

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Lahan gambut memainkan peranan penting sebagai cadangan air dan karbon. Diperkirakan sekitar 120 giga ton karbon disimpan di lahan gambut yang setara dengan 5% dari total global karbon terestrial. Selain itu, lahan gambut juga merupakan salah satu habitat unik bagi mikroba. Hingga saat ini, aktivitas dan komposisi komunitas mikroba di lahan gambut masih sedikit diketahui (Jackson *et al.* 2008; Fisk *et al.* 2003; Dedysh *et al.* 2006), walaupun demikian satu novel genus *Actinobacteria* berhasil diisolasi dan dikarakterisasi dari hutan rawa gambut Thailand (Thawai *et al.* 2005). Lahan gambut banyak ditemui di daerah Asia Tenggara meliputi Indonesia, Malaysia, Thailand, dan Papua New Guinea yang mulai berkurang luasnya karena faktor alam dan aktivitas antropogenik seperti penebangan, kebakaran, kanalisasi, pertanian dan perubahan peruntukan lahan (Jacobs 1988).

Pemanfaatan lahan gambut untuk pertanian termasuk perkebunan dan tanaman industri di Provinsi Riau saat ini sudah tidak dapat dihindari karena nilai ekonomisnya. Jika pemanfaatan lahan gambut ini tidak dikelola dengan baik akan sangat merusak dan membahayakan lingkungan. Menurut Limin (2009) pemanfaatan lahan gambut yang tertata secara tepat merupakan salah satu faktor penentu dalam bertani di lahan gambut. Agar fungsinya tetap terjaga maka pemanfaatan lahan gambut harus dengan mempertimbangkan keseimbangan antara kawasan budidaya, kawasan non budidaya, dan kawasan preservasi.

Cagar Biosfer Giam Siak Kecil-Bukit Batu (CB GSK-BB) adalah salah satu lahan gambut di Propinsi Riau yang merupakan perpaduan unik antara kawasan konservasi dan hutan produksi yang tidak dikonservasi. Sebagian besar lahan tersebut sudah diubah fungsi menjadi areal perkebunan yang ditanami kelapa sawit, hutan tanaman industri (HTI) yang ditanami kayu pulp, pertanian dan pemukiman. Berdasarkan laporan investigasi *Eye on the Forest (EoF)*, pada bulan Maret, April dan Juni 2007 ditemukan sekitar 38.000 hektar hutan alam di sebelah utara Suaka Margasatwa Bukit Batu telah ditebangi secara bersamaan di tiga konsesi HTI. Aktivitas penebangan tersebut berlangsung dari bulan Juni hingga Agustus 2006 dan dibiarkan kosong tanpa ditanami dengan kayu pulp atau perkebunan sawit (Anonymous 2007).

Managemen penggunaan dan pembukaan lahan di kawasan CB GSK-BB menyebabkan berkurangnya vegetasi asli yang pada akhirnya mempengaruhi struktur tanah

dan komposisi komunitas mikroba tanah. Sebagai habitat yang ekstrem dengan pH tanah yang asam, maka banyak sekali mikroba indigenus potensial dengan karakter fisiologi unik di cagar yang harus diselamatkan dan dieksploitasi. Hingga saat ini, belum jelas diketahui korelasi antara aktivitas mikroba dengan perubahan vegetasi lahan gambut. Aktivitas dan komposisi komunitas mikroba dari suatu ekosistem perlu diketahui dan dapat digunakan sebagai salah satu indikator kualitas tanah (Acosta-Martinez *et al.* 2007; Hargreaves *et al.* 2003), sehingga penurunan aktivitas mikroba tanah dapat digunakan sebagai indikasi awal dari gangguan yang terjadi pada ekosistem (Winding *et al.* 2005).

Oleh karena itu perlu dilakukan kajian tentang sensitivitas tanah dari kawasan gambut terhadap berbagai sistem penggunaan lahan. Hasil dari usulan penelitian ini akan menyediakan informasi tentang kualitas tanah gambut di kawasan cagar ditinjau dari aplikasi metode mikrobiologi terpilih, model pengelolaan dan waktu monitoring yang tepat yang dapat dijadikan acuan untuk menentukan upaya pelestarian lingkungan dan keanekaragaman hayati.

1.2 Perumusan Masalah

Penelitian terdahulu menunjukkan bahwa keberadaan vegetasi berkorelasi positif terhadap komposisi komunitas mikroba tanah, dimana tanah yang tanpa vegetasi memiliki jumlah jenis bakteri yang lebih rendah (Zul *et al.* 2007). Aktivitas antropogenik yang mengakibatkan terjadinya perubahan vegetasi lahan juga menurunkan total populasi bakteri, kecepatan respirasi tanah, dan aktivitas eksoenzim. Hal tersebut juga menurunkan proporsi *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, dan *Actinobacteria* (Buckley dan Schmidt 2001). Sebagian besar anggota dari ke tiga (sub)phyla tersebut diketahui berperan dalam proses dekomposisi residu tanaman.

Penggunaan dan pembukaan lahan dengan praktek manajemen tertentu akan menghilangkan atau mengurangi populasi vegetasi asli yang pada akhirnya akan mempengaruhi struktur dan tingkat kesuburan tanah. Hasil penelitian oleh Johnson *et al.* (1991) menunjukkan bahwa sistem pengolahan lahan menyebabkan peningkatan *bulk density* (berat volume) tanah, mengurangi ukuran pori tanah, dan dapat merubah lingkungan mikro tanah. Hal tersebut selanjutnya akan mempengaruhi kelimpahan, aktivitas, dan komposisi komunitas mikroba. Perubahan tersebut secara signifikan akan mempengaruhi proses dan fungsi ekosistem (Carney *et al.* 2005), seperti siklus karbon, nitrogen, dan posfat (Waldrop *et al.* 2000, Cleveland *et al.* 2003), dan pada akhirnya akan berdampak terhadap kualitas tanah.

Kualitas tanah tidak dapat diukur langsung, tetapi dapat dimonitor melalui indikator-indikator tertentu. Indikator adalah properti tanah yang dapat diukur sehingga memberikan informasi bagaimana tanah berfungsi. Indikator yang baik adalah relevan (berhubungan langsung dengan aspek yang akan diketahui, sensitif, dan dapat digunakan untuk monitoring), akurat, dan murah biaya. Indikator kualitas tanah sangat diperlukan antara lain untuk pembuat keputusan atau monitoring efek jangka panjang dari praktek manajemen lahan terhadap kualitas tanah. Indikator kualitas tanah antara lahan yang satu berbeda dengan lainnya, oleh karena itu perlu dilakukan analisis indikator yang cocok dipakai dan diterapkan pada suatu lahan.

Selain itu, hingga saat ini telah banyak penelitian mengenai perolehan bakteri yang mampu mendegradasi selulosa dan melarutkan fosfat, namun informasi mengenai kedua kelompok bakteri indigenus asal Cagar Biosfer GSK-BB belum banyak diketahui. Demikian juga halnya keanekaragaman bakteri tanah gambut juga belum banyak dipelajari. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian mengenai eksplorasi bakteri pendegradasi selulosa dan bakteri pelarut fosfat serta keanekaragaman bakteri di Cagar Biosfer GSK-BB. Isolat-isolat potensial yang diperoleh dapat digunakan sebagai agen fertiliser dan kompos, yang kedepannya dapat digunakan dalam proses restorasi lahan gambut.

II. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

2.1 Tujuan Penelitian

Tujuan yang ingin dicapai dari penelitian ini adalah untuk menganalisis dampak perubahan vegetasi lahan akibat aktivitas antropogenik di Cagar Biosfer GSK-BB terhadap karakter fisika kimia tanah, aktivitas dan keanekaragaman mikroba tanah. Selain itu, juga untuk mengevaluasi waktu yang tepat untuk melakukan monitoring kualitas lahan gambut dengan menggunakan parameter-parameter mikrobiologi potensial yang telah dianalisis pada kegiatan tahun I dan II.

2.2 Manfaat Penelitian

Manfaat yang dapat diperoleh dari penelitian ini adalah tersedianya informasi tentang:

1. Karakter fisika-kimia tanah (pH, temperatur, berat volume, konduktivitas, berat kering tanah, dan tingkat dekomposisi tanah gambut);
2. Keanekaragaman bakteri melalui pengukuran indeks keanekaragaman dan similaritas;
3. Aktivitas mikroba tanah yang dimonitor melalui pengukuran respirasi tanah;
4. Diperoleh koleksi mikroba indigenus yang dapat dipelajari lebih lanjut untuk mengetahui karakter fisiologisnya;
5. Memberikan informasi tentang kaitan/dampak perubahan fungsi lahan di Cagar Biosfer GSK-BB keanekaragaman bakteri dan aktivitas mikroba tanah;
6. Sebagai acuan untuk menentukan pilihan yang dapat dilakukan dalam proses restorasi dan keberlanjutan lahan gambut di Cagar Biosfer GSK-BB.

III. TINJAUAN PUSTAKA

3.1 Lahan Gambut

Lahan gambut dunia mempunyai luas sekitar 386-409 juta ha (O'Connell 2009), yang tersebar diberbagai benua diantaranya benua Asia, Eropa, Amerika dan Afrika. Dari luas keseluruhan lahan gambut di dunia sekitar 38 juta ha terdapat di wilayah tropis (Handayani 2003), dan seluas 25 juta ha atau 69% dari lahan gambut tropis di dunia terdapat di Asia Tenggara (Darajat 2006). Indonesia merupakan negara yang memiliki sebagian besar dari gambut tropis dunia yaitu seluas 21 juta ha (BB Litbang SDLP 2008). Lahan gambut Indonesia tersebar di Pulau Sumatera 8,9 juta ha, Pulau Kalimantan 6,3 juta ha, dan Pulau Papua 10,9 juta ha (Darajat 2006; Saegiman 2007). Di wilayah Sumatera, sebagian besar lahan gambut berada di pantai timur yang terdapat di beberapa Provinsi yaitu Riau, Jambi, Sumatera Selatan, dan Bengkulu (BB Litbang SDLP 2008).

Provinsi Riau adalah provinsi yang memiliki lahan gambut terluas di Sumatera yaitu dengan luas mencapai 4,044 juta ha (Darajat 2006). Sebaran lahan gambut di Provinsi Riau berada disepanjang Timur wilayah hingga kebagian pesisir Riau. Lahan gambut Riau mempunyai potensi besar sebagai penyimpan karbon dalam jumlah besar, hal ini disebabkan karena gambut di Riau merupakan gambut terdalam di dunia yakni mencapai 10 meter (Jikalahari 2009). Akan tetapi, jika lahan gambut tidak dikelola dengan baik akan berdampak pada emisi karbon di udara sehingga meningkatkan efek rumah kaca dan *global warming*.

Lahan gambut memiliki peranan dan potensi yang sangat penting dalam menjaga keseimbangan ekosistem lingkungan, karena lahan gambut berperan sebagai habitat bagi mikroba, berbagai spesies fauna dan tanaman langka (Djauhari 2009). Selain itu, lahan gambut menyimpan karbon (C) dalam jumlah besar dan mempunyai daya menahan air yang tinggi sehingga berfungsi sebagai penyangga hidrologi areal sekelilingnya (Agus dan Subiaksa 2008). Potensi lahan gambut Riau untuk menyimpan karbon semakin berkurang, akibat menyusutnya daerah tutupan gambut di Riau dari tahun ke tahun. Berdasarkan data dari Jikalahari (2009), jumlah karbon yang dihasilkan gambut Riau pada tahun 1990 mencapai 16.833.870 ton karbon atau 69,75% dari kandungan karbon di Sumatera. Pada tahun 2002, hasil karbon Riau hanya tinggal 14.591.010 ton, yang berarti telah mengalami penyusutan sekitar 2.242.860 ton selama 12 tahun. Penyusutan terjadi karena adanya

konversi gambut diberbagai kawasan Riau menjadi lahan pertanian, hutan tanaman industri (HTI) dan perkebunan (Darajat 2006).

3.2 Aktivitas Mikroba Tanah: Kaitannya dengan Kualitas Tanah

Aktivitas mikroba tanah mencerminkan aktivitas metabolisme seluruh mikroba tanah termasuk bakteri, actinomycetes, jamur, alga, protozoa, tumbuhan dan mikrofauna. Mikroba memainkan peran penting dalam mempertahankan produktivitas tanah, seperti kesuburan dan struktur tanah (Subhani *et al.* 2001). Aktivitas mikroba tanah dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain penggunaan lahan, teknik manajemen tanah, penggunaan pupuk, pestisida dan aktivitas antropogenik lainnya. Pembakaran hutan merupakan salah satu dari kegiatan antropogenik yang mengakibatkan rusaknya faktor fisika kimia tanah juga membunuh hewan serta tumbuhan. Sistem manajemen lahan tersebut dapat merubah struktur dan pori tanah. Perubahan pori tanah akan menyebabkan perubahan lingkungan mikro sebagai habitat dari mikroba. Hal tersebut akan mengakibatkan perubahan komposisi komunitas dan aktivitas mikroba tanah (Sylvia *et al.* 2005).

Aktivitas mikroba tanah dapat digunakan sebagai indikator dalam memonitor kualitas suatu ekosistem tanah (Winding *et al.* 2005). Kualitas tanah dapat dimonitor secara fisika (tekstur tanah, agregat tanah), kimia (pengukuran pH, salinitas, kapasitas pertukaran kation) dan biologi (USDA 1996). Parameter fisika memberikan informasi tentang porositas, *bulk density*, berat kering tanah dan stabilitas agregat tanah (O'Neill dan Amacher 2003). Parameter kimia meliputi pengukuran bahan organik (total organik karbon dan total nitrogen), pH dan pengukuran kontaminasi bahan berbahaya seperti arsenik dan logam, serta salinitas (Doran dan Parkin 1994). Sementara parameter biologi meliputi total populasi organisme tanah, keanekaragaman dan aktivitas mikroba tanah (Boerner *et al.* 2005; Bahig *et al.* 2008).

3.3 Respirasi Tanah

Respirasi tanah adalah tipikal parameter aktivitas biologi tanah yang berkorelasi positif dengan material organik tanah dan merupakan refleksi dari siklus karbon (Ryan and Law 2005). Respirasi tanah merupakan kombinasi respirasi akar (autotroph) dan respirasi mikroba tanah (heterotroph). Kecepatan respirasi tanah dikontrol oleh suhu dan kelembaban tanah (Kaur *et al.* 2007, Raich dan Potter 1995), penggunaan lahan (Frank *et al.* 2006), praktek manajemen tanah (Raich dan Potter 1995), serta populasi dan dinamika komunitas flora fauna tanah (Raich dan Schlesinger 1992). Karena dikontrol oleh berbagai faktor lingkungan dan perubahannya (Rustad *et al.* 2000), maka kecepatan respirasi tanah

dapat digunakan untuk menentukan efek gangguan ekosistem terhadap komunitas mikroba dan kualitas tanah pada akhirnya.

3.4 Penyebaran Bakteri Tanah

Keanekaragaman bakteri hutan gambut belum banyak dieksplorasi dan berperan penting dalam proses dekomposisi. Hasil dekomposisi merupakan bahan organik dan unsur hara yang penting bagi kehidupan organisme dan produktivitas perairan terutama dalam peristiwa rantai makanan. Keberadaan dan keanekaragaman bakteri dalam ekosistem gambut dipengaruhi oleh faktor salinitas, pH, fisik, iklim, vegetasi, nutrisi dan aktivitas antropogenik (Hrenovic *et al.* 2003). Faktor-faktor ini tidak hanya mempengaruhi populasi bakteri tetapi juga mempengaruhi penyebaran dan jenis bakteri tanah (Foth 1994).

3.4.1 Bakteri Selulolitik

Bakteri selulolitik menghasilkan kompleks enzim selulase yang berbeda-beda, tergantung dari gen yang dimiliki (Meryandini *et al.* 2009) dan mampu mendegradasi selulosa. Bakteri selulolitik banyak ditemukan di tanah pertanian, hutan, tumbuhan yang telah membusuk ataupun pada jaringan hewan. Beberapa bakteri selulolitik antara lain berasal dari genus *Cellulomonas*, *Cytophaga*, *Pseudomonas* (Rao 1994; Lynd *et al.* 2002.; Wirth dan Ulrich 2002), serta *Bacillus* (Kusmiati dan Priadi 2003), sedangkan bakteri selulolitik yang berasal dari kelompok aktinomisetes adalah *Nocardia* sp., *Streptomyces* sp. dan *Micromonospora* sp. (Lynd *et al.* 2002; Wirth dan Ulrich 2002). Bakteri ini hidup pada kondisi lingkungan aerob. Selain itu bakteri selulolitik juga ditemukan pada kondisi anaerob, yaitu: *Acetivibrio*, *Clostridium* dan *Ruminococcus*. Di alam, bakteri selulolitik anaerob ini ditemukan sebanyak 5-10% dari total keseluruhan mikroba selulolitik (Coughlan dan Mayer 1992 *cit.* Haichar *et al.* 2006). Nurkanto (2007) berhasil mengisolasi aktinomisetes dari hutan paska kebakaran Bukit Bangkirai Kalimantan Timur yang tergolong *Streptomyces*, *Nocardia*, *Microbiospora*, *Micromonospora*, *Microtetraspora*, *Streptosporangium* dan *Actinoplanes*. Sebagian dari isolat bakteri tersebut mempunyai kemampuan dalam melarutkan fosfat dan mendegradasi selulosa.

3.4.2 Bakteri Pelarut Fosfat

Bakteri Pelarut Fosfat (BPF) mampu melarutkan P yang terfiksasi di dalam tanah dan mengubahnya menjadi bentuk yang tersedia sehingga dapat diserap oleh tanaman (Intan 2007). Banyak ditemukan di sekitar perakaran tanaman dengan jumlah berkisar antara 10^5 – 10^7 per gram tanah (Intan 2007) dan terdapat di daerah permukaan tanah sampai

kedalaman 25 cm dari permukaan tanah (Ginting *et al.* 2001). Bakteri pelarut fosfat berfungsi memperbaiki pertumbuhan tanaman dan meningkatkan efisiensi pemupukan fosfat serta memiliki kemampuan melarutkan mineral-mineral fosfat melalui sekresi asam organik dan enzim fosfatase (Rao 1994). Bakteri tersebut antara lain adalah *Bacillus firmus*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Micrococcus* dan *Mycobacterium*. Mikroba yang berkemampuan tinggi melarutkan P, umumnya juga berkemampuan tinggi dalam melarutkan K (Nurhayati 2008). Selain itu, BPF biasanya juga mampu memproduksi asam amino, vitamin dan *growth promoting substance* seperti IAA dan asam giberelin yang dapat meningkatkan pertumbuhan tanaman (Richardson 2001; Gyaneshwar *et al.* 2002; Ponnugaran 2006).

Beberapa peneliti di bidang bioteknologi tanah telah memanfaatkan mikroba pelarut fosfat sebagai pupuk biologis atau *biofertilizer* (Intan 2007). Sitepu *et al.* (2007) telah berhasil mengisolasi tujuh puluh satu bakteri pelarut P yang berasosiasi dengan bibit dan anakan *Dipterocarp* dari tanah gambut di Arboretum Nyaru Menteng dan Universitas Pembibitan Palangkaraya, Kalimantan Tengah, Indonesia. Beberapa strain mampu melarutkan $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ pada pH 4,5 dengan berbagai indeks solubilisasi yang berbeda pada hari ke delapan dan diperoleh 5 isolat terbaik antara lain *Roseateles* sp. CK15 dengan indeks kelarutan 6,00; *Enterobacter* sp. CK23 dengan indeks kelarutan 6,00; *Rhizobium* sp. CK19 dengan indeks kelarutan 3,85; *Erwinia* sp. CK10 dengan indeks kelarutan 3,67; dan *Erwinia* sp. CK24 dengan indeks kelarutan 3,52.

3.5. Indeks Keanekaragaman, Kemerataan dan Similaritas

Odum (1996) menyatakan keanekaragaman suatu spesies dapat berubah dengan cepat di ekosistem. Tingginya keanekaragaman spesies menunjukkan keseimbangan ekosistem tersebut, sebaliknya rendahnya keanekaragaman spesies menandakan ekosistem mengalami stres atau tekanan. Indeks keanekaragaman (H') menggambarkan keadaan populasi organisme secara matematis untuk mempermudah dalam menganalisis informasi-informasi jumlah individu masing-masing jenis dalam suatu komunitas (Ardi 2002). Sejauh ini indeks keanekaragaman bakteri di lahan gambut belum banyak dipelajari, akan tetapi nilai indeks keanekaragaman mikroba dari tanah mineral dan perairan telah banyak diteliti (Wijiyono 2009, Sugiyarto 2000).

Indeks kemerataan digunakan untuk mengetahui pola penyebaran individu tiap jenis, apakah merata atau tidak. Bila nilai indeks kemerataan tinggi, ini menandakan bahwa

setiap taxon (jenis) penyebarannya rendah. Sebaliknya, jika nilai indeks pemerataan rendah, menandakan bahwa setiap taxon (jenis) penyebarannya tinggi (Krebs 1978).

Untuk membandingkan diversitas/tingkat keanekaragaman bakteri tanah dilakukan analisis indeks similaritas, yaitu rasio antara jumlah spesies yang sama dengan jumlah total spesies. Langkah awal yang dilakukan adalah analisis karakter yang diuji dengan berbagai pengujian, baik dari morfologi, fisiologi ataupun sifat biokimia yang menghasilkan data fenotip yang beragam untuk masing-masing OTU (*Operational Taxonomical Unit*). Data fenotip diolah lebih lanjut sehingga menghasilkan koefisien similaritas, yaitu sebuah fungsi yang mengukur tingkat kemiripan yang dimiliki oleh dua atau lebih strain bakteri. Koefisien ini terdiri atas dua jenis yaitu: *Simple Matching Coeficient* (Ssm) dan *Jaccard Coeficient* (Sj). Ssm merupakan koefisien similaritas yang umum digunakan pada ilmu mikologi untuk mengukur proporsi karakter yang sesuai baik yang hubungannya bersifat ada (positif) maupun yang tidak ada (negatif). Koefisien Sj dihitung tanpa memperhitungkan karakter yang tidak dimiliki oleh kedua organisme tersebut (Stackebrandt *et al.* 1999).

IV. METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Secara singkat dapat dijelaskan bahwa sampel tanah akan disampling dari lahan gambut yang sama dengan kegiatan tahun I dan II. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi, Laboratorium Biokimia dan Laboratorium Analitik Jurusan Kimia, FMIPA Universitas Riau serta Laboratorium Pengujian dan Analisa Kimia Jurusan Teknik Kimia, Fakultas Teknik Universitas Riau. Lokasi Pengambilan sampel tanah gambut berada di Cagar Biosfer GSK-BB yang terletak di Kabupaten Bengkalis-Siak dan Kota Dumai, Propinsi Riau. Sampel tanah tersebut dievaluasi menggunakan metode mikrobiologi sesuai (parameter yang dipilih berdasarkan hasil penelitian dari kegiatan tahun I dan tahun II). Selain itu, dilakukan seleksi koleksi isolat pendegradasi selulosa dan bakteri pelarut fosfat.

4.2 Metode Pengambilan Sampel Tanah

Pengambilan sampel tanah gambut dilakukan dalam tiga tahap. Tahap pengambilan sampel tanah pertama (penelitian tahun I) dilakukan pada lokasi perkebunan akasia umur 4 tahun dan lahan bekas terbakar. Pengambilan sampel tanah gambut tahap kedua (penelitian tahun I) dilakukan pada lokasi hutan gambut alami, perkebunan kelapa sawit, perkebunan karet dan lokasi yang ditanami ubi kayu. Pengambilan sampel tanah dan pengukuran karakter fisika-kimia yang dilakukan dilapangan berlangsung pada saat musim penghujan. Pengambilan sampel tanah tahap ke tiga (penelitian tahun ke II) dilakukan pada lokasi perkebunan akasia umur 1, 3, dan 5 tahun. Pengambilan sampel berikutnya (Penelitian tahun III) dilakukan kembali pada lokasi yang sama yaitu pada lokasi hutan alami (pristine), hutan sekunder, hutan karet, dan kebun kelapa sawit. Deskripsi seluruh lokasi yang digunakan pada penelitian ini disajikan pada Lampiran 1.

Sampel tanah diambil pada lapisan permukaan antara 0-15 cm dengan membersihkan serasah-serasah yang terdapat di permukaan tanah terlebih dahulu. Pengambilan sampel tanah dilakukan secara *purposive random sampling* dengan 4 kali ulangan untuk setiap lokasi pengambilan sampel tanah gambut, sehingga total diperoleh 36 sampel tanah (9 lokasi x 4 ulangan). Sekitar 250 gr sampel tanah diambil dan dimasukkan ke dalam plastik, serta disimpan pada suhu 4°C setelah proses pengambilan dan selama transportasi sampel ke laboratorium.

4.3 Bahan dan Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini terdiri dari: erlemeyer (*Pyrex*), tabung rekasi (*Pyrex*), cawan petri dengan diameter 8 cm dan 10 cm (*CMSI*), beaker glass (*Pyrex*), oven (655F), autoklaf (*UL model 25X-2*), microwave (*SHARP*), alat pemanas (*Maspion*), vortex (*Fisons*), timbangan O-House, timbangan analitik (*AND HF-300*), shaker (*Gallenkamp*), jangka sorong, dryglaski, lampu busen, ose, kapas, aluminium foil, kassa, plastik, kertas label, pipet tetes, batang pengaduk dan spatula.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah medium nutrient broth powder (Oxoid), agar batang, sigmacell selulosa type 20 μm (Sigma Aldrich), *congo red* (Merck), agar bacto (Oxoid), K_2HPO_4 , MgSO_4 , asam sitrat, NaCl, akuades, alkohol, methyl red, kristal violet, iodin, safranin, larutan asam sulfanilat, larutan naftilamin, larutan H_2O_2 3%, larutan fenildiamina 1%, larutan KOH 40%, larutan α -naftol, agar batang, asam sitrat, pepton, K_3PO_4 , yeast ekstrak, gelatin, NaCl, dekstroza, KH_2PO_4 , fenol red, urea, selulosa, arginin, asparagin, glisin, 2-naftol, glukosa, sukrosa, fruktosa, galaktosa, selobiosa, laktosa, ornithin, KCl, pati, kasein, NaOH dan koleksi isolat kegiatan tahun I dan II.

4.4 Pengukuran karakter fisika kimia dan hara tanah

Karakter fisika kimia tanah yang diukur meliputi: *bulk density*, kandungan air, berat kering tanah, pH, temperatur, konduktivitas dan kelembaban dengan mengikuti prosedur standar (Anderson dan Ingram 1992). Unsur hara tanah yang ditentukan adalah total hara karbon, fosfat, dan nitrogen.

4.5 Pembuatan Media

4.5.1 Medium Nutrien Agar

Medium nutrien agar dibuat dengan mencampurkan 8 gr NB dengan 16 gr agar batang dan 1000 ml aquadest dan dipanaskan di atas *hotplate* hingga homogen. Selanjutnya disterilkan dengan menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan psi (Hadioetomo 1993).

4.5.2 Medium Nutrien Broth

Medium *nutrien broth* dibuat dengan mencampurkan 8 gr NB dan 1000 ml aquadest dan dipanaskan di atas *hotplate* hingga homogen. Selanjutnya disterilkan dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan psi (Hadioetomo 1993).

4.5.3 Medium Cellulose Congo Red Agar (CCRA)

Komposisi medium *Cellulose-Congo Red* (CCRA) terdiri dari (g/L) yaitu 0,05 K_2HPO_4 , 0,25 $MgSO_4$, 0,2 Congo Red, 1,88 selulosa dengan pengukuran kristal 20 μm (Sigma), 20 agar bacto, 1000 ml akuades. Semua bahan dilarutkan hingga mencapai 1000 ml di atas pemanas sampai homogen, kemudian pH diatur 5 (asam), dengan penambahan larutan asam sitrat 2% bila kondisi medium dalam keadaan basa dan penambahan NaOH jika kondisi medium dalam keadaan asam. Selanjutnya disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dan tekanan 15 psi (Hendrick *et al.* 1995).

4.4.4 Medium Pikovskaya

Medium Pikovskaya agar dibuat dengan mencampurkan 5 g $Ca_3(PO_4)_2$; 10 g glukosa; 0,2 g NaCl; 0,2 g KCL; 0,5 g $(NH_4)_2SO_4$; 0,5 g yeast ekstrak; 0,1 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,002 g $MnSO_4 \cdot H_2O$; 0,002 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ dan 20 g agar bacto. Semua bahan dilarutkan hingga mencapai 1000 ml di atas pemanas sampai homogen, kemudian pH diatur 5 (asam), dengan penambahan larutan asam sitrat 2% bila kondisi medium dalam keadaan basa dan penambahan NaOH jika kondisi medium dalam keadaan asam. Medium disterilkan menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C tekanan 15 psi (Goenadi *et al.* 2000).

4.5.5 Medium Methyl Red - Voges Proskauer

Medium methyl red - voges proskauer dibuat dengan mencampurkan 7 gr pepton, 5 gr potassium fosfat, 5 gr glukosa dan 1000 ml akuades dan dipanaskan di atas *hotplate* hingga homogen. Selanjutnya disterilkan menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan psi (Hadioetomo 1993).

4.5.6 Medium Pati

Medium pati agar dibuat dengan cara mencampurkan 10 gr pati, 1 gr yeast ekstrak, 0,5 gr potassium klorida, 0,5 gr magnesium sulfat heptahidrat, agar 16 gr dan 1000 ml aquadest dan dipanaskan di atas *hotplate* hingga homogen. Selanjutnya disterilkan dengan menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan psi dengan pH medium 7 (Smibert dan Krieg 1994).

4.5.7 Medium Kasein

Medium kasein dibuat dengan cara mencampurkan 10 gr pepton, 10 gr yeast ekstrak, 10 gr NaCl, 16 gr agar dan 1000 ml aquadest dan dipanaskan di atas *hotplate* hingga

homogen. Selanjutnya disterilkan dengan menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan psi dengan pH medium 7 (Admin 2005). Kemudian ditambahkan kasein 1% yang sudah disterilkan sebelumnya selama 45 menit pada suhu 60°C dalam 3 hari berturut-turut (Dirnawan *et al.* 2000).

4.5.8 Medium Gelatin

Medium gelatin dibuat dengan cara mencampurkan 3 gr yeast ekstrak, 5 gr pepton, 120 gr gelatin dan 1000 ml aquadest dan dipanaskan di atas *hotplate* hingga homogen. Selanjutnya disterilkan dengan menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan psi (Enriquez *et al.* 1995).

4.5.9 Medium Fermentasi

Medium fermentasi dibuat dengan cara mencampurkan 5 gr sumber karbohidrat (seperti selulosa, arginin, asparagin, glisin, 2-naftol, glukosa, sukrosa, fruktosa, galaktosa, selobiosa, laktosa, ornitin), 5 gr pepton, 3 gr yeast ekstrak, 2 tetes indikator fenol red 2% dan aquadest 1000 ml dan dipanaskan di atas *hotplate* hingga homogen. Selanjutnya disterilkan dengan menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan psi dengan pH medium 7 (Hadioetomo 1993).

4.5.10 Medium Urease

Medium urease dibuat dengan cara mencampurkan 1 gr pepton, 5 gr NaCl, 1 gr dekstrosa, 2 gr KH₂PO₄, 12 µg phenol red dan 1000 ml aquadest dan dipanaskan di atas *hotplate* hingga homogen. Selanjutnya disterilkan dengan menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan psi dengan pH medium 6,8. Kemudian ditambahkan urea yang sudah disterilkan sebelumnya selama 45 menit pada suhu 60°C dalam 3 hari berturut-turut (Yarrow 1998).

4.6 Purifikasi Isolat

Koleksi isolat bakteri pada medium NA yang telah ada dimurnikan pada medium yang sama dengan metode *streak plate* kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang sampai didapatkan koloni yang terpisah. Bakteri yang tumbuh diamati bentuk dan pergerakan selnya di bawah mikroskop. Apabila ciri koloni, bentuk sel dan pergerakan sel sudah sama, maka sel tersebut dianggap sudah murni. Apabila belum murni, 1 ose koloni digores lagi pada NA padat hingga didapat kultur murni (Hadioetomo 1993). Isolat yang sudah murni selanjutnya diseleksi sesuai tujuan.

4.7 Karakterisasi Bakteri

4.7.1 Pengamatan Morfologi Koloni dan Sel

Isolat bakteri diinokulasi dengan metode *streak plate* pada medium nutrient agar dan diinkubasi selama 24 jam. Morfologi koloni yang diamati adalah ukuran koloni, bentuk koloni, tepian, elevasi, konsistensi dan warna koloni (Hadioetomo 1993), sedangkan morfologi sel yang diamati adalah bentuk sel.

4.7.2 Pewarnaan Gram

Kaca penutup dan kaca obyek dibersihkan dengan alkohol hingga bebas lemak, kemudian dilewatkan di atas nyala lampu spritus. Diambil secara aseptik sebanyak satu ose isolat bakteri umur 24 jam dan diletakkan pada kaca objek kemudian dilakukan fiksasi di atas nyala lampu spritus. Ditetaskan zat warna dasar (kristal *violet*) sebanyak 2 tetes dan didiamkan selama 1 menit. Setelah itu dicuci dengan air mengalir lalu dikeringanginkan, kemudian ditetesi dengan larutan iodin dan diamkan selama 1 menit. Setelah kering, dicuci dengan larutan peluntur/pemucat (alkohol 95%) sebanyak 2 tetes dan didiamkan selama \pm 30 detik. Selanjutnya dicuci dengan air mengalir lalu dikeringanginkan. Setelah kering diberi larutan zat warna pembanding/penutup (safranin) sebanyak 2 tetes dan didiamkan selama 2 menit dan dicuci dengan air mengalir lalu dikeringkan. Setelah itu diamati dengan mikroskop, bakteri gram positif tampak berwarna biru keunguan sedangkan gram negatif berwarna merah muda (Pelczar 2005).

4.7.3 Uji Motilitas

Isolat bakteri tanah umur 24 jam ditumbuhkan ke dalam medium *nutrien broth* dan diinkubasi selama 24 jam. Setelah waktu inkubasi, 1 tetes kultur diletakkan di atas gelas objek dan diamati di bawah mikroskop (Barrow *et al.* 1993).

4.7.4 Uji Pertumbuhan pada berbagai variasi pH

Isolat bakteri tanah umur 24 jam ditumbuhkan ke dalam medium *nutrient broth* pada pH 3, 5 dan 7, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Setelah waktu inkubasi, diamati pertumbuhannya yang ditandai dengan perubahan medium menjadi keruh (Levine 1954).

4.7.5 Uji Pertumbuhan pada berbagai variasi suhu

Isolat bakteri tanah umur 24 jam ditumbuhkan ke dalam medium *nutrient broth* pada pH 5, diinkubasi pada berbagai variasi suhu 4°C, 29°C dan 50°C selama 24 jam. Setelah

waktu inkubasi, diamati pertumbuhannya yang ditandai dengan perubahan medium menjadi keruh (Levine 1954).

4.7.6 Uji Pertumbuhan pada berbagai konsentrasi NaCl

Isolat bakteri tanah umur 24 jam ditumbuhkan pada berbagai variasi konsentrasi NaCl 3% dan 6,5%, kemudian diinkubasi selama 24 jam. Setelah waktu inkubasi, diamati pertumbuhannya yang ditandai dengan perubahan medium menjadi keruh (Levine 1954).

4.7.7 Uji Voges-Proskauer

Kaldu MR-VP sebanyak 5 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi, diinokulasi bakteri umur 24 jam pada kaldu MR-VP, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah itu ditambahkan 10 tetes larutan KOH 40% dan 15 tetes larutan α -naftol, dikocok dan dibiarkan 30 menit. Uji positif jika kaldu berwarna merah dan uji negatif jika kaldu tidak mengalami perubahan warna setelah penambahan reagen (Lay 1994).

4.7.8 Uji Methyl Red

Disiapkan kaldu MR-VP, lalu dimasukkan 5 ml kaldu MR-VP dalam tabung reaksi dan diinokulasikan biakan bakteri umur 24 jam ke dalam kaldu MR-VP, diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam atau pada suhu 30°C selama 72 jam. Hari berikutnya ditambahkan reagen metil merah 5 tetes, jika kaldu berwarna merah setelah penambahan reagen metil merah maka menunjukkan hasil uji positif, dan jika warna kaldu berwarna kuning maka hasil uji negatif (Lay 1994).

4.7.9 Uji Hidrolisis Pati

Isolat bakteri umur 24 jam ditumbuhkan pada media pati agar dan diinkubasi selama 24 jam. Setelah masa inkubasi, seluruh permukaan agar digenangi dengan iodine. Uji positif ditandai dengan terlihatnya zona bening disekitar isolat (Seeley *et al.* 2001).

4.7.10 Uji Hidrolisis Kasein

Tuang medium kasein yang telah dicairkan ke dalam petridish lalu dibiarkan selama 24 jam hingga padat. Setelah padat diinokulasi dengan kultur bakteri umur 24 jam secara totolan lalu diinkubasi selama 4 hari. Adanya zona bening disekitar koloni menunjukkan hasil positif terhadap hidrolisis kasein. (Hadioetomo 1993).

4.7.11 Uji Hidrolisis Gelatin

Isolat bakteri umur 24 jam ditumbuhkan pada medium nutrient gelatin dan diinkubasi selama 1-7 hari. Kultur dimasukkan ke dalam refrigerator selama 15 menit hingga 2 jam. Uji positif jika terbentuk *liquefaction* di dasar tabung (Enriquez *et al.* 1995).

4.7.12 Uji Fermentasi Karbohidrat

Siapkan kaldu karbohidrat berupa selulosa, arginin, asparagin, glisin, 2-naftol, glukosa, sukrosa, fruktosa, galaktosa, selobiosa, laktosa, ornitin masing-masing 1% yang telah ditetesi indikator fenol red. Kemudian isolat bakteri umur 24 jam diletakkan pada tabung reaksi yang berisi medium fermentasi karbohidrat dan tabung Durham dalam posisi terbalik. Diinkubasi selama 24 jam. Bila warna medium berubah menjadi kuning berarti isolat bakteri tersebut membentuk asam dari fermentasi selulosa, arginin, asparagin, glisin, 2-naftol, glukosa, sukrosa, fruktosa, galaktosa, selobiosa, laktosa, ornitin. Bila di dalam tabung Durham terdapat gelembung udara berarti dari fermentasi tersebut terbentuk gas (Hadioetomo 1993).

4.7.13 Uji Oksidase

Diambil biakan bakteri umur 24 jam dioleskan pada kertas saring, kemudian biakan bakteri ditetesi dengan 2-3 tetes larutan fenildiamina 1%. Uji positif ditandai dengan berubahnya biakan menjadi merah muda, lalu merah tua, merah gelap dan akhirnya hitam (Hadioetomo 1993).

4.7.14 Uji Katalase

Kaca objek dibersihkan dengan alkohol sehingga bebas lemak, kemudian dilewatkan diatas nyala api hingga kering. Diambil biakan bakteri umur 24 jam dengan ose ratakan di atas kaca objek, lalu diteteskkan sebanyak 2-3 tetes H₂O₂ 3% di atasnya. Uji katalase positif ditandai dengan terbentuknya gelembung udara disekitar biakan bakteri (Hadioetomo 1993).

4.7.15 Uji Urease

Inokulasi biakan pada media urea agar miring dengan biakkan bakteri 24 jam, kemudian diinkubasi pada suhu 35°C selama 24 jam. Jika terjadi perubahan warna dari kuning menjadi merah keunguan maka menunjukkan uji positif (Hadioetomo 1993).

4.8 Keanekaragaman Bakteri Tanah

4.8.1 Total Indeks Keanekaragaman dan Kemerataan

Indeks keanekaragaman bakteri tanah dihitung dengan menggunakan formula indeks keanekaragaman Shannon dan Wiener Diversity Indeks (Ludwig 1988) yaitu:

$$H' = - \sum_{i=1}^S (p_i) \ln (p_i)$$

Dimana:

H' = Indeks Keranekaragaman Jenis

ni = Nilai penting jenis ke i

N = Jumlah nilai penting semua jenis

S = Jumlah jenis teramati yang ditemukan

Pi = ni/N = Sebagai proporsi jenis ke-i

Kriteria yang digunakan untuk menginterpretasikan keanekaragaman Shannon-Wiener menurut Ardi (2002) yaitu:

H' < 1, keanekaragaman tergolong rendah

H' 1-3, keanekaragaman tergolong sedang

H' 3 >, keanekaragaman tergolong tinggi.

Indeks kemerataan bakteri tanah dihitung dengan menggunakan formula indeks kemerataan (Odum 1996) yaitu:

$$E = H' / \ln S$$

Dimana:

E = Indeks kemerataan jenis

H = Indeks Shannon

S = Jumlah jenis teramati yang ditemukan

Kriteria yang digunakan untuk menginterpretasikan indeks kemerataan (E) menurut Kerbs (1989) yaitu:

0 < 0.4 Keragaman rendah

0.4 < E < 0.6 Keragaman sedang

E > 0.6 Keragaman tinggi

4.8.2 Kontruksi Dendogram

Nilai similaritas setiap strain bakteri (*Operational Taxonomical Unit*) dihitung dengan membandingkan dengan masing-masing strain yang lain. Data yang didapat dari masing-masing strain yang ada, dibandingkan setiap karakter pembedanya berdasarkan taksonomi Adansonian. Kemudian semua data berupa unit karakter yang ada dimasukkan ke dalam matriks $n \times t$ untuk dianalisis selanjutnya. Tingkat kemiripan akan ditentukan dengan menggunakan program komputer NTSYS-pc 2.02 (Rohlf 1993) dan dibuat konstruksi dendogram berdasarkan nilai dalam matriks similaritas (UPGMA): untuk mengklasifikasikan strain atau OTU (*Operational Taxonomical Unit*) berdasarkan nilai indeks similaritas maka dilakukan pengklusteran ke dalam tabel analisis kluster.

4.9 Isolasi dan Seleksi Bakteri Selulolitik

4.9.1 Isolasi Bakteri Selulolitik

Sebanyak 3 gram sampel tanah dimasukkan dalam 27 ml garam fisiologis 0,85% steril (10^{-1}), diagitasi menggunakan shaker dengan kecepatan 140 rpm dan suhu 28°C selama 2 jam. Kemudian dilakukan pengenceran berseri hingga 10^{-4} , dari larutan sampel 10^{-1} diambil dengan pipet volumetrik sebanyak 1 ml dan dimasukkan dalam 9 ml larutan garam fisiologis 0,85% sehingga diperoleh 10^{-2} , kemudian di vortex hingga homogen. Pengenceran dilakukan sampai pada pengenceran 10^{-4} . Sebanyak 100 μl aliquot larutan tanah diambil dengan faktor pengenceran 10^{-2} - 10^{-3} , kemudian diinokulasikan ke medium CCRA dan diratakan dengan menggunakan dryglaski (*spread plate*). Isolasi bakteri selulolitik metode *pour plate* dilakukan dengan cara, 1ml aliquot larutan tanah diambil dengan faktor pengenceran 10^{-3} - 10^{-4} , kemudian diinokulasikan ke petridish steril dan dimasukkan medium CCRA kedalam petri tersebut, selanjutnya petri digoyang-goyang agar sampel merata. Isolasi bakteri selulolitik dilakukan dengan 2 kali pengulangan (*duplo*) pada setiap lokasi dengan faktor pengenceran 10^{-3} - 10^{-4} . Diinkubasi selama 8-15 hari pada suhu ruang. Isolat bakteri yang diperoleh dimurnikan pada medium NA dengan cara distreak kuadran, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang. Pemurnian ini dilakukan sampai terbentuk koloni tunggal dan terpisah dari yang lainnya. Kemudian koloni yang tumbuh diamati bentuk dan pergerakan selnya di bawah mikroskop. Apabila ciri koloni, bentuk sel dan pergerakan sel sudah sama, maka sel tersebut dianggap murni. Apabila belum murni maka dilakukan streak kuadran kembali pada medium NA.

4.9.2 Uji Potensi Isolat Bakteri Selulolitik

Isolat bakteri selulolitik diinokulasi pada medium CCRA kemudian diinkubasi selama 7-15 hari pada suhu ruang. Zona bening yang terbentuk diukur menggunakan jangka sorong dengan 4 arah yang berbeda, kemudian dibagi dengan diameter koloni bakteri yang tumbuh sehingga dapat diketahui daya degradasi bakteri terhadap selulosa. Daya degradasi selulosa dihitung menggunakan formula (Sudiana *et al.* 2002) sebagai berikut:

$$\text{Daya degradasi} = Z/K$$

dimana:

Z = Zona bening yang terbentuk

K = Diameter koloni bakteri yang tumbuh

4.10 Isolasi dan Seleksi Bakteri Pelarut Fosfat

4.10.1 Isolasi Bakteri Pelarut Fosfat

Sebanyak 3 gram sampel tanah dimasukkan dalam 27 ml garam fisiologis 0,85% steril (10^{-1}), diagitasi menggunakan shaker dengan kecepatan 140 rpm dan suhu 28°C selama 2 jam. Dari larutan sampel 10^{-1} diambil dengan pipet volume sebanyak 1 ml dan dimasukkan dalam 9 ml larutan garam fisiologis 0,85% sehingga diperoleh 10^{-2} , kemudian divortex hingga homogen. Pengenceran dilakukan sampai pada pengenceran 10^{-4} . Pada pengenceran 10^{-4} masing-masing sampel diambil 1 ml dan dilakukan *pour plate* dengan menggunakan medium pikovskaya dengan 2 kali pengulangan. Kultur diinkubasi dengan posisi terbalik pada suhu kamar selama 7 hari. Isolat yang mampu melarutkan P dan membentuk zona bening pada akhir inkubasi merupakan bakteri pelarut fosfat.

4.10.2 Uji Potensi Bakteri Pelarut Fosfat

Isolat bakteri pelarut fosfat hasil isolasi diinokulasi pada medium Pikovskaya pH 5 kemudian diinkubasi selama 7 hari pada suhu ruang. Zona bening yang terbentuk diukur menggunakan jangka sorong dengan 4 arah yang berbeda, kemudian dibagi dengan diameter koloni bakteri yang tumbuh sehingga dapat diketahui daya degradasi bakteri terhadap fosfat. Rasio diameter zona bening dan koloni yang tumbuh dihitung dengan menggunakan rumus indeks kelarutan sebagai berikut:

$$\text{Indeks Kelarutan} = Z/K$$

dimana:

Z = Diameter zona bening (mm)

K = Diameter koloni (mm)

4.10.3 Uji Potensi Bakteri Pelarut Fosfat dalam Melarutkan P pada pH 5, 6 dan 7

Pada tahap ini isolat terseleksi yang memiliki indeks kelarutan ≥ 3 diuji potensi dalam melarutkan P pada pH pertumbuhan 5, 6 dan 7. Pengujian ini dilakukan dengan metode total yaitu dengan menginokulasikan 1 ose isolat bakteri pada medium Pikovskaya dengan pH 5, 6 dan 7 dan diinkubasi pada suhu ruang selama 8 hari. Zona bening yang terbentuk dan koloni yang tumbuh pada hari ke 4, 6, 7 dan 8 diukur diameternya, kemudian ditentukan rasio diameter zona bening dan rasio diameter koloni dengan menggunakan rumus indeks kelarutan.

4.11 Pengukuran Respirasi Tanah

Berbeda dengan kegiatan tahun I dan II, pengukuran respirasi tanah pada kegiatan tahun II dilakukan *ex situ*. Respirasi tanah diukur berdasarkan produksi CO₂ oleh biota tanah. Kecepatan respirasi tanah diukur *en situ* dengan cara sebagai berikut: wadah silinder berkapasitas 20 ml volume diisi 12 ml larutan 1 M KOH dan diletakkan di atas 50 g tanah sampel dari masing-masing lokasi yang telah dimasukkan ke dalam botol Mason. Botol Mason selanjutnya ditutup rapat. Dilakukan hal yang sama, hanya saja tanah diperkaya dengan larutan glukosa 10% dan perlakuan lainnya dimana wadah silinder berisi 12 ml larutan 1 M KOH ditutup rapat sebagai kontrol. Sampel selanjutnya diinkubasi pada suhu ruang selama 1 minggu. Setelah inkubasi, produksi CO₂ yang dihasilkan dianalisis secara titrasi. Kecepatan respirasi tanah (dinyatakan dalam mg CO₂/jam/g tanah) dihitung berdasarkan konsentrasi CO₂ yang terukur dengan memperhitungkan berat tanah dan waktu inkubasi.