

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 , dekstrosa, 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 dekstroza, 2 gr KH_2PO_4 , 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 iodin. 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 totalan 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 ditetaskan sebanyak 2-3 tetes H_2O_2 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 $35^{\circ}C$ selama 24 jam. Jika terjadi perubahan warna dari kuning menjadi merah keunguan maka menunjukkan uji positif (Hadioetomo 1993).

4.8 Keaneekaragaman Bakteri Tanah

4.8.1 Total Indeks Keaneekaragaman dan Kemerataan

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

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

Dimana:

H' = Indeks Keraneekaragaman Jenis

n_i = Nilai penting jenis ke i

N = Jumlah nilai penting semua jenis

S = Jumlah jenis teramati yang ditemukan

$P_i = n_i/N$ = Sebagai proporsi jenis ke- i

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

$H' < 1$, keaneekaragaman tergolong rendah

$H' 1-3$, keaneekaragaman tergolong sedang

$H' 3 >$, keaneekaragaman 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 klaster.

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 dimasukan 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:

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

V. HASIL DAN PEMBAHASAN

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 totol 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.