

## BAB 4. METODE PENELITIAN

Pada tahun II penelitian ini dilakukan dua tahap percobaan yaitu: Tahap I: Isolasi dan uji potensi mikrob pengkaya 1. Penambat Nitrogen non-simbiotik dan pemerkaya 2. Pelarut Fosfat, tahap II: aplikasi pupuk organik yang diperkaya pada percobaan pot untuk beberapa komoditas tanaman (perkebunan, pangan dan hortikultura). Tahap I dilakukan paralel untuk isolasi dan uji potensi mikrob penambat nitrogen dan pelarut fosfat pada tanah gambut dan mineral, tahap II percobaan pot dilakukan paralel tanaman perkebunan (pembibitan kelapa sawit), pangan (kedelai) dan hortikultura (cabe).

### Tahap I

#### **Percobaan 1. Isolasi dan identifikasi bakteri penambat nitrogen non-simbiotik**

Tujuan percobaan adalah untuk mendapatkan isolat mikrob bakteri penambat nitrogen non-simbiotik. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel tanah mineral, NaCl 85%, media *Yeast Extract Manitol Agar* (YEMA), komposisi dan pembuatan media pada Lampiran 1, media urea, media Simmon Citrate, media MR-VP, media gula, komposisi dan pembuatan media pada Lampiran 2, alkohol 96%, alkohol 70%, kristal violet, safranin, iodine, indikator *phenol red*, indikator *methyl red*, reagen barrit. Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *laminar air flow cabinet*, mikroskop, otoklaf, *vortex mixer*, *refrigerator*, pH meter, rak tabung, kantong plastik, kotak es, cawan petri, tabung reaksi, *erlenmeyer*, *beaker glass*, gelas ukur, kaca objek, spatula, batang pengaduk, pipet volume, timbangan, jarum ose, lampu bunsen, *aluminium foil*, kapas dan kamera digital.

Pelaksanaan penelitian terdiri dari beberapa rangkaian kegiatan yaitu: 1) survei lapangan secara sistematis, 2) isolasi dan purifikasi, 3) identifikasi mikrob dan 4) uji potensi penambatan nitrogen. Data yang diperoleh nantinya akan dianalisis secara deskriptif dalam bentuk tabel dan grafik berdasarkan pengamatan zona bening yang terbentuk pada isolat.

## **Pelaksanaan Penelitian**

### **Pengukuran pH, Kadar Air, dan Temperatur Tanah**

Pengukuran pH tanah dan kadar air dilakukan sebelum pengambilan sampel tanah dengan menggunakan *soil moisture tester* (Lampiran 4.a). Pengukuran dilakukan dengan cara memasukkan *soil moisture tester* ke dalam tanah pada masing-masing lokasi titik sampel sehingga diperoleh data pH dan kadar air sampel tanah. Pengukuran temperatur tanah dilakukan pada saat pengambilan sampel dengan menggunakan thermometer (Lampiran 4.b). Setelah data pH dan kadar air tanah diperoleh, *soil moisture tester* dikeluarkan, kemudian thermometer ditancapkan pada bekas *soil moisture tester* dan diamkan beberapa saat selanjutnya dicatat temperatur tanahnya.

### **Pengambilan Sampel Tanah**

Pengambilan sampel tanah dilakukan pada tanah gambut dan mineral. Lokasi sampel pada tanah gambut berlokasi di Cagar Biosfer Giam Siak Kecil-Bukit Batu (GSK-BB). Lokasi sampel pada tanah mineral berlokasi pada pertanaman cabai, kedelai dan kelapa sawit di kota Pekanbaru.

Pengambilan sampel tanah dilakukan secara bebas. Sampel tanah dari tiap lokasi diambil pada kedalaman 0-20 cm. Pengambilan sampel tanah dilakukan dengan menggunakan bor Belgi. Sebelum bor Belgi ditancapkan ke dalam tanah, terlebih dahulu disterilisasi dengan menggunakan alkohol 96%. Pengambilan sampel tanah, dimulai pada kedalaman 0-20 cm, dimana tanah yang telah terangkat kemudian dimasukkan ke dalam kantong plastik steril dan diberi label. Semua sampel tanah dibawa ke Laboratorium Ilmu Tanah Divisi Biologi Tanah Fakultas Pertanian Universitas Riau, sampel yang akan digunakan untuk keperluan isolasi disimpan pada *refrigerator* hingga analisa dilakukan.

### **Isolasi dan Purifikasi**

Pengenceran tanah dilakukan dengan cara mengambil sampel tanah sebanyak 1 g kemudian dimasukkan kedalam tabung reaksi yang berisi larutan garam fisiologis (NaCl 85%) steril sebanyak 9 mL kemudian dihomogenkan dengan menggunakan *vortex* selama 2 menit dan diberi label pada tabung reaksi pengenceran  $10^{-1}$ . Setelah dihomogenkan sebanyak 1 mL larutan tanah dipindahkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 mL larutan NaCl steril dengan

menggunakan pipet volume, homogenkan kembali dengan menggunakan *vortex* dan beri label pengenceran  $10^{-2}$ . Pengenceran dilakukan sampai  $10^{-7}$ . Pengenceran dengan serial  $10^{-4}$  hingga  $10^{-7}$  masing-masing diambil sebanyak 1 mL untuk ditumbuhkan secara *pour plate* dalam media YEMA dan diinkubasi pada suhu kamar selama dua hari dengan posisi terbalik.

### **Purifikasi Isolat**

Purifikasi isolat dilakukan di dalam *laminar air flow cabinet* dengan cara koloni bakteri pada media YEMA dimurnikan pada media yang sama dengan metode *streak plate* dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang. Koloni yang tumbuh dicek bentuk dan pergerakan selnya dengan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000x. Apabila ciri koloni, bentuk sel, warna, elevasi dan tepi sudah sama maka bakteri tersebut dianggap sudah murni. Kegiatan ini diulang sampai didapatkan koloni yang terpisah dan menampakkan morfologi koloni yang seragam baik warna, ukuran, maupun bentuknya. Isolat-isolat yang sudah murni kemudian dikoleksi didalam tabung reaksi yang berisis media NA untuk selanjutnya dilakukan identifikasi bakteri.

### **Identifikasi Bakteri Penambat Nitrogen Non-simbiotik**

Identifikasi bakteri penambat nitrogen non-simbiotik terdiri dari beberapa kegiatan diantaranya pengamatan karakteristik morfologi koloni, uji fisiologis dan uji biokimia. Isolat bakteri yang sudah diketahui karakternya kemudian dicocokkan dengan buku panduan *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* untuk mengetahui genus dari bakteri penambat nitrogen non-simbiotik.

### **Karakteristik Morfologi Koloni**

Pengamatan karakteristik morfologi koloni dilakukan di laboratorium dimana isolat bakteri hasil isolasi diamati morfologi koloninya. Pengamatan morfologi koloni meliputi warna koloni, bentuk koloni, tepi koloni, elevasi koloni dan diameter koloni (Hadioetomo, 1993).

## Uji Fisiologis

**Pewarnaan Gram.** Isolat murni yang telah diperoleh selanjutnya diidentifikasi melalui pewarnaan gram. Pewarnaan gram dilakukan dengan cara mengambil biakan bakteri yang berumur 24 jam menggunakan jarum ose secara aseptis, kemudian diletakkan di atas gelas objek yang telah dibersihkan dengan alkohol 70% sehingga bebas lemak dan debu kemudian dikeringkan selama 1-2 detik. Bakteri difiksasi dengan cara melewatkan gelas objek pada nyala api beberapa kali. Olesan bakteri ditetesi dengan kristal violet sebanyak 2 tetes dan didiamkan selama 1 menit. Olesan bakteri dicuci dengan air mengalir dan kemudian dikeringkan. Selanjutnya ditetesi dengan Iodin dan diamkan selama 2 menit, dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Biakan tersebut selanjutnya dicuci dengan peluntur alkohol 96% selama kurang lebih 30 detik, selanjutnya ditetesi dengan safranin sebanyak 2 tetes, didiamkan selama 30 detik, dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Preparat diperiksa di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000x. Bakteri gram positif berwarna ungu, sedangkan bakteri gram negatif berwarna merah muda (Hadioetomo, 1993). Bakteri penambat nitrogen non-simbiotik tergolong kedalam bakteri gram negatif.

**Uji Motilitas.** Uji motilitas dilakukan di dalam *laminar air flow cabinet* dengan mengambil biakan bakteri yang berusia 24 jam yang telah ditumbuhkan pada media YEMA selama 24 jam, lalu diletakkan pada kaca objek yang berbentuk cekung dan diamati dengan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000x. Pergerakan bakteri akan terlihat jelas arah dan kecepatan yang berbeda dengan gerakan partikel air.

## Uji Biokimia

Uji biokimia dilakukan dengan menumbuhkan bakteri pada media NA agar miring ke dalam media: Urea, Sitrat, MR (*methyl red*), VP (*vogel proskauer*), gula-gula (glukosa, sukrosa, manitol, laktosa, maltosa). Berikut cara kerja dari uji biokimia menurut Gani (2003) dalam Suyati, 2010.

**Uji Urea.** Uji urea bertujuan untuk mengetahui bakteri yang memiliki enzim urease. Bakteri tertentu dapat menghidrolisis urea dan membentuk ammonia dengan menimbulkan warna merah karena indikator *phenol red*. Terbentuknya ammonia menyebabkan nilai pH menjadi alkali sehingga jika uji urea terjadi

warna merah muda pada media berarti tes positif. Cara kerja uji urea adalah dengan cara koloni bakteri diambil dengan menggunakan jarum ose lancip dan diinokulasi pada media urea (Lampiran 2.a), kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Terjadinya warna merah muda pada media berarti tes positif dari warna dasar media yaitu kuning.

**Uji Sitrat.** Isolat diinokulasi pada medium Simmon Citrate (Lampiran 2.b) dalam tabung reaksi secara vertikal, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam dan diamati perubahan yang terjadi. Uji bernilai positif bila terjadi perubahan warna medium dari hijau menjadi biru yang merupakan indikasi bahwa bakteri mampu menggunakan sitrat sebagai satu-satunya sumber energi.

**Uji Voges Proskauer.** Biakan ditanam pada medium MR-VP (Lampiran 2.c), kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam, masing-masing tabung ditambahkan 10 tetes barrit A dan barrit B. Tabung dikocok selama 20-30 detik. Uji akan bernilai positif jika terbentuk warna merah muda yang merupakan indikasi bahwa bakteri mampu memfermentasikan glukosa dan membentuk asam hingga pH media menjadi 5 atau lebih rendah. Jika selama 20-30 detik medium belum berubah warna, maka hasil pengamatan dilakukan selama 15 menit.

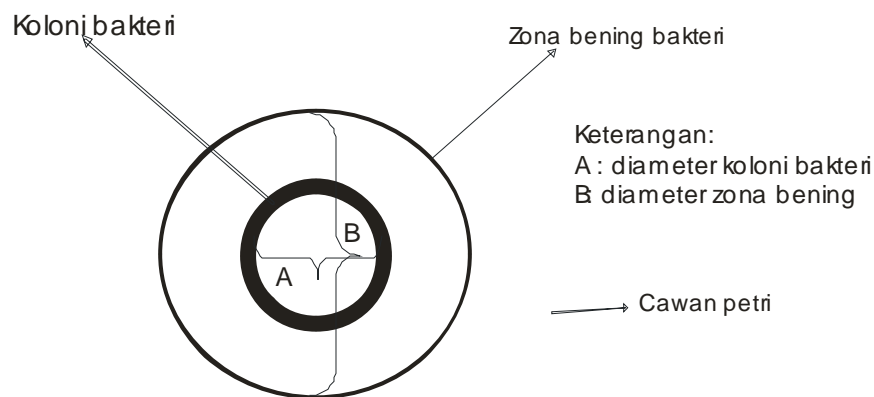
**Uji fermentasi gula (glukosa, sukrosa, manitol, maltosa).** Secara aseptis biakan bakteri dari media NA diinokulasi ke media gula glukosa, sukrosa, manitol, laktosa, maltosa (Lampiran 2.d). Inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil positif ditandai dengan adanya perubahan warna dari merah menjadi kuning.

**Uji katalase.** Uji katalase digunakan untuk mengetahui adanya enzim katalase pada bakteri. Uji katalase dilakukan di dalam *laminar air flow cabinet* dengan menumbuhkan bakteri di media YEMA pada cawan petri, kemudian diinkubasi selama 1 hari, kemudian ditambahkan hidrogen peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 3%. Uji bernilai positif jika terbentuk gelembung udara pada bakteri.

#### **Uji Kemampuan Menambat Nitrogen**

Isolat bakteri yang telah dimurnikan ditotol pada medium YEMA agar modifikasi ditambahkan pewarna *Congo red* yang telah dituang dalam cawan petri, lalu diinkubasi di ruang inkubasi selama tiga sampai tujuh hari pada suhu ruang. Zona bening yang terbentuk diukur dengan menggunakan jangka sorong, kemudian dibagi dengan diameter koloni bakteri yang tumbuh sehingga dapat

diketahui daya penambatan bakteri terhadap nitrogen (Widiawati *et al.*, 2010). Pengukuran zona bening bakteri terlihat pada gambar 1 berikut.



Gambar 1. Pengukuran zona bening bakteri

Rasio diameter zona bening dan koloni yang tumbuh dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Indeks Penambatan} = \frac{Z}{K}$$

Keterangan:

Z = diameter zona bening (mm)

K = diameter koloni (mm)

### Tahap I.

#### Percobaan 2 : Isolasi, uji potensi dan identifikasi mikrob pelarut fosfat

Tujuan percobaan adalah untuk mendapatkan isolat yang berkemampuan tinggi dalam melarutkan fosfat. Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel tanah gambut, Nutrient Agar, Larutan fisiologis (NaCl) 0,85%, aquadest, glukosa,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , NaCl, KCl,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , yeast ekstrak, bakteri agar, safranin, kertas label, *aluminium foil*, kertas wrap, dan spritus.

Sedangkan alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain *laminar air flow cabinet*, *autoclave*, oven, *refrigerator*, *vortex*, timbangan analitik, *orbital shaker*, rak tabung, kantong plastik, cawan petri, tabung reaksi, *erlenmeyer*,

*beaker glass*, gelas ukur, kaca objek, jarum ose, pipet tetes, bunsen, batang pengaduk, spatula, *aluminium foil*, plastik wrap, kapas dan kamera digital.

## **Pelaksanaan Penelitian**

### **Isolasi dan Purifikasi Bakteri Pelarut Fosfat**

Isolasi bakteri pelarut fosfat dilakukan terhadap sampel tanah. Sebelum digunakan, sampel tanah untuk isolasi bakteri dipisahkan dari kotoran (akar tanaman dan bahan organik yang tidak terdekomposisi) dengan tangan.

Kegiatan isolasi dimulai dengan melarutkan 1 g tanah tanaman yang telah ditimbang kedalam 99 mL larutan fisiologis (NaCl 0,85%) steril yang berada di *erlenmeyer* dan kemudian di shaker selama 24 jam untuk menghomogenkan. Kemudian dari masing-masing *stock* dilakukan beberapa seri pengenceran. Pengenceran dilakukan dengan cara mengambil 1 mL larutan tanah kedalam tabung reaksi yang berisi 9 mL larutan NaCl steril dengan menggunakan pipet volume. Kemudian homogenkan dengan menggunakan *vortex* selama 2 menit dan beri label pada tabung reaksi pengenceran. Pengenceran dilakukan sampai dengan seri pengenceran  $10^{-7}$ . Pengenceran dengan seri  $10^{-4} - 10^{-7}$  masing-masing larutan hasil pengenceran yang berisi mikroorganisme tersebut dipipet sebanyak 1 mL, kemudian dituangkan ke dalam cawan petri yang telah berisi larutan media agar Pikovskaya (PVK) (Lampiran 3). Isolat diinkubasi pada temperatur  $37^{\circ}\text{C}$  selama  $\pm$  3-5 hari. Kegiatan ini dilaksanakan di dalam *Laminar air flow cabinet*.

Setelah beberapa hari, koloni bakteri yang tumbuh dan menunjukkan adanya kemampuan melarutkan fosfat yang ditandai dengan terbentuknya zona bening (*clear zone*) pada media PVK selanjutnya diseleksi berdasarkan morfologi yang berbeda baik bentuk, warna, ukuran, dan tepi. Lalu setelah diseleksi dilakukan kegiatan pemurnian koloni untuk mendapatkan isolat murni dari bakteri dengan menggunakan teknik penggoresan. Kegiatan ini dilakukan di dalam *laminar air flow cabinet* dengan cara menggoreskan bakteri dengan menggunakan jarum ose ke media PVK yang baru.

### **Uji Kemampuan Melarutkan Fosfat**

Kegiatan ini bertujuan untuk mengukur kemampuan isolat bakteri pelarut fosfat (BPF) dalam melarutkan fosfat dengan cara rasio zona bening dari masing-masing isolat BPF yang diperoleh. Kegiatan ini dilakukan dengan cara

menumbuhkan isolat-isolat BPF yang telah dikoleksi sebelumnya pada media pvk baru. Setiap cawan petri diberikan 2 ulangan yang kemudian ditumbuhkan selama 5 hari, yang mana pada setiap harinya kita menghitung pertumbuhan diameter koloni bakteri dan aktivitas bakteri dalam melarutkan fosfat yang ditunjukkan dengan adanya zona bening (*clear zone*).

### **Identifikasi Morfologi dan Fisiologis Bakteri Pelarut Fosfat**

Kegiatan identifikasi morfologi koloni bakteri pelarut fosfat ini dilakukan dengan dua cara, yaitu identifikasi secara makroskopis dan mikroskopis. Kegiatan ini dimulai dengan pemurnian dan perbanyakan isolat BPF secara morfologi berbeda pada media pvk dengan cara teknik penggoresan yang ditumbuhkan selama 5 hari. Kegiatan identifikasi morfologi secara makroskopis pengamatan bentuk, ukuran, warna, tepian, dan struktur dalam (Hadioetomo, 1993) berdasarkan buku identifikasi morfologi bakteri. Identifikasi morfologi secara mikroskopis dilakukan dengan cara mengambil koloni tunggal yang telah ditumbuhkan selama 3 hari. Setelah itu dilakukan identifikasi secara fisiologis melalui pewarnaan gram dengan cara mengambil biakan bakteri yang berumur 24 jam menggunakan ose, kemudian letakkan diatas gelas objek yang telah dibersihkan dengan alkohol agar bebas dari lemak dan debu. Tambahkan sedikit aquades dan difiksasi. Fiksasi bakteri dilakukan dengan cara melewatkan gelas objek yang terdapat isolat dan aquades pada nyala api beberapa kali. Kemudian tetesi dengan kristal violet sebanyak 2 tetes dan didiamkan selama 1 menit. Selanjutnya dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan dengan kertas serap. Selanjutnya ditetesi dengan Iodin dan diamkan selama 2 menit, dicuci dengan air mengalir dan keringkan. Setelah itu dicuci dengan menggunakan alkohol 95% selama 30 detik, dicuci dengan air dan dikering anginkan. Selanjutnya ditetesi dengan safranin sebanyak 2 tetes, diamkan selama 30 detik, dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan dengan menggunakan kertas serap. Tutup preparat dengan menggunakan cover gelas lalu diamati di bawah mikroskop. Bakteri gram positif berwarna ungu, sedangkan bakteri gram negatif berwarna merah muda (Hadioetomo, 1993).



## **Tahap II**

### **Percobaan 1. Pengujian pupuk organik granula yang diperkaya skala pot pada pembibitan tanaman perkebunan, produksi tanaman pangan dan hortikultura (sedang bejalan)**

Tujuan Penelitian adalah untuk menguji pengaruh pupuk yang diperkaya pada pembibitan tanaman perkebunan, produksi tanaman pangan dan hortikultura. Penelitian menggunakan rancangan acak lengkap dengan 2 faktor yaitu: Pupuk anorganik terdiri atas 5 taraf (0, 25, 50, 75 dan 100%) dosis anjuran dan pupuk organik granula yang diperkaya dengan 3 ulangan. Penelitian dilaksanakan secara paralel pada pembibitan tanaman kelapa sawit, produksi tanaman pangan (kedelai) dan hortikultura (cabai merah). Data hasil pengamatan dianalisis secara statistik dengan menggunakan Analisis of Variance (Anova). Kemudian dilanjutkan dengan uji *Duncan's New Multiple Range Test* (DNMRT) pada taraf 5 %. Variabel yang diamati: pH, C-organik, nisbah C/N, N total, hara makro dan mikro dan kandungan hara daun (NPK).