diameter wadah) dan waktu inkubasi.

4.6.6 Biomasa Mikroba

4.6.6.1 Biomasa (C) Mikroba

Pengukuran biomasa (C) mikroba dengan metode *chloroform fumigation incubation* (CFI). Sampel tanah dikering anginkan hingga mencapai 40% kapasitas lapang tanah. Sampel disaring menggunakan saringan dengan ukuran pori <2 mm. Subsampel sebanyak 10 gr dimasukkan ke dalam gelas beker dan diletakkan di dalam *desiccator* yang telah diisi 30 ml kloroform bebas alkohol. Sampel selanjutnya difumigasi selama 5 hari dengan cara vakum sehingga kloroform mengalami evaporasi. Proses vakum diulang beberapa kali dalam rentang inkubasi selama 5 hari tersebut. Sampel tanah kemudian diekstraksi dengan 50 ml 0,5 M K_2SO_4 (Ecs). Untuk subsampel tanah yang sama, 10 gr tanah sampel diekstraksi dengan 50 ml 0,5 M K_2SO_4 (Eck)

tetapi tanpa perlakuan fumigasi. Ekstrak tanah disaring dengan kertas Whatman no. 42. Total biomasa (C) mikroba dalam ekstrak subsampel tanah dihitung dengan metode titrasi (Anderson dan Ingram 1992). Ekstrak subsampel tanah ditambahkan 3-4 tetes larutan indikator phenanthroline monohydrate sambil diaduk, dilanjutkan titrasi dengan penambahan larutan ferrous ammonium sulphate hexahydrate dan dihentikan ketika warna larutan berubah dari hijau/ungu menjadi merah. Biomasa (C) mikroba dihitung dengan rumus:

$$Bc = (Ecs - Eck) \times 2,64$$

4.6.6.2 Biomasa (P) Mikroba

Biomasa (P) mikroba juga ditentukan dengan metode *chloroform fumigation incubation* (CFI). Sampel tanah dikering anginkan hingga mencapai 40% kapasitas lapang tanah. Sampel disaring menggunakan saringan dengan ukuran pori <2 mm. Subsampel sebanyak 10 gr dimasukkan ke dalam gelas beker dan diletakkan di dalam *desiccator* yang telah diisi 30 ml kloroform bebas alkohol. Sampel selanjutnya difumigasi selama 5 hari dengan cara vakum sehingga kloroform mengalami evaporasi. Proses vakum diulang beberapa kali dalam rentang inkubasi selama 5 hari tersebut. Sampel tanah kemudian diekstraksi dengan 0,5 M Na₂CO₃ (Eps). Untuk subsampel tanah yang sama, 10 gr tanah sampel diekstraksi dengan 0,5 M Na₂CO₃ (Epk) tetapi tanpa perlakuan fumigasi. Ekstrak tanah disaring dengan kertas Whatman no. 42. Total biomasa (P) mikroba dalam ekstrak subsampel ditentukan dengan metode kolorimetri. Satu ml subsampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 4 ml larutan asam askorbat dan 3 ml reagen molibdat dan diaduk rata. Sampel diinkubasi selama 1 jam dan dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 880 nm. Hal yang sama dilakukan untuk larutan standar yang menggunakan KH₂PO₄ dengan konsentrasi larutan yang linear dari 0 hingga 5 µg/ml P. Biomasa (P) mikroba dihitung dengan rumus:

$$Bf = (Efs - Efk) \times 2,5$$

4.6.7 Aktivitas Eksoenzim Tanah

Aktivitas eksoenzim tanah diukur secara kolorimetri. Aktivitas spesifik eksoenzim yang dipilih adalah enzim yang terlibat dalam proses degradasi selulosa dan siklus karbon (β -glukosidase dan selobiohidrolase), dan siklus fosfat (fosfatase asam)

4.6.7.1 Pengukuran Aktivitas β -glukosidase

Dua gram sampel tanah yang telah diayak dilarutkan dalam bufer asetat 0,05 M (pH 5, disesuaikan dengan pH sampel tanah) hingga volume 5 ml (V_1) dan diaduk dengan menggunakan bar magnetik selama 1 menit. Reaksi enzimatik diawali dengan penambahan 5 ml substrat analog 5 mM (*p*-nitrophenol- β -D-glukopiranoside) (V_2). Larutan diinkubasi dalam shaker inkubator selama 3 jam pada suhu 30°C. Larutan kontrol juga diinkubasi secara bersamaan yaitu (1) 5 ml larutan tanah ditambahkan 5 ml buffer asetat sebagai kontrol sampel, dan (2) 5 ml buffer asetat ditambahkan 5 ml substrat analog 5 mM (*p*-nitrophenol- β -D-glukopiranoside) sebagai kontrol substrat. Setelah inkubasi larutan disentrifus pada kecepatan 8.000 rpm selama 5 menit dan 1 ml supernatan dimasukkan ke dalam tabung yang berisi 1 ml 1 N NaOH untuk menghentikan reaksi enzimatik dan yang menyebabkan terjadinya perubahan warna larutan. Dicukupkan volume larutan hingga mencapai 3 ml dengan menambahkan aquadest dan di vorteks. Absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 410 nm. Aktivitas enzim diekspresikan sebagai $\mu\text{mol/jam/g}$ berat kering tanah dan dihitung menggunakan rumus:

$$\text{Aktivitas Enzim} = \frac{\text{OD}}{(\text{EC})/(\text{V}_1) (\text{T}) (\text{B}_k) (\text{V}_2)}$$

Keterangan: OD = Absorbansi sampel setelah dikurangi absorbansi ke 2 kontrol
EC = Koefesien *p*-nitrophenol [3,4 $\mu\text{mol/ml}$]
 V_1 = Volume larutan tanah + Buffer asetat (5 ml)
 V_2 = V_1 + Substrat analog (10 ml)
T = Waktu inkubasi (jam)
 B_k = Berat kering tanah (g)

Kurva standar dibuat dengan pengenceran larutan *p*-nitrophenol 1 $\mu\text{mol/ml}$. Larutan standar (*p*-nitrophenol) 1 ml ditambahkan 1 ml NaOH 1.0 N dan kemudian 3 ml aquadest, kemudian dibaca nilai absorbansinya.

4.6.7.2 Pengukuran Aktivitas Selobiohidrolase

Aktivitas selobiohidrolase ditentukan dengan cara yang sama dengan penentuan aktivitas β -glukosidase, hanya saja reaksi enzimatik berlangsung dengan inkubasi selama 4 jam dengan konsentrasi substrat analog adalah 2 mM.

4.6.7.3 Pengukuran Aktivitas Fosfatase Asam

Aktivitas fosfatase asam juga ditentukan dengan cara yang sama dengan penentuan aktivitas β -glukosidase, hanya saja reaksi enzimatik berlangsung dengan inkubasi selama 1 jam dengan konsentrasi substrat analog adalah 5 mM.

4.6.8 Analisis Data

Analisis data dari perhitungan total populasi bakteri, total populasi bakteri selulolitik, pengukuran respirasi tanah, biomasa mikroba dan aktivitas eksoenzim ditampilkan dalam bentuk tabel dan grafik.

(The following table content is extremely faint and largely illegible due to low contrast and scan quality. It appears to be a multi-column table with several rows of data.)

Parameter	Unit	Value	Unit	Value
Total Populasi Bakteri	CFU/g	...	Total Populasi Bakteri Selulolitik	CFU/g
Respirasi Tanah	CO ₂ /g	...	Biomasa Mikroba	mg/g
Aktivitas Eksoenzim