

IV. METODE PENELITIAN

4.1. Koleksi sampel

Sampel diambil dari beberapa jenis tanaman legum yaitu kacang tanah (*Arachis hypogea*), kacang panjang (*Vigna sinensis*) dan tanaman penutup pada perkebunan kelapa sawit yaitu *Centrocema pubescent*. Pengambilan sampel dilakukan secara acak pada 3 daerah dan masing-masing daerah dilakukan 3 pencuplikan dengan 3 ulangan .

4.2. Isolasi *Rhizobium* spp.

Isolasi *Rhizobium* dilakukan dengan mengambil nodul efektif berwarna merah muda. Nodul yang diperoleh disterilisasi permukaan dengan cara mencucinya dengan alkohol 70 % selama 5-10 menit dan disteril permukaan dengan NaClO₃ selama 10 menit. Nodul tersebut dibilas dengan akuades steril sebanyak 6 kali (Martina, 2003). Nodul tersebut dipotong dan bagian tengahnya yang berwarna merah dihancurkan dengan bantuan skalpel dan jarum steril. Jaringan nodul dibuat suspensi dengan penambahan 1 ml akuades steril. Suspensi inokulum diinokulasi pada cawan petri berisi medium selektif untuk *Rhizobium* yaitu Yeast Manitol Agar (YMA) dan diinkubasi pada suhu 28°C selama 2-4 x 24 jam. Isolat yang diperoleh disubkultur. Hal ini dilakukan beberapa kali sehingga diperoleh isolat *Rhizobium* murni.

4.3. Identifikasi *Rhizobium*

Isolat yang tumbuh pada seleksi tahap I, didapat diamati morfologi dan warna koloni serta dilakukan pewarnaan Gram, bakteri *Rhizobium* dicirikan dengan bentuk batang, gembung, pleomorfik dan gram negatif. Identifikasi isolat dilanjutkan dengan uji

biokimia meliputi fermentasi karbohidrat dan penggunaan sumber nitrogen (Holt *et al.*, 1994 ; Prescott dan Harley, 1994).

4.4. Seleksi isolat *Rhizobium* spp pendegradasi herbisida atrazin

Seleksi isolat bakteri murni pendegradasi atrazin dilakukan melalui 2 tahap.

4.4.1. Seleksi Tahap I

Isolat bakteri murni dibuat suspensi dengan larutan fisiologis. Kertas cakram berdiameter 0,5 cm dicelupkan ke dalam suspensi dan ditumbuhkan pada cawan petri berisi medium garam mineral (MS) yang terdiri dari 10 mM K_2HPO_4 ; 3mM NaH_2PO_4 , 1mM $MgSO_4$ dan 10 ml larutan stok bebas klorida dengan komposisi (mg/l) ; $CaSO_4$, 200 ; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 200 ; $MnSO_4 \cdot H_2O$, 20 ; $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$, 10 ; $CuSO_4$, 20 ; $CoSO_4 \cdot 7H_2O$, 10 ; H_3BO_3 , 2. (de Souza, 1998). Medium MS dimodifikasi dengan penambahan atrazin 5 mg/l. Isolat bakteri yang tumbuh dinyatakan sebagai isolat bakteri terpilih I. Setiap perlakuan isolat dilakukan 3 replikasi.

4.4.2. Seleksi Tahap II

Isolat bakteri terpilih I sebanyak 10^6 sel/ml melalui kertas cakram ditumbuhkan ke dalam medium selektif II berupa medium MS dengan penambahan atrazin 100 mg/l dan Bromothymol blue 20 mg/l. Kultur diinkubasi pada suhu 28°C sampai tampak pertumbuhan koloni bakteri disekitar kertas cakram. Degradasi atrazin oleh *Rhizobium* ditandai dengan terbentuknya zona perubahan warna dari biru menjadi kuning disekitar kertas cakram. Pada zona perubahan warna diukur diameternya untuk mengetahui tingkat kemampuan *Rhizobium* spp mendegradasi atrazin. Setiap perlakuan isolat dilakukan 3 replikasi. Perubahan zona warna yang terbentuk diukur diameternya setiap hari sampai hari ke delapan.

4.5. Analisis Data

Kemampuan degradasi dan pertumbuhan isolat *Rhizobium* sp dari *V. sinensis*, *A. hypogea* dan *C. pubescent* dianalisis berdasarkan perhitungan median yang dibagi atas tinggi, sedang dan rendah