

METODE ANALISIS BIOLOGI TANAH



Editor:

Rasti Saraswati
Edi Husen
R.D.M. Simanungkalit



BALAI BESAR LITBANG SUMBERDAYA LAHAN PERTANIAN
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN PERTANIAN
DEPARTEMEN PERTANIAN
2007



Penanggungjawab:

Kepala Balai Besar Penelitian dan Pengembangan
Sumberdaya Lahan Pertanian

Wakil:

Kepala Balai Penelitian Tanah

Editor:

Rasti Saraswati
Edi Husen
R.D.M. Simanungkalit

Redaksi Pelaksana:

Herry Sastramihardja
Sri Erita Aprillani
Farida Manalu

Setting/Layout:

Didi Supardi
Saleh Iskandar

Penerbit:

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan
Sumberdaya Lahan Pertanian
Jl. Ir. H. Juanda No 98, Bogor 16123, Jawa Barat
Telp. 0251-323012, Fax: 0251-311256
Email: csar@indosat.net.id
<http://www.soil-climate.or.id>

ISBN: 978-602-8039-05-5

Penulisan dan pencetakan buku ini dibiayai DIPA TA 2007
Satker Balai Penelitian Tanah, Bogor.
<http://balittanah.litbang.deptan.go.id>

KATA PENGANTAR

Peran biologi tanah dalam meningkatkan produktivitas lahan menjadi semakin penting ke depan ini karena makin meluasnya lahan pertanian yang salah kelola dan makin terbatasnya sumber daya pupuk anorganik. Berbagai jenis mikroba dan fauna tanah telah diketahui berpotensi sebagai pupuk hayati dan berbagai atribut biologi tanah mulai banyak digunakan sebagai indikator kualitas dan kesehatan tanah. Untuk itu, dalam eksplorasi dan telaah pemanfaatan biologi tanah perlu ditunjang oleh suatu penuntun analisis yang memadai agar data yang dihasilkan dapat diandalkan dalam menyusun teknologi pengelolaan tanah yang tepat.

Buku metode analisis biologi tanah ini merupakan buku pertama penuntun analisis biologi tanah yang diterbitkan oleh Balai Besar Litbang Sumberdaya Lahan Pertanian. Di dalam buku ini dijelaskan prosedur analisis berbagai jenis dan atribut biologi tanah yang disajikan dalam empat Bab besar dan terdiri atas 29 judul prosedur dan analisis.

Dengan diterbitkannya buku ini, diharapkan dapat bermanfaat bagi para pengguna sebagai salah satu acuan dalam analisis biologi tanah.

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Balai Penelitian Tanah dan semua pihak yang telah berkontribusi dalam penyelesaian buku ini.

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan
Sumberdaya Lahan Pertanian
Kepala,

Prof. Dr. Irsal Las, MS.
NIP. 080 037 663

DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR	i
DAFTAR ISI	iii
1 PENDAHULUAN <i>Edi Husen, Rasti Saraswati, & R.D.M. Simanungkalit</i>	1
2 ISOLASI, KARAKTERISASI, DAN ENUMERASI MIKROBA	3
2.1 Pengambilan Contoh Tanah untuk Analisis Mikroba <i>Edi Husen</i>	5
2.2 Enumerasi Bakteri, Cendawan, dan Aktinomiset <i>Ratih Dewi Hastuti & Rohani Cinta Badia Ginting</i>	13
2.3 Bakteri Penambat Nitrogen Hidup Bebas <i>Ratih Dewi Hastuti</i>	23
2.4 Bakteri Pembentuk Bintil Akar <i>Rasti Saraswati</i>	31
2.5 Sianobakteri <i>Jati Purwani</i>	43
2.6 Mikroba Pelarut Fosfat <i>Edi Santosa</i>	55
2.7 Cendawan Mikoriza Arbuskuler <i>R.D.M. Simanungkalit</i>	69
2.8 Bakteri Siderofor <i>Edi Husen</i>	97
2.9 Mikroba Perombak Bahan Organik <i>Rosmimik & Erny Yuniarti</i>	103
2.10 Mikroba Pendegradasi Polutan <i>Erny Yuniarti & Rohani Cinta Badia Ginting</i>	107
2.11 Mikroba Pengakumulasi Logam Berat <i>Rasti Saraswati & Erny Yuniarti</i>	115
2.12 Mikroba Penghasil Asam Indol Asetat <i>Erny Yuniarti & Jati Purwani</i>	119
2.13 Bakteri Koliform <i>Erny Yuniarti</i>	131

2.14	Protozoa <i>Rohani Cinta Badia Ginting, Ea Kosman Anwar, & Rosmimik</i>	139
3	ESTIMASI BIOMASSA DAN AKTIVITAS MIKROBA	149
3.1	Estimasi C-mikroba <i>Edi Santosa & Sri Widati</i>	151
3.2	Respirasi Tanah <i>Sri Widati</i>	165
3.3	Aktivitas Dehidrogenase <i>Erny Yuniarti & Rasti Saraswati</i>	171
3.4	Nitrifikasi <i>Edi Husen</i>	181
3.5	Denitrifikasi <i>R.D.M. Simanungkalit</i>	187
4	AKTIVITAS ENZIM	197
4.1	Kitinase <i>Rohani Cinta Badia Ginting</i>	199
4.2	Ligninase <i>Erny Yuniarti & Rasti Saraswati</i>	209
4.3	Selulase <i>Rosmimik</i>	219
4.4	Fosfatase <i>Edi Santosa & Rohani Cinta Badia Ginting</i>	225
4.5	Protease <i>Erny Yuniarti</i>	241
5	FAUNA TANAH	247
5.1	Pengambilan Contoh untuk Penelitian Fauna Tanah <i>Ea Kosman Anwar</i>	249
5.2	Analisis Kelimpahan dan Keragaman Fauna Tanah <i>Edi Santosa</i>	259
5.3	Analisis Kelimpahan Populasi dan Karakterisasi Cacing Tanah <i>Ea Kosman Anwar</i>	269
5.4	Analisis Kelimpahan Nematoda <i>Rohani Cinta Badia Ginting & Ea Kosman Anwar</i>	283
5.5	Analisis Kelimpahan Arthropoda: Collembola dan Acarina	

1

PENDAHULUAN

Edi Husen, Rasti Saraswati, & R.D.M. Simanungkalit

Tanah merupakan suatu sistem kehidupan yang kompleks yang mengandung berbagai jenis organisme dengan beragam fungsi untuk menjalankan berbagai proses vital bagi kehidupan terestrial. Mikroba bersama-sama fauna tanah melaksanakan berbagai metabolisme yang secara umum disebut aktivitas biologi tanah. Perannya yang penting dalam perombakan bahan organik dan siklus hara menempatkan organisme tanah sebagai faktor sentral dalam memelihara kesuburan dan produktivitas tanah. Kemampuan mengukur kapasitas metabolisme berbagai mikroba dan fauna tanah menjadi basis bagi konsep perlindungan dan penyehatan tanah, terutama pada masa kini dan mendatang dimana laju degradasi lahan terus mengancam sejalan dengan makin terbatasnya sumber daya lahan. Oleh sebab itu, tersedianya metode analisis biologi tanah yang memadai sangat diperlukan untuk mempelajari tanggap organisme tanah yang terkait dengan perubahan sifat fisik dan kimia di lingkungan tanah serta memanfaatkannya, baik sebagai agen penyubur dan pembaik tanah maupun sebagai indikator laju degradasi lahan.

Buku ini menyajikan teknik dasar dalam analisis biologi, biokimia, dan bioteknologi tanah yang sangat esensial dalam mengkuantifikasi berbagai proses biologi pada tanah-tanah pertanian dan kehutanan. Cakupan isi buku termasuk cukup luas dari mikroba sampai fauna tanah. Walaupun belum memuat keseluruhan aspek biologi tanah, topik analisis yang disajikan merupakan pilihan dari berbagai metode analisis yang paling sering dilakukan oleh kebanyakan laboratorium biologi/mikrobiologi. Beberapa metode analisis yang dimuat dalam buku ini tergolong baru dan jarang dijumpai dalam buku-buku metode analisis, seperti bakteri siderofor, mikroba pengakumulasi logam berat dan pendegradasi polutan serta mikroba penghasil hormon asam indol asetat (AIA). Uraian yang komprehensif dan terinci dalam beberapa analisis, seperti analisis cendawan mikroriza akan memudahkan pengguna mempraktekkan teknik analisis, identifikasi, dan perbanyakannya.

Pemisahan bab aktivitas mikroba dengan bab aktivitas enzim pada buku ini (kecuali enzim dehidrogenase) karena aktivitas enzim di dalam tanah tidak hanya bersumber dari mikroba saja, tetapi juga dari tanaman dan hewan, sehingga aktivitasnya tidak selalu berkaitan dengan sel-sel aktif (hidup). Selain itu, pengaruh berbagai senyawa pencemar (polutan) di

dalam tanah terhadap aktivitas enzim sangat berbeda terhadap aktivitas mikroba, misalnya terhadap aktivitas respirasi tanah.

Analisis fauna tanah dengan mengedepankan beberapa fauna tanah yang potensial seperti cacing tanah, collembola dan acarina diharapkan dapat lebih memberdayakan sumber daya hayati ini dalam perbaikan sifat fisik dan kimia tanah. Selain itu, analisis keragaman fauna tanah sangat potensial digunakan sebagai salah satu indeks penting dalam menilai kualitas tanah-tanah pertanian.

Perhatian akan reliabilitas data tidak hanya difokuskan pada teknik dan prosedur analisis di laboratorium saja, tetapi juga terhadap bagaimana bahan analisis (contoh) diperoleh. Oleh sebab itu, teknik pengambilan contoh tanah untuk analisis mikroba maupun teknik koleksi fauna tanah disertakan dalam buku ini. Metode pengambilan contoh yang disajikan sangat berguna untuk mendapatkan data dan informasi yang lebih akurat.

Buku ini ditulis dengan mengacu pada berbagai buku metode analisis biologi tanah yang dianggap standar serta diperkaya dengan berbagai referensi dari jurnal-jurnal penelitian terbaru dan dari pengalaman masing-masing penulis. Beberapa buku metode analisis yang dipakai sebagai referensi antara lain dari Alef & Nannipieri (1995), Weaver *et al.* (1994), dan Schinner *et al.* (1995).

Secara keseluruhan, buku ini disusun untuk menyediakan teknik analisis biologi tanah yang banyak berkembang dewasa ini dan dalam banyak hal menjadi modal dasar dalam pengembangan laboratorium biologi tanah dan standarisasi mutu analisis. Berbagai metode yang disajikan diharapkan dapat menjadi sumber inspirasi bagi para profesional dan peneliti yang sekaligus sebagai sarana untuk saling bertukar informasi dalam pengembangan metode analisis biologi tanah ke depan.

DAFTAR PUSTAKA

- Alef, K. & P. Nannipieri. 1995. *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press. London.
- Schinner, F., R. Öhlinger, E. Kandeler, & R. Margesin. 1995. *Methods in Soil Biology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Weaver, R.W., S. Angle, P. Bottomley, D. Bezdicek, S. Smith, A. Tabatabai, & A. Wollum. 1994. *Methods of Soil Analysis (Microbiological and Biochemical Properties)*. SSSA. Wisconsin, USA.

2

ISOLASI, KARAKTERISASI, DAN ENUMERASI MIKROBA

Bab ini menguraikan teknik dasar pengambilan contoh tanah, isolasi dan perbanyakan mikroba, prosedur enumerasi (penghitungan) populasi mikroba pada contoh tanah atau kepadatan sel dalam biakan murni, dan pengujian karakter fenotip yang terkait dengan fungsi mikroba bagi tanah, tanaman, dan lingkungan.

Salah satu tantangan yang dihadapi dalam analisis mikroba umumnya masih terkait dengan enumerasi populasi. Tantangan yang dihadapi tidak hanya terkait pada pemilihan media yang cocok, tetapi juga berkenaan dengan interpretasi terhadap data hasil analisis yang kadang-kadang tidak menggambarkan kondisi yang sebenarnya di lapangan. Hal ini bisa terjadi karena kekeliruan dalam pengambilan contoh ataupun terkontaminasinya media yang digunakan. Prosedur kerja yang ketat dengan mengedepankan higienisitas merupakan syarat utama dalam analisis mikrobiologi.

Teknik pengenceran bertingkat dalam enumerasi mikroba pada media cawan agar (*plate count*) merupakan teknik enumerasi mikroba tertua yang sampai saat ini masih digunakan. Penemuan agar (polisakarida dari ganggang laut) sebagai media padat sangat bermanfaat dalam mempelajari mikroorganisme karena sifat-sifatnya yang unik, yakni mencair pada suhu 100°C dan membeku pada suhu sekitar 40°C serta tahan perombakan oleh kebanyakan mikroorganisme. Selain teknik enumerasi dengan cawan agar, penghitungan populasi mikroba dengan teknik MPN (*most probable number*), khususnya untuk mikroba yang memiliki karakteristik pertumbuhan tertentu diuraikan secara lebih rinci pada bab ini dengan berbagai variasi cara perhitungan sesuai dengan jenis mikroba yang dianalisis.

Secara keseluruhan bab ini bertujuan untuk menyajikan informasi yang cukup tentang langkah-langkah pengambilan contoh tanah dan analisis mikroba yang terkait dengan isolasi, karakterisasi, dan penghitungan populasi. Beberapa jenis analisis disajikan agak lebih detail, seperti analisis cendawan mikoriza, sehingga pengguna dapat dengan mudah menerapkan dan mengikutinya. Selain itu, disertakan dalam bab ini beberapa jenis analisis yang jarang dijumpai dalam buku metode analisis, seperti mikroba pendegradasi polutan, pengakumulasi logam berat, penghasil asam indol asetat (AIA), dan bakteri penghasil siderofor yang sekarang ini mulai banyak dipelajari dan dikomersialkan.

2.1

PENGAMBILAN CONTOH TANAH UNTUK ANALISIS MIKROBA

Edi Husen

Tanah, dengan kandungan C-organik terbesar di alam, yakni 1,2 – 1,6 x 10¹⁵ kg C (Wagner & Wolf, 1997), menyokong kehidupan berbagai jenis mikroba dari beragam tipe morfologi dan fisiologi, baik yang menguntungkan maupun yang merugikan. Banyak diantaranya yang sudah dikomersialkan seperti mikroba penambat N₂ dari udara, pelarut P, pemacu tumbuh tanaman, dan pengendali patogen. Berbagai atribut mikroba seperti keragaman jenis, kepadatan populasi, dan laju respirasi menjadi indikator yang potensial untuk menilai kualitas dan kesehatan tanah.

Di dalam tanah, keberadaan mikroba sangat dipengaruhi oleh kondisi fisik, kimia, dan biologi tanah. Ungkapan Beijerinck (*the Father of Microbial Ecology*) "*Every-thing is everywhere and the milieu selects*" menjelaskan besarnya peran faktor lingkungan dalam seleksi mikroba; lingkunganlah yang memilih, jenis mikroba mana saja yang dapat hidup dan berkembang-biak dalam suatu ekosistem tanah tertentu. Perbedaan berbagai atribut mikroba pada berbagai kondisi tanah disebabkan antara lain oleh perbedaan jenis dan kandungan bahan organik, kadar air, jenis penggunaan tanah dan cara pengelolaannya. Dengan memperhatikan keberagaman ini, teknik pengambilan contoh tanah yang tepat perlu dipahami agar waktu, tenaga, dan biaya yang dicurahkan untuk pengambilan contoh tanah menjadi lebih efisien. Jumlah contoh yang terlalu banyak merupakan pemborosan, namun apabila jumlah contoh terlalu sedikit interpretasi data bisa keliru sehingga informasi yang diperoleh bisa menjadi kurang bermanfaat.

2.1.1 Prinsip

Pada prinsipnya pengambilan contoh tanah adalah suatu aktivitas pengumpulan sebagian volume tanah yang mewakili suatu wilayah tertentu secara tepat untuk menghasilkan suatu data atau nilai yang bisa memberi gambaran kondisi tanah di wilayah tersebut secara keseluruhan.

Pengambilan contoh harus didahului dengan perencanaan sesuai dengan tujuan pengambilan contoh dan tingkat ketelitian data yang diinginkan. Untuk mendapatkan data tentang suatu atribut mikroba, misalnya kepadatan populasi bakteri Gram negatif pada tanah lapisan atas atau laju respirasi tanah yang dipupuk dengan pupuk hijau (sisa-sisa

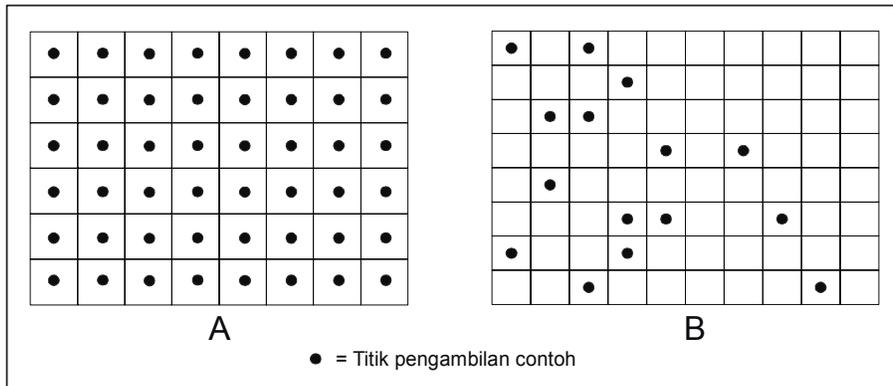
tanaman segar), maka perlu dirancang cara atau strategi pengambilan contoh tanah, jumlah contoh yang diperlukan, kedalaman pengambilan contoh, dan ukuran contoh yang diperlukan.

Strategi pengambilan contoh tanah

Pengambilan contoh tanah dapat dilakukan dengan cara: (i) sistematis; (ii) random/acak; (iii) komposit; dan (iv) bebas, tergantung pada tujuan dan sasaran yang ingin dicapai (Wollum, 1994). Beberapa cara lain yang tidak dibahas di sini biasanya dilakukan untuk tujuan khusus seperti evaluasi tingkat pencemaran dengan cara *polar sampling* atau *algorithm-orientated sampling* oleh Totsche (1995).

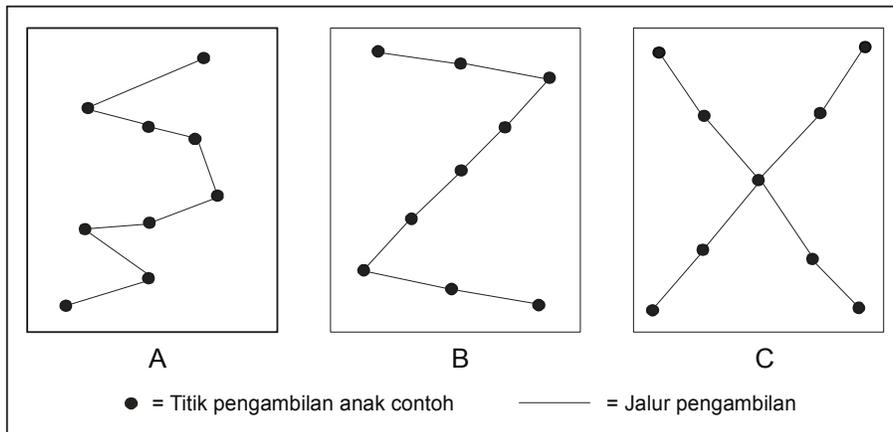
Pengambilan contoh tanah cara sistematis ataupun cara random/acak ditujukan untuk mendapatkan nilai maksimum, minimum, dan rata-rata berbagai atribut mikroba pada suatu areal tertentu berdasarkan analisis statistik. Areal dibagi secara proporsional ke dalam beberapa areal kecil untuk pengambilan contoh individu (*sampling unit*) dimana tiap contoh individu memberikan data sendiri-sendiri.

Pada pengambilan contoh cara sistematis, contoh tanah individu diambil di tiap areal kecil, sedangkan pada cara random hanya dilakukan di beberapa areal kecil yang dipilih secara acak (Gambar 1). Cara random lebih menghemat waktu dan biaya asalkan banyaknya contoh individu yang diambil memperhatikan heterogenitas areal lahan (lihat uraian perhitungan jumlah contoh).



Gambar 1. Pengambilan contoh tanah cara sistematis (A) dan cara random/ acak (B)

Pengambilan contoh tanah komposit ditujukan untuk mendapatkan gambaran umum (*unbiased estimation*) berbagai atribut mikroba di suatu areal atau petak tanah yang relatif homogen. Contoh tanah komposit merupakan campuran dari anak-anak contoh yang diambil dari beberapa tempat pada areal atau petak tanah yg sama secara acak, zigzak, atau diagonal. Tiap areal atau petak tanah diwakili oleh satu contoh tanah komposit. Banyaknya jumlah anak contoh disesuaikan dengan luas areal atau petak tanah. Aturan umum adalah semakin banyak jumlah anak contoh, semakin baik contoh komposit yang dihasilkan (Gambar 2).



Gambar 2. Titik pengambilan anak contoh untuk contoh komposit dengan pola acak (A), zigzag (B), dan diagonal (C)

Pengambilan contoh tanah cara bebas hanya ditujukan untuk keperluan isolasi mikroba (contoh tanah sebagai sumber mikroba). Lokasi atau titik pengambilan contoh dipilih secara bebas sesuai keinginan dan pertimbangan pengguna. Data yang dihasilkan tidak bisa dipakai untuk menggambarkan kondisi umum wilayah di sekitarnya.

Jumlah contoh

Secara ilmiah tujuan pengambilan contoh adalah untuk mendapatkan beberapa unit contoh dari suatu populasi pada tempat dimana pengamatan dilakukan guna memperoleh perkiraan nilai rata-rata populasi tanpa harus mengambil semua unit contoh dalam populasi tersebut. Dua pertanyaan penting yang perlu diperhatikan adalah apakah populasi terdistribusi secara normal dan seberapa dekat nilai rata-rata yang ditetapkan dengan nilai

populasi rata-rata (25%, 10%, atau 5%). Besar kecilnya nilai ini sangat berpengaruh terhadap banyaknya jumlah contoh yang perlu diambil.

Sebagai contoh, diasumsikan bahwa populasi terdistribusi normal dan nilai rata-rata contoh yang diinginkan berada dalam 10% dari nilai rata-rata populasi yang sebenarnya. Nilai rata-rata dan varian (simpangan baku) dari contoh diperoleh dari hasil pengambilan contoh pendahuluan (*presampling*). Dengan demikian banyaknya jumlah contoh yang diperlukan untuk selang kepercayaan 95% (α 0,05) dapat dihitung dengan persamaan berikut:

$$\text{Jumlah contoh} = \frac{(\text{nilai-t})^2 (\text{nilai varian contoh})}{(\text{nilai rata-rata contoh}) (0,1)^2}$$

Penjelasan secara lebih rinci tentang perhitungan banyaknya jumlah contoh dapat dilihat pada Wollum (1994).

Kedalaman pengambilan dan ukuran contoh

Kedalaman pengambilan contoh tanah disesuaikan dengan jenis penggunaan tanah. Pengambilan contoh pada tanah-tanah pertanian dilakukan pada lapisan olah atau pada kedalaman 20 cm. Untuk tanah-tanah padang rumput dan semak/belukar contoh tanah diambil pada lapisan tanah padat akar atau pada kedalaman 10 cm. Pengambilan contoh dari suatu penampang tanah (profil tanah) dilakukan di setiap lapisan horizon tanah.

Ukuran (berat) tiap contoh tanah yang diperlukan tergantung pada banyaknya jenis analisis. Secara umum, 100 g tanah per contoh sudah cukup untuk analisis mikroba.

2.1.2 Prosedur Pengambilan Contoh Tanah

Alat dan bahan

- Sekop atau sendok tanah
- Bor tanah
- Kantong plastik contoh
- Pisau/gunting
- Ember atau baskom plastik
- Kotak es
- Alkohol 90-95%
- Kertas/karton label

- Botol selai bertutup atau botol lain yang sejenis (untuk contoh tanah anaerobik)
- Parafilm atau selotip

Bahan dan peralatan yang akan digunakan harus dalam kondisi bersih dan steril. Sterilisasi alat dapat dilakukan dengan mencuci peralatan menggunakan air bersih, kemudian dibilas atau diusap dengan kapas beralkohol dan dievaporasi dengan nyala api.

Cara kerja

- Catat keadaan umum fisik lingkungan di lokasi pengambilan contoh, antara lain: jenis penggunaan tanah, vegetasi atau tanaman yang diusahakan, riwayat penggunaan tanah (bila tersedia), lereng, ketinggian tempat, dan keadaan permukaan tanah (berbatu, dan lain-lain).
- Khusus contoh tanah untuk *trapping* mikroba simbiosis seperti rhizobia, catat tanaman inang (legum) yang tumbuh di lokasi pengambilan contoh dan ambil contohnya untuk diidentifikasi.

1) Pengambilan contoh tanah non-rizosfir

- Tanah non-rizosfir merupakan bagian tanah tanpa akar dan tanah yang melekat pada akar. Gambar 3 menyajikan pengambilan contoh tanah komposit non-rhizosfir.
- Bersihkan permukaan tanah di lokasi/titik pengambilan contoh dari tanaman dan serasah (*litter*). Kemudian tetapkan volume penggalian tanah, misalnya 20 x 20 x 20 cm atau 10 x 10 x 20 cm (panjang, lebar dan kedalaman), yang penting ukuran volume pengambilan contoh ini konsisten di tiap titik pengambilan contoh.
- Gali tanah dengan sendok tanah atau spatula (kape). Gunakan bor tanah untuk pengambilan contoh tanah pada kedalaman tertentu.
- Bersihkan tanah galian dari sisa tanaman dan potongan akar.
- Dengan sendok tanah, masukkan sejumlah tanah dengan volume atau berat tertentu (sesuai kebutuhan) ke dalam kantong plastik dan diberi label. Gunakan botol selai bertutup atau yang sejenis untuk contoh tanah anaerobik. Untuk contoh komposit, contoh tanah ini dimasukkan ke dalam ember atau baskom plastik untuk digabung dengan anak contoh tanah lain. Setelah diaduk rata dengan sendok tanah, sejumlah tanah dengan volume atau berat tertentu (sesuai kebutuhan) dimasukkan ke dalam kantong plastik dan diberi label.
- Masukkan segera contoh tanah ke dalam kotak es agar terhindar dari suhu tinggi. Pemberian es batu dalam kotak es dilakukan bila perjalanan contoh tanah ke laborato-rium memerlukan waktu lama.

- Untuk pengambilan contoh tanah di tempat lain, cuci semua peralatan dengan air dan sterilkan seperti dijelaskan pada bagian Alat dan Bahan di atas.



Gambar 3. Titik pengambilan (titik *sampling*) contoh individu (kiri), baskom (tengah) atau kantong/karung plastik (kanan) sebagai wadah pencampur contoh individu dari berbagai titik sampling untuk mendapatkan satu contoh komposit tanah non-rizosfir

2) Pengambilan contoh tanah rizosfir/rizoplan

- Rizosfir merupakan porsi tanah yang langsung dipengaruhi oleh akar tanaman, sedangkan rizoplan adalah permukaan akar dengan tanah yang melekat kuat pada permukaannya. Batas rizosfir dimulai dari permukaan akar sampai ke batas dimana akar tidak lagi berpengaruh langsung terhadap kehidupan mikroba (bisa mencapai 5 mm).
- Tetapkan tanaman yang akan digali dan bersihkan permukaan tanah di bawah tajuk dari daun atau serasah.
- Gali tanah di bawah tajuk di sekitar perakaran secara perlahan-lahan dengan sendok tanah atau spatula. Kemudian pisahkan akar dari bongkahan tanah besar dan membiarkan sebanyak mungkin tanah yang melekat pada akar.
- Potong bagian tajuk tanaman di dekat pangkal akar (Gambar 4), kemudian masukkan akar beserta tanah yang melekat ke dalam plastik, beri label, dan selanjutnya masukkan ke dalam kotak es.
- Pengambilan contoh rizosfir/rizoplan kedua dari jenis tanaman yang berbeda dilakukan setelah semua peralatan bersih dan steril dengan cara seperti dijelaskan pada bagian alat dan bahan di atas.

2.1.3 Penyimpanan Contoh Tanah

Pada dasarnya, penyimpanan contoh tanah untuk analisis mikroba tidak dianjurkan. Namun apabila jumlah contoh terlalu banyak dan tidak memungkinkan untuk segera memproses dan menganalisisnya, maka

sebagian contoh dapat disimpan pada kondisi yang sesedikit mungkin terjadinya perubahan.

Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa tekstur tanah, kandungan air awal, dan suhu penyimpanan berpengaruh terhadap parameter biomassa dan aktivitas mikroba (Foster, 1995). Suhu terbaik penyimpanan contoh tanah adalah 2 - 4°C, yakni untuk penyimpanan sampai 4 minggu. Suhu -20°C biasanya digunakan untuk penyimpanan contoh tanah dalam jangka panjang.



Gambar 4. Akar beserta tanah yang melekat kuat diambil sebagai contoh tanah rizosfir/rizoplan (CR)

DAFTAR PUSTAKA

- Foster, J.C. 1995. Soil sampling and storage. p 49-51. *In* K. Alef & P. Nannipieri (Eds.) *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press. London.
- Totsche, K. 1995. Quality – project – design –spatial sampling. p 5-24. *In* K. Alef & P. Nannipieri (Eds.) *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press. London.
- Wagner, G. H. & D.C. Wolf. 1997. Carbon transformation and soil organic matter formation. p 218-258. *In* D.M. Silvia, J.J. Fuhrmann, P.G. Hartel, & D.A Zuberer (Eds.) *Principles and Applications of Soil Microbiology*. Prentice Hall. New Jersey.
- Wollum, A.G. 1994. Soil sampling for microbial analysis. p 1-14. *In* R.W. Weaver, S. Angle, P. Bottomley, D. Bezdicek, S. Smith, A. Tabatabai,

& A. Wollum (*Eds.*) *Methods of Soil Analysis (Microbiological and Biochemical Properties)*. SSSA. Wisconsin, USA.

ENUMERASI BAKTERI, CENDAWAN, DAN AKTINOMISETES

Ratih Dewi Hastuti & Rohani Cinta Badia Ginting

Tanah merupakan suatu ekosistem yang mengandung berbagai jenis mikroba dengan morfologi dan sifat fisiologi yang berbeda-beda. Jumlah tiap kelompok mikroba sangat bervariasi, ada yang hanya terdiri atas beberapa individu, ada pula yang jumlahnya mencapai jutaan per g tanah. Banyaknya mikroba berpengaruh terhadap sifat kimia dan fisik tanah serta pertumbuhan tanaman. Dengan mengetahui jumlah dan aktivitas mikroba di dalam suatu tanah dapat diketahui apakah tanah tersebut termasuk subur atau tidak karena populasi mikroba yang tinggi menunjukkan adanya suplai makanan/energi yang cukup, suhu yang sesuai, ketersediaan air yang cukup, dan kondisi ekologi tanah yang mendukung perkembangan mikroba.

Mikroba tanah dapat diisolasi dan ditumbuhkan pada medium buatan. Pertumbuhan suatu jenis mikroba dapat dikenali pada medium dengan substrat khusus dan pemakaian zat penghambat. Jumlah mikroba yang tumbuh pada medium tertentu ditunjukkan oleh *colony forming units* (CFU) atau satuan bentuk koloni.

Bakteri adalah organisme prokariotik bersel tunggal dengan jumlah kelompok paling banyak dan dijumpai di tiap ekosistem terestrial. Walaupun ukurannya lebih kecil daripada aktinomisetes dan jamur, bakteri memiliki kemampuan metabolik lebih beragam dan memegang peranan penting dalam pembentukan tanah, dekomposisi bahan organik, remediasi tanah-tanah tercemar, transformasi unsur hara, berintegrasi secara mutualistik dengan tanaman, dan juga sebagai penyebab penyakit tanaman.

Teknik cawan pengenceran adalah suatu cara yang biasa digunakan untuk menghitung dan mempelajari populasi bakteri tanah yang beragam dan perubahan kerapatan populasinya. Beberapa medium yang banyak digunakan adalah agar ekstrak tanah (*soil extract agar*), *trypticase soy agar* (TSA), dan *nutrient agar* (NA).

Larkin (1972) melaporkan bahwa medium *peptonized milk-actidion* agar (PMA) secara nyata lebih baik dari TSA atau SE untuk menghitung jumlah bakteri (Tabel 1). Beberapa keuntungan bila menggunakan PMA adalah dapat diulang (*reproducible*), tidak mudah terkontaminasi oleh cendawan dan aktinomisetes, dan sedikit koloni yang menyebar. Medium ini juga meningkatkan jumlah koloni berpigmen seperti oranye, merah, kuning, dan ungu. Ukuran koloni hampir sama dengan koloni pada medium SE agar.

Cendawan (*fungi*) adalah mikroorganisme eukariotik yang berbentuk filamen. Cendawan biasanya terdapat pada tempat-tempat yang banyak mengandung substrat organik. Peran cendawan dalam suatu ekosistem biasanya sebagai perombak bahan organik, agen penyakit, simbiosis yang menguntungkan, dan agen agregasi tanah. Metode agar cawan merupakan cara yang biasa digunakan untuk menghitung total cendawan karena baik untuk mikroorganisme berspora dan cendawan lebih cepat tumbuh.

Tabel 1. Jumlah bakteri rata-rata yang ditumbuhkan pada medium PMA, TSA, dan SE dari berbagai jenis tanah^{*)}

Sumber contoh	Rata-rata jumlah bakteri ($\times 10^5$)		
	PMA	SE	TSA
Tanah gurun			
- Iron Spring, Ariz	530	163	88
- Toyahvale, Tex	700	74	31
Tanah subur			
- Oak grove	97	33	28
- Halaman	67	16	
Padang rumput	650	350	55
Lumpur			
- Elbow Bayou	280	163	

^{*)} Sumber: Larkin (1972)

- PMA (*peptonized milk-actidione agar*), SE (*soil extract agar* dengan glukosa), TSA (*tripticase soy agar*).

Aktinomisetes adalah kelompok mikroorganisme yang berada di antara bakteri dan cendawan. Aktinomisetes mempunyai miselium yang sangat halus dan tidak bersekat. Koloni aktinomisetes pada medium agar biasanya kohesif atau sangat lekat. Pada kebanyakan tanah, jumlah aktinomisetes dapat mencapai 10–25% dari total mikroba pada cawan agar bahkan ada yang melebihi 50%.

Ottow & Glathe (1968) mengembangkan medium sederhana *rose bengal-malt extract agar* untuk enumerasi cendawan dan aktinomisetes secara bersamaan. Keuntungan pemakaiannya adalah medium ini mampu mendeteksi koloni kecil aktinomisetes pada medium, dengan karakteristik bentuk bulat dan seragam, dan berwarna merah muda. Tabel 2 menyajikan hasil pengujian medium *rose bengal-malt extract agar* dan beberapa medium lain untuk menghitung total cendawan dan aktinomisetes.

Tabel 2. Total aktinomisetes dan cendawan dari profil tanah

braunerde, gley dan pseudogley dengan metode cawan hitung^{)}*

Keterangan	<i>2% Malt extract agar</i>	<i>Rose bengal- Malt extract agar</i>	<i>Glycerol- Glycine- agar</i>	<i>Glucose- Asparagin e agar</i>	<i>Oatmeal agar</i>	
	Cendawan		Aktinomisetes			
Total	60,05	64,27	19,52	20,68	17,69	12,31

^{*)} Sumber: Ottow & Glathe (1968)

- Jumlah aktinomisetes dikalikan 10^6 yang mewakili jumlah aktinomisetes per g tanah kering oven. Jumlah cendawan dikalikan 10^4

Total aktinomisetes tertinggi dihasilkan oleh medium *Glycerol-Glycine* agar yang diikuti oleh medium *rose bengal-malt extract agar*. Pada *glycerol-glycine agar*, aktinomisetes dan bakteri tampak sebagai koloni putih dan sulit dibedakan. Sedangkan pada *rose bengal-malt extract agar*, hanya sedikit bakteri yang tumbuh. Pada medium ini total cendawan yang diperoleh juga lebih besar dibandingkan dengan medium cendawan yang lain, sehingga medium ini dapat dipilih untuk enumerasi cendawan dan aktinomisetes.

2.2.1 Prinsip

Teknik yang banyak digunakan untuk menghitung total mikroba tanah adalah metode agar cawan. Metode agar cawan biasa disebut juga cawan pengenceran (*dilution-plate* atau *dilution-count*). Prinsip dasar metode cawan pengenceran adalah tiap sel mikroba yang hidup dalam suspensi tanah akan berkembang dan membentuk suatu koloni dalam kondisi lingkungan yang sesuai. Asumsi utama dari metode agar cawan ini adalah penyebaran contoh merata, medium tumbuh cocok dengan mikroba, dan tidak ada interaksi antara mikroba pada medium. Hitungan total yang diperoleh menunjukkan jumlah sel yang berkembang pada medium yang dipakai pada kondisi inkubasi tertentu.

Untuk menumbuhkan mikroba hasil pengenceran di dalam cawan Petri dapat dilakukan dengan metode sebar (*spread plate count*) atau metode tuang (*pour plate count*). Metode tuang dilakukan dengan cara menuang 20 ml medium steril dengan suhu kira-kira $45-50^{\circ}\text{C}$ di atas 1 ml inokulum yang sudah dimasukkan ke dalam cawan Petri steril. Selanjutnya cawan Petri tersebut digoyang berputar dengan tangan di atas permukaan meja, lalu didinginkan biar agar menjadi beku.

Metode sebar dilakukan dengan cara menuang 20 ml medium steril terlebih dahulu ke dalam cawan Petri dan dibiarkan menjadi dingin.

Selanjutnya inokulum diinokulasikan di tengah cawan Petri dan disebar dengan batang penyebar yang terlebih dahulu disterilisasi dengan etanol dan dibakar.

2.2.2 Penetapan Kadar Air Tanah

Alat dan bahan

- Kaleng untuk mengukur kadar air
- Timbangan
- Oven
- Desikator
- Contoh tanah

Prosedur

- Timbang kaleng dan catat berat kaleng awal.
- Masukkan kira-kira 10 g contoh tanah dan catat beratnya (berat basah tanah + kaleng).
- Keringkan dalam oven pada suhu 105°C selama 3 jam.
- Setelah pengeringan, dinginkan kaleng dan contoh tanah selama 10 menit dalam desikator (berat kering tanah + kaleng).
- Timbang berat kaleng.

Perhitungan

$$KA (\%) = \frac{bb (\text{tanah} + \text{kaleng}) - bk (\text{tanah} + \text{kaleng})}{bb (\text{tanah} + \text{kaleng}) - \text{berat kaleng}} \times 100\%$$

KA = kadar air contoh tanah (%)

bb = berat basah (g)

bk = berat kering (g)

Contoh: bb (tanah + kaleng) 20 g; bk (tanah + kaleng) 17,5 g; dan berat kaleng 10 g. Kadar air (KA) tanah = $\{(20 - 17,5) \times 100\% \} / (20 - 10)$
= 25%

2.2.3 Enumerasi Total Bakteri, Cendawan, dan Aktinomisetes

Alat

- Botol serum besar
- Botol serum kecil
- Cawan Petri
- Pipet mikro dan tip ukuran 1 ml dan 200 μ l
- Batang penyebar (*spreader*)
- *Vortex*
- Timbangan

Bahan

- Contoh tanah
- Larutan 0,85% NaCl
- Tween 80
- Etanol
- Medium pertumbuhan untuk bakteri, cendawan, dan aktinomisetes:

Mikroba	Medium pertumbuhan
Bakteri	Medium <i>nutrien agar</i> (NA) <i>Peptonized milk-actidione agar</i> (PMA) Agar ekstrak tanah
Cendawan	<i>Rose bengal-streptomycin agar</i> <i>Rose bengal-malt extract agar</i>
Aktinomisetes	<i>Rose bengal-malt extract agar</i> <i>Humic acid-vitamin agar</i> (HV agar)

- Medium *nutrien agar* (NA)
 - Timbang 31 g *nutrient agar* dan masukkan ke dalam 1 L akuades. Sterilisasi medium dengan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 0,1 Mpa selama 15 menit. Tambahkan 50 ml larutan siklo-heksamida (67 mg per 100 ml H₂O) yang telah disterilisasi dengan filter ukuran 0,2 μ m ke medium steril yang bersuhu 60°C. Selanjutnya tuang ke cawan Petri.
- Medium *peptonized milk-actidione agar* (PMA)
 - Timbang 1 g *peptonized milk*, 15 g agar, dan 0,1 g antifungal (antibiotik *actidione*). Sterilisasi medium dengan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 0,1 Mpa selama 15 menit.
- Ekstrak tanah
 - Aduk 1 kg tanah dengan 1,5 L akuades. Sterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 0,1 MPa selama 15 menit. Setelah dingin, saring supernatan dengan filter yang dimasukkan ke dalam corong. Bila larutan tanah dengan cara ini sukar diperoleh, masukkan suspensi tanah yang keruh tersebut ke dalam labu Erlenmeyer. Simpan di dalam lemari es pada

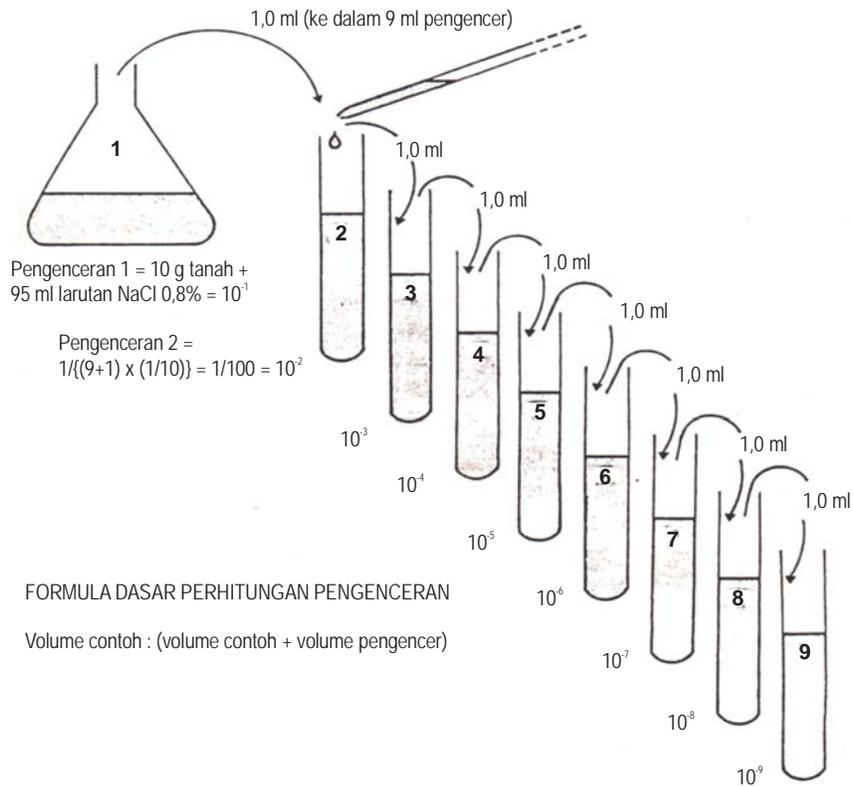
suhu 4°C selama satu malam. Larutan jernih merupakan larutan tanah.

- Medium agar ekstrak tanah
 - Masukkan 20 g agar; 0,5 g K_2HPO_4 ; dan 0,1 g dekstrosa ke dalam 1 L ekstrak tanah. Sesuaikan pH larutan antara pH 6,8-7,0 dengan HCl atau NaOH encer. Kemudian sterilisasi medium dengan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 0,1 MPa selama 15 menit.
- Medium *rose bengal-streptomycin agar*
 - Timbang 10 g glukosa; 5 g pepton; 1 g K_2HPO_4 ; 0,05 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,033 g rose bengal; 15 g agar dan masukkan ke dalam 1 L akuades. Sterilisasi medium dengan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 0,1 MPa selama 15 menit. Tambahkan 0,2 μ L streptomisin (disterilisasi dengan filter) ke dalam medium yang sudah steril dan pada suhu 60°C.
- Medium *rose bengal-malt extract agar*
 - Timbang 20 g malt ekstrak; 0,5 g K_2HPO_4 ; 1 ppm masing-masing Fe, Mn, Cu, Zn, Mo, B, Co, (penambahan sebagai garam-garam terlarut, bukan sebagai nitrat), rose bengal (1 per 15.000); 20 g agar dan masukkan ke dalam 1 L akuades pH 6,0 – 6,2. Sterilisasi medium dengan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 0,1 MPa selama 15 menit.
- Medium *humic acid-vitamin agar* (HV agar)
 - Timbang 1 g asam humik acid; 0,02 g $CaCO_3$; 0,01 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$; 1,71 g KCl; 0,05 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,5 g Na_2HPO_4 ; 50 g siklohesamida; 20 g agar dan masukkan ke dalam 1 L akuades pH 7,2. Sterilisasi medium dengan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 0,1 MPa selama 15 menit. Tambahkan 5 ml vitamin B dan 20 ppm asam *nalidixic* ke dalam medium steril.

Prosedur

3) Pengenceran contoh tanah.

- Timbang 10 g tanah dan masukkan ke dalam botol tertutup yang berisi 95 ml larutan NaCl 0,85% dan satu tetes tween 80 steril (Beberapa buku manual menggunakan 90 ml larutan pengencer). Beberapa metode pengenceran menggunakan 0,1% pepton sebagai pengencer. Catat berat tanah. Kocok selama 2 menit, beri label pada botol pengenceran 10^{-1} . Setelah dikocok, pindahkan 1 ml larutan tanah ke tabung reaksi yang berisi 9 ml larutan NaCl steril. Kocok dengan vortex, dan beri label pengenceran 10^{-2} . Gunakan pipet yang baru pada setiap pemindahan 1 ml larutan. Pengenceran dilakukan sampai pada pengenceran 10^{-7}



Gambar 1. Seri pengenceran

4) Penyebaran (*plating*) mikroba

- Pipet 0,1 ml larutan tanah pada pengenceran serial 10^{-4} - 10^{-7} (bakteri), 10^{-2} - 10^{-5} (cendawan), dan 10^{-3} - 10^{-6} (aktinomisetes) dan teteskan di bagian tengah cawan Petri pada permukaan agar. Setiap pengenceran diulang dua kali (duplo). Pemindahan dimulai dari pengenceran 10^{-7} . Selanjutnya sebar dengan batang penyebar steril (celupkan batang penyebar dalam etanol dan bakar, setelah diperkirakan dingin baru digunakan). Beri label di bagian pinggir tiap cawan Petri (gunakan kode singkatan pengenceran). Inkubasi cawan Petri pada posisi terbalik selama 3-4 hari (bakteri), 5-7 hari (cendawan), dan 10-12 hari (aktinomisetes) pada suhu 25°C . Lakukan semua proses pengenceran dan penyebaran secara aseptis.

5) Penghitungan koloni.

- Bakteri dihitung hanya dari cawan Petri yang mempunyai 30-300 koloni, cendawan 10-100 koloni, dan aktinomisetes 30-300 koloni.

Perhitungan

$$\text{Total populasi (CFU) g}^{-1} \text{ tanah kering} = \frac{(\text{jumlah koloni}) \times (\text{fp})}{\text{bk tanah}}$$

Keterangan:

fp = faktor pengenceran pada cawan Petri yang koloninya dihitung

bk = berat kering contoh tanah (g) = berat basah x (1 – kadar air)

Contoh: Jumlah koloni pada cawan Petri yang dihitung adalah 65 koloni, yakni pada cawan pengenceran 10^{-6} . Kadar air tanah 25% (lihat 2.2.2). sehingga berat kering contoh tanah yang digunakan adalah $\{1 \times (1 - (25/100))\} \text{ g} = 0,75 \text{ g}$. Dengan demikian total populasi adalah $(65 \times 10^6) / 0,75 \text{ g} = 8,7 \times 10^7 \text{ CFU per g tanah kering}$.

2.2.4 Ulasan

1. Persyaratan yang harus diperhatikan apabila menggunakan metode agar cawan adalah dalam setiap tahapan pelaksanaannya harus selalu sama, agar data yang diperoleh setiap individu dapat dibandingkan.
2. Kelemahan metode agar cawan dalam menghitung jumlah total mikroba yang hidup adalah: (a) masih ada sel yang tersisa pada agregat tanah atau menempel pada partikel tanah; (b) adanya sel yang mati dalam medium pengenceran; (c) kegagalan pertumbuhan spora; (d) sel menempel pada dinding pipet; (e) selektivitas yang tinggi pada medium dalam cawan dan kondisi inkubasi (Skinner *et al.*, 1952). Untuk mengatasi kelemahan ini perlu diperhatikan dalam metode analisisnya seperti lama pengocokan contoh tanah, pemakaian larutan untuk serial pengenceran (misalnya NaCl 0,85%), pemakaian medium yang cocok dan selektif.
3. Contoh tanah yang digunakan untuk membuat seri pengenceran harus dalam keadaan alami dan tidak boleh dikeringkan. Penyimpanan contoh tanah dalam kondisi lembap pada suhu kamar tidak boleh melebihi satu hari karena mikroba akan berkembang biak pada kondisi demikian.
4. Contoh tanah dari seri pengenceran yang telah disiapkan tidak boleh terlalu lama dibiarkan sebelum dan sesudah pengocokan (tidak lebih dari 10 menit). Pemipetan contoh dilakukan segera setelah dikocok kembali dengan menggoyangkan dengan tangan dan diambil dari bagian tengah suspensi.
5. Bakteri dan aktinomisetes di tanah biasanya lebih banyak daripada cendawan, sehingga mikroba ini memerlukan suatu medium yang mempunyai pH masam (4 sampai 5) untuk menghambat pertumbuhan mikroba lain atau dengan menggunakan medium yang mengandung rose bengal.

6. Aktinomisetes merupakan kelompok mikroorganisme yang mempunyai kemampuan tumbuh dalam medium yang mengandung nitrogen rendah. Sifat ini dapat digunakan untuk mencegah berkembangnya bakteri yang cepat menyebar. Banyak medium selektif untuk aktinomisetes yang dirancang untuk mengurangi pertumbuhan cendawan dan bakteri guna menyokong pertumbuhan aktinomisetes, tetapi dalam tulisan ini hanya dua medium selektif yang dibahas.

DAFTAR PUSTAKA

- Larkin, J.M. 1972. Peptonized milk as an enumeration medium for soil bacteria. *Appl. Microbiology*. 23 (5): 1031-1032.
- Ottow, J.C.G & H. Glathe. 1968. Rose bengal-malt extract agar, a simple medium for the simultaneous isolation and enumeration of fungi and actinomycetes from soil. *Appl. Microbiology*. 16(1): 170-171.
- Skinner, F.A., P.C.T. Jones, & J.E. Mollison. 1952. A comparison of a direct and plate counting technique for quantitative estimation of soil microorganisms. *J. Gen. Microbiol.* 6: 261-271.

BAKTERI PENAMBAT NITROGEN HIDUP BEBAS

Ratih Dewi Hastuti

Bakteri yang hidup bebas dan mempunyai kemampuan menambat nitrogen dari udara banyak ditemukan hampir di tiap *niche* ekologi tanah. Bakteri ini biasanya berasosiasi dengan tanaman, sistem perairan, dan sedimen (Knowles, 1982). Dalam bab ini dibahas bakteri penambat nitrogen hidup bebas yang sudah banyak dikenal dan digunakan sebagai inokulan seperti *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Azospirillum*, dan bakteri endofitik diazotrof lainnya.

Konsep aerobik diazotroph adalah bakteri yang berada di sekitar perakaran tanaman yang mampu menggunakan molekul N_2 sebagai sumber nitrogen untuk pertumbuhannya. Pada umumnya bakteri ini mempunyai mekanisme untuk melindungi enzim dari pengaruh oksigen meskipun bakteri ini sendiri memerlukan oksigen untuk respirasi dan pembentukan ATP. Mekanisme ini dikenal dengan istilah perlindungan respirasi (*respiratory protection*). Untuk mengatasi permasalahan oksigen, beberapa bakteri mempunyai ciri khusus seperti *Azospirillum* yang termasuk aerobik diazotrof, bersifat mikroaerofilik yaitu menambat nitrogen pada kondisi tekanan oksigen sangat rendah (0,007 atm atau 0,7 KPa) (Okon *et al.*, 1977a) dan sistem perlindungan respirasi pada *Azotobacter* memerlukan banyak substrat karbon untuk memenuhi kebutuhan oksigen dan pertumbuhannya. Beberapa spesies *Azotobacter* menghasilkan protein untuk mengikat nitrogenase dan melindunginya dari kerusakan oleh oksigen. Selain itu, beberapa bakteri aerobik diazotrof menghasilkan koloni besar dan *gummy* (ekstraselular polisakarida) pada media agar bebas nitrogen yang berfungsi sebagai penghalang (*barrier*), sehingga bagian dalam koloni terbebas dari oksigen.

2.3.1 Isolasi dan Identifikasi *Azotobacter* (Krieg & Dobereiner, 1984)

Prinsip

Azotobacter spp. dapat mengikat N_2 dari udara secara bebas. Bakteri ini sangat sensitif terhadap pH rendah sehingga pada $pH < 6$ *Azotobacter* jarang dijumpai. Biakan *Azotobacter* spp. dapat berkembang dan membentuk koloni pada cawan agar yang diinkubasi dalam suhu ruang. Bakteri ini mempunyai kemampuan tumbuh dalam substrat yang banyak mengandung karbohidrat dan tidak mengandung nitrogen, sedangkan bakteri heterotrofik yang lain tidak tumbuh dalam kondisi ini karena tidak

mempunyai kemampuan mengikat N_2 dari udara. Sifat ini memudahkan untuk isolasi *Azotobacter*. Koloni *Azotobacter* berkembang cukup cepat dan mempunyai ciri khusus yang memungkinkan untuk dikenali. Secara visual *Azotobacter* dapat dikenal dengan ciri-ciri: koloni kecil dan banyak, mengkilap, biasanya mempunyai permukaan yang datar dengan sedikit cekung di bagian tengah, seperti susu dan kelihatan bening. Warna koloni sangat tergantung pada spesies, misalnya *A.chroococcum* biasanya menghasilkan pigmen coklat atau hitam.

Alat dan bahan

- Cawan Petri
- Tabung reaksi
- Lup inokulasi
- Labu Erlenmeyer
- Pengaduk gelas
- Lampu spiritus
- Vortex
- Mesin pengocok
- Inkubator
- Autoklaf
- Alkohol
- Larutan garam fisiologis (NaCl 0,85 %) untuk seri pengenceran

Media

- Media seleksi *Azotobacter* (LG medium):
 - Timbang sukrosa 20 g; K_2HPO_4 0,05 g; KH_2PO_4 0,15 g; $CaCl_2$ 0,01 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,20 g; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 2 mg; $FeCl_2$ 0,01 g; bromtimol biru (0,5% larutan dalam etanol) 2 ml; $CaCO_3$ 1 g; agar 15 g dan akuades 1.000 ml.

Prosedur

- Masukkan 10 g contoh tanah ke dalam 90 ml larutan garam fisiologis steril, kemudian buat seri pengenceran dari 10^{-1} hingga 10^{-7} .
- Inokulasi tiap seri pengenceran ke dalam medium seleksi *Azotobacter*, dan inkubasi pada suhu $30^\circ C$.
- Koloni *Azotobacter chroococcum* tampak setelah 24 jam inkubasi dengan ciri putih basah dan berubah menjadi coklat gelap setelah 3-5 hari. Ciri koloni *Azotobacter vinelandii* dan *Azomonas* sama, hanya tidak berubah gelap. Sedangkan koloni *Azotobacter paspali*, setelah inkubasi 48 jam, pusat koloni menjadi kuning yang disebabkan asimilasi bromtimol biru dan pengasaman medium.

2.3.2 Isolasi dan Identifikasi Azospirillum
(Okon et al., 1977b; Reinhold et al., 1987; Khammas et al., 1989;
Dobereiner, 1992)

Prinsip

Ada lima species *Azospirillum* yang mempunyai sifat fisiologis berbeda, yaitu *A. brasilense*, *A. liporerum*, *A. amazonense*, *A. irakense* dan *A. balopraeferans*. Untuk mengisolasinya digunakan medium semi-padat bebas nitrogen karena bakteri ini mempunyai karakteristik aerotaktik, yaitu berpindah dari suatu tempat di dalam medium untuk mencari keseimbangan difusi oksigen. Bakteri ini membentuk pelikel yang terletak 5 mm dari permukaan media yang kemudian akan berpindah ke permukaan ketika nitrogen di dalam sel sudah terakumulasi.

Alat dan bahan

- (Lihat 2.3.1)

Media dan larutan

- Medium Nfb semi-padat:
 - Timbang 5 g asam malat; 0,5 g K_2HPO_4 ; 0,2 gr $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,1 g NaCl; 0,02 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$; 2 ml larutan unsur mikro; 2 ml bromtimol biru (0,5% larutan dalam 0,2 M KOH); larutan FeEDTA 1,64%; 1 ml larutan vitamin; dan 1,75 g agar. Semua bahan dilarutkan dalam 800 ml akuades. Atur pH menjadi 6,8 dengan KOH dan tambahkan akuades sampai volume media 1.000 ml
- Larutan unsur mikro
 - Timbang 0,4 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$; 0,12 g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$; 1,40 g H_2BO_4 ; 1 g $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$; dan 1,5 g $MnSO_4 \cdot H_2O$. Larutkan dalam 800 ml akuades, kemudian tambahkan akuades sampai volume media 1.000 ml
- Larutan vitamin
 - Timbang 10 mg biotin; 20 mg pyridoxol-HCl; akuades 100 ml. Larutan ini jangan diautoklaf.
- Medium kentang
 - Timbang 200 g kentang segar, kupas dan masak selama 30 menit dalam 1.000 ml akuades, kemudian saring dengan kain. Tambahkan 2,5 g asam malat; 2,5 g sukrosa; 15 g agar. Atur pH menjadi 6,8.
- Medium semi-padat untuk isolasi *A. amazonese* (medium LGI)
 - Timbang 0,2 g K_2HPO_4 ; 0,6 g KH_2PO_4 ; 0,002 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$; 0,2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,002 g $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$; 0,01 g $FeCl_2$; bromotimol biru (larutan 0,5% dalam KOH 0,2M); 5 g sukrosa; dan 1,8

g agar. Larutkan dalam 800 ml akuades, atur pH menjadi 6,0 dan tambahkan akuades sampai 1.000 ml.

Prosedur

- Masukkan 10 g contoh tanah ke dalam 90 ml larutan garam fisiologis steril, kemudian kocok dan buat seri pengenceran 10^{-1} hingga 10^{-7} .
- Inokulasi serial pengenceran ke dalam medium seleksi Nfb semi-padat (sebanyak lima ulangan per seri pengenceran), dan inkubasi selama 3 - 5 hari hingga terbentuk pelikel berbentuk cincin berwarna putih (berarti positif) dan yang tidak membentuk pelikel (berarti negatif).
- Amati pertumbuhannya, isolasi pelikel dan gores pada media agar yang sama tetapi diberi agar 15 g L^{-1} dan tambahkan $0,02 \text{ yeast extract}$. Kemudian inkubasi selama 6 - 7 hari.
- Apabila sudah ada koloni tunggal (kecil, putih agak kering dan keriting), pindahkan satu koloni ke media semi-padat nitrogen bebas yang baru dan murnikan dengan menggoreskannya pada medium kentang.
- Setelah inkubasi, koloni kecil, keriting dan kering akan muncul dan berubah agak merah muda setelah 1 minggu. Kemudian pindahkan ke semi-padat NfB dalam botol kecil untuk identifikasi di bawah mikroskop (*in wet mounts*).

Sel *A. brasiliense* bersifat sangat motil, kurva batang dengan perpindahan spirilloid. Sedangkan pada sel *A. lipoferum* biasanya warna medium berubah dari warna semula kuning menjadi biru (alkalin), dan berubah menjadi bentuk pleomorfik.

Menurut Khamnas *et al.* (1989), *A. irakense* dapat diisolasi dengan cara yang sama, kecuali inkubasi dilakukan pada suhu 30°C .

Azospirillum halopraeferans (Reinhold *et al.*, 1987) diisolasi pada medium basa tetapi dengan modifikasi: atur pH menjadi 8,5; tambahkan 1,2% NaCl, dan inkubasi cawan Petri pada suhu 41°C .

A. amazonense bagus diisolasi pada medium sukrosa semi-padat. Setelah inkubasi selama 3-5 hari pada suhu 35°C akan terbentuk pelikel, kemudian goreskan pelikel di atas medium LGI yang mengandung 0,02 g ekstrak khamir. Bentuk sel biasanya kecil, putih, koloni keriting, hampir sama dengan *Azospirillum* spp. yang lainnya. Ini terbentuk setelah 5 hari inkubasi dan cek lagi di medium semi-padat LGI untuk ketergantungan nitrogen tanpa produksi asam (medium berwarna hijau). Pemurnian dilakukan dengan menggoreskannya pada medium agar kentang yang mengandung sukrosa dan malat. Pada medium ini, koloni *A. amazonense* berwarna putih dan menjadi besar (5 mm) dengan permukaan tepi yang timbul. Bentuk koloni sangat berbeda dari *Azospirillum* spp. yang lainnya.

Azospirillum spp merupakan bakteri tanah, tetapi beberapa di antaranya banyak terdapat di rizosfir dan ada strain tertentu yang mampu menginfeksi akar atau batang pada berbagai tanaman (Dobereiner, 1992).

Ulasan

Bila *Azospirillum* dibiakkan di dalam media cair, maka pH media harus diperhatikan. Media malat mempunyai pH awal 7,0. Sama halnya dengan bakteri lain, *Azospirillum* memerlukan selang pH yang tertentu untuk pertumbuhannya.

Kenaikan pH media *Azospirillum* disebabkan bakteri ini mengikat N_2 dari udara dan membentuk NH_4^+ atau dalam bentuk senyawa N lainnya dan membebaskannya ke dalam media. Pada permulaan, peningkatan pH tidak terlalu tinggi tetapi setelah beberapa hari pH meningkat lebih dari 1,0 unit. Hal ini perlu diperhatikan dalam membiakkan *Azospirillum* karena pertumbuhan akan terhalang akibat tingginya pH media. Sebaiknya media dijaga agar tetap 7,0 dengan penambahan 0,01 M H_2SO_4 .

2.3.3 Isolasi dan Identifikasi *Herbaspirillum* dan *Acetobacter* (Calvalcante & Dobereiner, 1988; Gillis *et al.*, 1989; Dobereiner, 1992; Reinhold-Hurek *et al.*, 1993)

Prinsip

Herbaspirillum spp., *Azoarcus* spp., dan *Acetobacter diazotrophicus* adalah obligat tanaman endofit atau hanya dapat diisolasi dari tanaman inang. Baru-baru ini ditemukan bahwa bakteri ini lebih banyak ke arah efisiensi penambatan nitrogen yang menghasilkan pertumbuhan tanaman yang lebih baik, khususnya di daerah tropik. *H. seropedicae* banyak dijumpai di rizosfir tanaman rumput-rumputan. *H. rubrisubalbicans* sampai saat ini diketahui sebagai *Pseudomonas rubrisubalbicans* (Gillis *et al.*, 1991; Pimentel *et al.*, 1991), yakni patogen pada tanaman tebu yang menyebabkan penyakit *mottled stripe* pada varietas tebu yang sensitif. Sedangkan *Azoarcus* diisolasi dari rumput Kallar (*Leptochloa fusca*) di Pakistan (Reinhold-Hurek *et al.*, 1993).

Alat

- Inkubator 30-35°C
- Mikroskop
- Alat gelas steril
- Cawan Petri

Bahan

- Medium semi-padat JNFb untuk mengisolasi *Herbaspirillum* spp., *H. seropedicae* dan *H. rubrisubalbicans*.

D,L-asam malat	5 g
K ₂ HPO ₄	1,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
NaCl ₂ .2H ₂ O	0,02 g
Larutan mikro mikro (seperti di atas)	2 ml
Vitamin (seperti di atas)	1 ml
Larutan FeEDTA 1,64%	4 ml
Larutan bromtimol biru (0,5% dalam 0,2M KOH)	2 ml
Agar	2 g

- Larutkan dalam 800 ml akuades, utur pH menjadi 6, dan tambahkan akuades sampai 1.000 ml. Pelarutan bahan dilakukan secara bertahap.

Prosedur

Herbaspirillum seropedicae dapat diisolasi dari sampel akar, batang dan daun pada semua jenis tanaman rumput-rumputan, sedangkan *H. rubrisubalbicans* diisolasi dari tanaman tebu dengan menggunakan media semi padat JNFb, biasanya diperoleh dari pengenceran 10^{-2} - 10^{-6} . Pertumbuhan *Herbaspirillum* spp. dalam medium ditunjukkan oleh adanya pelikel yang mirip *Azospirillum* spp. Di bawah mikroskop fase kontras (*wet mounts*) bentuk selnya lebih kecil (0,6 – 0,7 x 3-5 μ m), berbentuk kurva dan hanya terlihat perpindahan yang spiraloid ketika dekat dengan gelembung udara. Kedua jenis bakteri ini mempunyai sifat morfologi sangat sama dan hanya dapat dibedakan apabila kedua bakteri ini ditumbuhkan dalam sumber karbon dengan kombinasi nitrogen *meso-erythritol* yang pada *Herbaspirillum seropedicae* negatif sedangkan *H. rubrisubalbicans* positif atau menggunakan sekuensing 23S rRNA. Isolasi *Herbaspirillum* spp. dilakukan pada cawan Petri yang berisi media agar NFb dengan 0,02 g sari khamir dan 4 ml bromtimol biru. Pada awal inkubasi bentuk koloni kecil, basah, dan berwarna putih, tetapi setelah diinkubasi selama 1 minggu bagian tengah koloni akan berubah menjadi biru gelap. Pemurnian dilakukan pada media agar kentang dengan sukrosa dan malat. Setelah inkubasi bentuk koloni kecil, basah, timbul dan bagian tengah koloni menjadi coklat.

Untuk *Azoarcus* spp., pertumbuhan pada medium semi-padat NFb sama dengan *Herbaspirillum* spp. Koloni bakteri ini di atas medium NFb agar berbentuk *non-difusible* berwarna kekuningan yang akan lebih terlihat apabila sumber karbonnya etanol. Sel *Azoarcus* terjadi satu koloni atau

berpasangan, dengan ukuran lebar 0,4 – 1,0 μm , panjang 1,1 - 4 μm dan berbentuk mirip huruf S (Reinhold-Hurek *et al.*, 1993).

Acetobacter diazotrophicus dapat diisolasi dengan medium semi-padat LGIP dengan komposisi medium sama seperti medium LGI, tetapi sumber karbon adalah sukrosa atau gula tebu dengan konsentrasi 100 g L⁻¹ dan konsentrasi agar ditingkatkan menjadi 2 g. Pengaturan pH 5,5 dilakukan dengan penambahan asam asetat. Dalam medium ini, 4 - 6 hari setelah inokulasi (pada 0,1 ml batang atau daun tebu yang sudah digiling), akan muncul pelikel bawah-permukaan (*subsurface*) yang kemudian pindah ke permukaan dengan warna menjadi oranye gelap, sedangkan medium di bawahnya menjadi tidak berwarna yang disebabkan asimilasi bromtimol biru oleh bakteri. Kemudian dimurnikan pada medium yang sama di cawan Petri (dengan 20 g agar L⁻¹). Setelah inkubasi selama 1 minggu, muncul koloni kecil berwarna oranye gelap dan basah. Koloni ini mudah dikenali dan dimurnikan pada medium agar kentang yang mengandung 10% gula tebu (tidak menggunakan malat). Pada medium kentang, koloni akan terbentuk setelah 1 minggu inkubasi dengan warna coklat gelap dan lembap.

Ulasan

Acetobacter diazotrophicus hanya dapat diisolasi dari tanaman tebu, ubi jalar dan rumput Kamerun atau semua jenis tanaman yang kaya gula yang diperbanyak secara vegetatif. Hal ini berarti bahwa bakteri obligat endofitik dapat di-*transmitted* dalam batang yang terpotong dari tanaman. Bakteri ini tidak dapat diisolasi dari tanah ataupun tanaman lain (Calvante & Dobereiner, 1988; Gillis *et al.*, 1989).

DAFTAR PUSTAKA

- Calvante, V.A. & J. Dobereiner. 1988. A new acid tolerant nitrogen fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant Soil* 108: 23-31.
- Dobereiner, J, 1992. The genera *Azospirillum* and *Herbaspirillum*. p 2236-2253. *In* A. Ballows, H.G. Truper, M. Working, W. Harder, & K.H. Schleifer (*Eds.*) *The Prokaryotes*. Springer Verlag. Berlin.
- Gillis, M., K. Kersters, B. Hoste., D. Jenssens, R.M. Kroppensted, M.P. Stephan, K.R.S. Teixeira, J. Dobereiner, & J. De Ley. 1989. *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov., a nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. *Int J System Bacteriol* 39: 361-364.
- Gillis, M., J. Dobereiner, B. Pot, M. Goor, E. Falsen, B. Hoste, B. Reinhold, & K. Kersters. 1991. *Herbaspirillum seropedicae* and (*Aquaspirillum*)

- autotrophicum*. p 291-292. In M. Polsinelli & R. Materassi (Eds.) Nitrogen Fixation. Kluwer Acad. Publishers. Amsterdam.
- Khammas, K.M., E. Ageron, P.A.D. Grimont, & P. Kaiser. 1989. *Azospirillum irakense* sp.nov., a nitrogen fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. Res Microbiol 140: 679-693.
- Knowles, R. 1982. Free-living dinitrogen-fixing bacteria. Methods of soil analysis, Part 2, Chemical and Microbiological Properties-Agronomy. Monograph no.9 (2nd edition).
- Krieg, N.R. & J. Dobereiner. 1984. Genus *Azospirillum*. p 94-104. In J.G. Holt & N.R. Krieg (Eds.). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol 1. Williams and Wilkins. Baltimore.
- Okon, Y., J. Phouchins, S.L. Albrecht, & R.H. Burris. 1977a. Growth of *Spirillum lipoferum* at constant partial pressures of oxygen and the properties of its nitrogenase in cell-free extracts. J. Gen. Microbiol 98: 87-93.
- Okon Y, S.L. Albrecht, & R.H. Burris. 1977b. Methods for growing *Spirillum lipoferum* and for counting it in pure culture and in association with plants. Appl. Environ Microbiol 33 :85-88.
- Reinhold, B. T. Hurek, I. Fendrik, B. Pot, M. Gillis, K. Kersters, D. Thielemans, & J. De Ley. 1987. *Azospirillum halopraeferans* sp.nov., a nitrogen fixing organism associated with roots of Kallar grass (*Leptochloa fusca* L.). Int J System Bacteriol 37: 43-51.
- Reinhold-Hurek, B. T. Hurek, M. Gillis, B. Hoste, M. Vascanneyt, K. Kersters, & J. De Ley. 1993. *Azoarcus* gen.nov., nitrogen fixing proteobacteria associated with roots of Kallar grass (*Leptochloa fusca* L.), and description of two species, *Azoarcus indigens* sp.nov. and *Azoarcus communis* sp. Int J System Bacteriol 43: 574-584.
- Pimentel, J.P., F.L. Olivares, R.M. Pitaed, S. Urquiaga, F. Akiba, & J. Dobereiner. 1991. Dinitrogen fixation and infection of grass leaves by *Pseudomonas rubrisubalbicans* and *Herbaspirillum seropedicae*. Plant Soil 137: 61-65.

BAKTERI PEMBENTUK BINTIL AKAR

Rasti Saraswati

Bakteri bintil akar atau rhizobia merupakan bakteri rizosfir yang mampu melakukan penambatan nitrogen udara melalui simbiosis dengan tanaman kacang-kacangan, dan secara genetik sangat beragam dan secara fisiologi merupakan kelompok mikroorganisme yang heterogen, oleh karena itu diklasifikasikan sesuai kemampuannya membentuk bintil akar pada sekelompok tanaman dari famili *Leguminosae*. Klasifikasi ini mengacu pada kelompok "inokulasi silang", dimana satu spesies *Rhizobium* dapat membentuk bintil akar pada semua jenis legum dalam satu kelompok legum.

Berdasarkan sekuens 16S ribosomal RNA, rhizobia dikelompokkan ke dalam tiga genus, yaitu *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* dan *Azorhizobium* (Young *et al.*, 1991; Willems & Collins, 1993; Yanagi & Yamasato, 1993). Selanjutnya Young & Haukka (1996) mengelompokkan rhizobia menjadi lima genus, yaitu *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Sinorhizobium* dan *Mesorhizobium*. De Lajudie *et al.* (1998) menambah satu genus lagi, yaitu *Allorhizobium*, sehingga jumlahnya menjadi enam genus.

Secara umum rhizobia dibedakan atas rhizobia tumbuh lambat (*Bradyrhizobium*) dan rhizobia tumbuh cepat (*Sinorhizobium*).

(1) *Bradyrhizobium*

Genus *Bradyrhizobium* merupakan rhizobia penghasil basa, membutuhkan waktu 3-5 hari untuk pertumbuhannya dalam medium cair dengan *doubling time* 6-7 jam. Genus ini termasuk anggota famili Rhizobiaceae, mampu mengikat nitrogen bebas dari udara melalui simbiosisnya dengan tanaman kedelai (*Glycine max*). Bakteri ini memiliki karakteristik khas untuk genus bakteri bintil akar, yaitu berbentuk batang berukuran 0,5-0,9 x 1,2 x 3,0 μm , bersifat aerobik, Gram negatif, serta tidak membentuk spora. Selnya memiliki flagella pada bagian kutub atau sub-kutub (Jordan, 1984). *Bradyrhizobium* sebagai mikroba kemoorganotrof, pada dasarnya dapat menggunakan berbagai karbohidrat, garam-garam mineral dan asam-asam organik (Allen & Allen, 1981).

Bradyrhizobium memiliki koloni berbentuk bundar, berwarna putih, berelevasi cembung, cenderung bertekstur granular, berdiameter tidak lebih dari 1 mm dalam masa inkubasi 5-7 hari pada medium sari khamir manitol (SKM) pada suhu 28°C, dan umumnya resisten terhadap streptomisin, penisilin G, tetrasiklin, viomisin, vancomisin (Jordan, 1984). Koloni *Bradyrhizobium* yang ditumbuhkan pada medium SKM-merah kongo,

setelah inkubasi 7-10 hari pada suhu 28°C dibedakan menjadi tiga tipe, yaitu LM (*large mucoid*), LW (*large watery*) dan SD (*small dry*). Koloni tipe LM berdiameter >1 mm, berlendir, cembung, translusens hingga *opag*; tipe LW berdiameter lebih dari 1 mm, berair, datar, translusens, cenderung granular dengan tepian tidak teratur; tipe SD berdiameter <1 mm, cembung, translucens hingga hampir *opag*. Kebanyakan *Bradyrhizobium* yang *indigenous* memiliki tipe LM (Fuhrmann, 1990).

Rhizobia yang dapat menodulasi tanaman kedelai dikenal sebagai *Bradyrhizobium japonicum* (Jordan 1982), meskipun pada kenyataannya *B. japonicum* bukan merupakan mikrosimbion tunggal untuk inang ini. Strain lain yang mampu menodulasi tanaman kedelai berupa *B. elkanii* (Kuykendall *et al.*, 1992) dan *B. liaoningense* (Xu *et al.*, 1995). Kemampuan menodulasi tanaman kedelai oleh *B. japonicum* lebih tinggi daripada *B. elkanii*.

Gen-gen utama untuk fungsi simbiotik, nodulasi dan penambatan nitrogen pada *B. japonicum* berada pada kromosom (Barbour *et al.*, 1992). Disamping itu, *B. japonicum* juga memiliki plasmid berukuran besar yang dikenal sebagai *megaplasmid* (Masterson *et al.*, 1982). *B. japonicum* memiliki satu kromosom besar dan sirkular berukuran 8,7 Mpb dengan gen-gen simbiotik yang terkluster pada daerah 380 kpb (Kundig *et al.*, 1993).

(2) *Sinorhizobium*

Genus *Sinorhizobium* yang secara *in vitro* bereaksi asam berhasil diisolasi pada tahun 1982 dari bintil akar kedelai yang dikoleksi di Republik Rakyat Cina (RRC). Strain rhizobia tumbuh cepat tersebut infeksiif dan efektif terhadap varietas kedelai primitif Peking (P117852.B) (*Glycine soja* Sieb.), namun sedikit atau tidak efektif terhadap varietas kedelai komersial yang tumbuh di USA. Berdasarkan studi perbandingan dalam hal keperluan hara, resistensi terhadap antibiotik, toleransi terhadap NaCl, profil plasmid, lokalisasi gen-gen untuk aktivitas nodulasi, hibridisasi DNA, dan karakter-karakter lainnya, strain-strain tersebut diusulkan ke dalam spesies baru *Rhizobium fredii*, dengan dua kemovar *fredii* dan *xinjiangensis* (Keyser *et al.*, 1982; Scholla & Elkan, 1984) sehingga dikenal dua spesies *S. fredii* dan *S. Xinjiangensis* (Chen *et al.*, 1988).

Sinorhizobium pertama kali diusulkan karena adanya beberapa perbedaan antara *R. fredii* dengan rhizobia lainnya (termasuk *R. meliloti*) (Chen *et al.*, 1988). Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Jarvis, Downer & Young pada tahun 1992 antara *R. fredii* dan *R. meliloti* memiliki kemiripan, sehingga digolongkan ke dalam genus *Sinorhizobium*. *S. fredii* merupakan rhizobia tumbuh cepat yang dapat menodulasi tanaman kedelai. Bakteri ini berbentuk batang berukuran 0,5-0,9 x 1,2 x 3,0 µm, bersifat aerobik, Gram negatif, bereaksi asam pada medium manitol-garam mineral,

dan koloninya berbentuk bundar, berelevasi cembung, agak tembus cahaya, lengket, berdiameter 2-4 mm selama masa inkubasi 3-5 hari pada medium SKM suhu 28°C, berwarna putih *opag* seperti susu dan umumnya sensitif terhadap streptomisin, penisilin G, tetrasiklin, viomisin, vancomisin (Jordan, 1984; Somasegaran & Hoben, 1994).

Jika pada *Bradyrhizobium* gen-gen utamanya untuk fungsi simbiotik, nodulasi dan penambatan nitrogen terdapat pada kromosom, maka pada *Sinorhizobium* gen-gen tersebut terdapat pada plasmid. Gen-gen penyandi nitrogenase (gen *nif*) biasanya terkait dengan gen-gen lain untuk fungsi simbiotik. Pada *Sinorhizobium* juga didapatkan replikon ekstrakromosomal berukuran besar (*megaplasmid*) (Burkhardt *et al.*, 1987).

Dalam subbab ini diuraikan teknik koleksi, isolasi, dan karakterisasi kekerabatannya dengan analisis genom DNA.

2.4.1 Koleksi dan Isolasi *Bradyrhizobium*

Alat

- Cawan Petri
- Oven
- Tabung reaksi
- Neraca analitik ketelitian tiga desimal
- Beker gelas
- Labu Erlenmeyer
- Penangas air
- Pengocok magnet
- Pipet mikro
- Tip 1 ml dan 200 µl.

Bahan

- Media seleksi *Bradyrhizobium* sari khamir manitol (SKM) agar
 - Larutkan 0,5 g K₂HPO₄; 0,2 g MgSO₄.7H₂O; 0,1 g NaCl; 10 g Manitol; 0,5 g sari khamir; 15 g agar bakto; dan 10 ml merah kongo atau bromtimol biru (0,25%) dalam akuades 1.000 ml.

Prosedur

Koleksi bintil akar dilakukan dengan cara mencabut akar tanaman secara hati-hati. Buat lingkaran pada tanaman dengan radius 15 cm dengan menggunakan sendok tanah. Lalu cabut tanaman dengan memasukkan sendok tanah dengan kedalaman 20 cm. Perlahan-lahan angkat akar tanaman, bersihkan tanah dari akar dengan tangan. Lalu pindahkan bintil akar ke dalam plastik, dan simpan dalam kotak es sebelum diisolasi.

Di laboratorium, bintil akar ditaruh di atas saringan lalu dicuci dengan cara mengalirinya dengan air. Bintil akar segar dapat disimpan dalam lemari es semalam. Untuk penyimpanan yang lama, disarankan disimpan dalam tabung gelas kering. Bintil akar yang aktif menambat N_2 mengandung protein yang disebut leghaemoglobin, berwarna merah muda-merah, atau kecoklatan. Bintil akar yang tidak efektif kurang leghaemoglobin, berwarna putih.

6) Isolasi *Bradyrhizobium*.

- Untuk isolasi dari bintil akar, ambil 10 bintil akar, taruh dalam Erlenmeyer 125 ml, cuci permukaan bintil akar dengan 95% etanol selama 1 menit, lalu pindahkan ke dalam cawan Petri steril dan sterilisasi dengan kalsium hipoklorit atau hidrogen peroksida (H_2O_2) 3% dan kocok selama 4-6 menit. Kemudian bilas lima kali dengan air steril. Tetesi bintil akar yang telah dikeringkan dengan air steril, lalu hancurkan dengan menggunakan batang gelas dalam tabung reaksi. Ambil dengan ose suspensi bintil lalu goreskan ke medium seleksi sari khamir manitol (SKM) agar yang mengandung merah kongo atau bromtimol biru.
- Untuk isolasi dari tanah, suspensikan 10 g contoh dalam 90 ml larutan garam fisiologis steril. Lakukan pengenceran seri dengan menggunakan 9 ml garam fisiologis steril hingga 10^5 . Inokulasikan suspensi tanah ke dalam medium seleksi SKM agar yang dibubuhi merah kongo atau bromtimol biru.
- Isolat tersebut diinkubasi hingga 10 hari. Amati pertumbuhannya, lalu hitung populasinya berdasarkan metode MPN. Koloni *Bradyrhizobium* biasanya disertai pembentukan lendir polisakarida ekstraseluler dalam jumlah yang cukup banyak.

7) Penentuan populasi *Bradyrhizobium* tanah dengan metode MPN.

- Siapkan tanaman siratro.
- Toreh benih siratro dengan dengan pisau silet, lalu sterilisasi permukaan dengan alkohol 95% selama 1 menit dan H_2O_2 3% selama 5 menit, cuci dengan akuades steril enam kali.
- Kecambahkan benih siratro pada kertas saring lembap steril dalam cawan Petri pada kondisi gelap selama 2 hari.
- Tanam kecambah siratro pada media agar setengah padat yang ditambah larutan hara Ahmad & Evans tanpa N (Somasegaran & Hoben, 1994).

8) Pengenceran contoh tanah

- Suspensikan 10 g contoh dalam 90 ml larutan garam fisiologis steril, lakukan seri pengenceran dengan menggunakan 9 ml garam fisiologis steril hingga 10^{-9} .

9) Inokulasi suspensi tanah ke kecambah siratro

- Inokulasi sekitar perakaran kecambah siratro dengan 1 ml suspensi tanah dari setiap pengenceran. Setiap pengenceran diinokulasikan pada tiga atau lima tabung kecambah siratro.
- Inkubasi tabung-tabung kecambah siratro yang telah diinokulasi dalam *growth chamber* sampai perakaran siratro membentuk bintil akar (kira-kira dua minggu).
- Catat tabung-tabung yang menunjukkan pembentukan bintil akar pada perakaran siratro (tabung positif).

Perhitungan

$$\text{Populasi } Rhizobium \text{ (g bk)} = \frac{m \times d}{V}$$

bk = berat kering tanah

m = massa sel (jumlah sel)

d = pengenceran

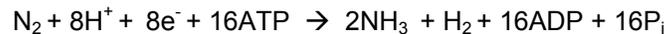
V = volume suspensi yang diinokulasi

2.4.2 Aktivitas Nitrogenase dengan Asai Reduksi Asetilen (ARA)

Prinsip

Konversi N_2 dari udara menjadi amonia dimediasi (dibantu) oleh enzim nitrogenase. Banyaknya N_2 yang dikonversi menjadi amonia sangat tergantung pada kondisi fisik, kimia, dan biologi tanah. Ketersediaan sumber energi (C-organik) di lingkungan rizosfir merupakan faktor utama yang menentukan banyaknya nitrogen yang dihasilkan (Zuberer, 1998). Penambahan sisa-sisa tanaman (biomassa) sebagai sumber C ke dalam tanah memacu perkembangan populasi bakteri penambat N. Ini menjelaskan mengapa jumlah nitrogen yang ditambat oleh bakteri bervariasi di tiap tempat tergantung pada ketersediaan energi dan kemampuan bakteri penambat N bersaing dengan mikroba lain yang hidup dan berkembang-biakannya juga bergantung kepada sumber energi yang sama.

Mekanisme penambatan nitrogen secara biologis dapat digambarkan melalui persamaan di bawah ini. Dua molekul amonia dihasilkan dari satu molekul gas nitrogen dengan menggunakan 16 molekul ATP dan pasokan elektron dan proton (ion hidrogen).



Reaksi ini hanya dilakukan oleh bakteri prokariot, menggunakan suatu kompleks enzim nitrogenase. Enzim ini mengandung dua molekul

protein yaitu satu molekul protein besi (Fe) dan satu molekul protein molibden-besi (Mo-Fe). Reaksi ini berlangsung ketika molekul N_2 terikat pada kompleks enzim nitrogenase. Protein Fe mula-mula direduksi oleh elektron yang diberikan oleh ferredoksin. Kemudian protein Fe reduksi mengikat ATP dan mereduksi protein molibden-besi, yang memberikan elektron kepada N_2 , sehingga menghasilkan $NH=NH$. Pada dua daur berikutnya proses ini (masing-masing membutuhkan elektron yang disumbangkan oleh ferredoksin) $NH=NH$ direduksi menjadi H_2N-NH_2 , dan selanjutnya direduksi menjadi NH_3 . Tergantung pada jenis mikroba, ferredoksin reduksi yang memasok elektron untuk proses ini diperoleh melalui fotosintesis, respirasi atau fermentasi. Hambatan terhadap penambatan N_2 lebih disebabkan oleh NH_4^+ daripada NO_3^- atau NO_2^- bagi *Azotobacter* dan *Cyanobacteria*, karena NH_4^+ menghambat sintesis nitrogenase.

Alat

- Autoklaf
- Cawan Petri
- Oven
- Tabung reaksi
- Neraca analitik ketelitian 3 desimal
- Beker gelas
- Penangas air
- Pengaduk magnetik
- Ose
- Pipet mikro
- Tip mikro 1 ml dan 200 μ l.
- Gas kromatografi
- Alat suntik 1 ml, 10 ml

Prosedur

Tanaman dicabut secara hati-hati jangan sampai merusak akar dan bintil akar, kemudian tanaman dipotong pada batas antara akar dan batang. Akar termasuk bintil akar dibersihkan dari tanah, kemudian dimasukkan ke dalam botol inkubasi dan segera ditutup rapat dengan penutup yang terbuat dari karet. Setelah itu udara di dalam botol inkubasi dikeluarkan sebanyak 10% dari volume botol inkubasi dengan alat suntik dan kemudian disuntikkan lagi gas asetilen sebanyak 10% untuk menggantikan udara yang telah dikeluarkan tersebut. Kemudian, bintil akar diinkubasikan selama 15, 30, dan 45 menit untuk memberi kesempatan pada bakteri bintil akar mereduksi asetilen menjadi etilen. Setelah selesai masa inkubasi, campuran gas tersebut diambil dengan dengan alat suntik sebanyak 1 mm

untuk kemudian disuntikkan ke alat gas kromatografi untuk dipisahkan dengan detektor semi-konduktor. Gas etilen yang terbentuk kemudian dihitung berdasarkan grafik yang terlihat pada kertas kromatogram.

2.4.3 Karakterisasi Kekerbatan dengan Analisis Genom DNA

Alat

- Pipet mikro
- Tip mikro 1 ml dan 200 μ l.
- *Pulsed field gel electrophoresis* (PFGE)

Bahan

- Larutan PIV (10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 M NaCl)
- 1,5%LMA
- Larutan penyangga Tris EDTA (TE) (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA, pH 8,0).
- Larutan EC-lysis (6 mM Tris-HCl, pH 7,5; 100 mM EDTA, pH 7,5; 1 M NaCl; 0,5% polioksietilen-2-cetil-eter; 0,2% natrium deoksikolat; 0,5% natrium lauril sarkosin; 1 mg ml⁻¹ lisozim)
- Larutan EC-lysis dengan larutan EDTA natrium lauril sarkosin proteinase-K (ESP) (0,5 M EDTA, pH 9,0 - 9,5; 1% natrium lauril sarkosin; 200 μ g ml⁻¹ proteinase-K),
- Larutan penyangga TE
- Larutan perendaman (1,5 μ l *bovine serum albumin* 100x; 15 μ l larutan penyangga enzim restriksi 10x; 133,5 μ l ddH₂O)
- Agarosa (HMA 1%)
- Larutan penyangga 0,5 x tris borat EDTA (TBE) (45 mM trisma basa; 45 mM
- H₃BO₃; 1,25 mM EDTA (pH 8,0)

Prosedur

- 1) Preparasi DNA genom *in situ*
 - Tumbuhkan isolat uji pada medium dan suhu pertumbuhan optimumnya hingga populasi selnya mencapai 10⁹ sel/ml.
 - Sentrifus 1 ml suspensi bakteri dengan kecepatan 11.000 rpm selama 1 menit. Cuci pelet sel dengan 0,5 ml larutan PIV (10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 M NaCl) lalu sentrifus. Larutkan kembali pelet dengan 0,45 ml larutan PIV lalu tambah 0,9 ml LMA 1,5 % di dalam larutan penyangga Tris EDTA (TE) (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA, pH 8,0).
 - Cetak campuran ini segera pada cetakan *plug* dan biarkan memadat. Rendam sisipan gel berisi sel (gel *insert* atau gel *plug*) yang diperoleh dalam larutan EC-lysis (6 mM Tris-HCl, pH 7,5; 100

mM EDTA, pH 7,5; 1 M NaCl; 0,5% polioxietilen-2-cetil-eter; 0,2% natrium deoksikolat; 0,5% natrium lauril sarkosin; 1 mg ml⁻¹ lisozim) sambil digoyang dengan kecepatan 50 - 60 rpm di dalam *shaking water bath* 37°C selama 6 jam.

- Ganti larutan EC-lysis dengan larutan EDTA natrium lauril sarkosin proteinase-K (ESP) (0,5 M EDTA, pH 9,0 - 9,5; 1% natrium lauril sarkosin; 200 µg ml⁻¹ proteinase-K), lalu digoyang dengan kecepatan 50 - 60 rpm pada suhu 55°C selama 48 jam.
- Setelah itu lakukan pencucian sisipan gel dengan larutan penyangga TE pada suhu 37°C selama 30 menit dan diulangi lima kali masing-masing selama 2 jam. Sisipan gel tersebut dapat disimpan pada suhu 4°C di dalam larutan penyangga TE sampai digunakan.

2) Pemotongan DNA genom

- Apabila strain mikroba uji memiliki persentase mol Guanin dan Sitosin (G+C) di atas 50%, misalnya 59-64% untuk genus *Rhizobium* dan 61-65% untuk genus *Bradyrhizobium*, maka pilih enzim restriksi yang memiliki titik potong pada pasangan basa yang kaya Adenin atau Timin. Penggunaan enzim restriksi yang memotong jarang akan menghasilkan sejumlah kecil fragmen besar yang dapat dipisahkan dengan PFGE. Menurut McClelland *et al.* (1987), *SpeI* yang memiliki situs pengenalan 5'-A/CTAGT-3' mengandung tetranukleotida CTAG yang akan memotong jarang DNA genom bakteri dengan persentase mol Guanin dan Sitosin tinggi.
- Potong DNA genom dengan mengiris sisipan gel selebar 2 mm lalu rendam potongan sisipan gel dalam 150 µl larutan perendaman (1,5 µl *bovine serum albumin* 100x; 15 µl larutan penyangga enzim restriksi 10x; 133,5 µl akuabides).
- Inkubasi campuran selama 15 menit di dalam es. Selanjutnya, ganti larutan perendam sisipan gel dengan 150 µl larutan perendaman yang baru dan tambah 1 µl enzim restriksi sambil diresuspensikan.
- Inkubasi campuran selama 15 menit di dalam es, dilanjutkan dengan inkubasi pada suhu 37°C selama 4 jam di dalam *shaking water bath* (Suwanto & Kaplan, 1989).
- Lakukan dialisis selama 10 – 15 menit dalam larutan penyangga satu kali TE. Sisipan gel tersebut dapat disimpan pada suhu 4°C hingga siap dilarikan pada elektroforesis dengan cara direndam di dalam larutan penyangga satu kali TE.

3) Pemisahan fragmen-fragmen DNA dengan PFGE (elektroforesis)

- Masukkan potongan sisipan gel ke dalam sumur pada matriks agarosa (HMA 1%). Pada permukaan sumur yang telah diisi sisipan gel ditutup dengan 1,5% LMA dan dibiarkan selama 10 menit di dalam lemari pendingin. Setelah memadat, matriks agarosa

diletakkan pada permukaan bak PFGE. Elektroforesis dengan larutan penyangga 0,5 x tris borat EDTA (TBE) (45 mM trisma base; 45 mM H₃BO₃; 1,25 mM EDTA pH 8,0) dilakukan dengan kondisi waktu pulsa *ramping* 5 - 60 detik, 20 jam, 5,4 Volt, 14°C.

- 4) Visualisasi DNA
 - Rendam matriks agarosa yang telah diangkat dari alat PFGE dalam larutan etidium bromida (1 µg ml⁻¹) selama 10 menit lalu bilas dengan akuades selama 20-30 menit.
 - Amati pola pita DNA di atas *UV-transilluminator* pada λ: 280 nm dan dokumentasi dengan kamera polaroid berfilter jingga.

2.4.4 Analisis Kemampuan Pembentukan Bintil Akar *Rhizobium* dengan Penanda GUS

Alat dan bahan

- Pipet mikro
- Strain bakteri, plasmid, dan media.
 - Strain *Bradyrhizobium* dan *Escherichia coli* S17-1 yang mengandung mTn5SSgusA20
 - Media untuk donor *E. coli* adalah medium LB yang disuplementasi dengan spektinomisin (100 µg ml⁻¹). Untuk resipien adalah medium YM (Vincent, 1970) dan medium minimal umum yang mengandung spektinomisin (100 µg ml⁻¹) untuk menumbuhkan transkonjugan.

Prosedur

- 1) Introduksi transposon ke dalam resipien rhizobia
 - Kulturkan resipien strain *Bradyrhizobium* ke dalam media cair YM pada suhu 30°C selama 3 hari dan kulturkan bakteri donor *E. coli* S17-1 yang mengandung mTn5SSgusA20 ke dalam media cair LB pada suhu 30°C selama semalam.
 - Lakukan *plate mating* sesuai Wilson *et al.* (1994) pada media agar cawan YM pada suhu 30°C.
 - Seleksi transkonjugan pada medium GM yang disuplementasi dengan spektinomisin (100 µg ml⁻¹) untuk menyeleksi insersi transposon.

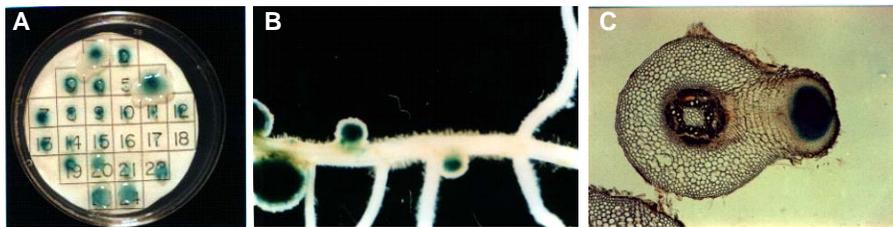
- 2) Kemampuan membentuk bintil akar.
 - Sterilisasi permukaan benih siratro (*Macroptilium atropurpureum*) dan kedelai (*Glycine max*) cv. Enrei dengan etanol 70% selama 5 menit, lalu 3% H₂O₂ selama 1 menit, kemudian cuci dengan akuades steril dan biarkan berkecambah pada agar cawan 2%.

- Tanam kecambah dalam pot -pot tumbuh steril larutan hara bebas N (Akao & Kouchi, 1989), 1 tanaman per pot dan tiga ulangan.
- Tumbuhkan inokulan strain *Bradyrhizobium* tetua dan mutan sampai fase pertengahan eksponensial dalam media cair YM secara terpisah.
- Setelah tanam 1 hari, inokulasi tanaman dengan masing-masing strain sebanyak 1 ml. Pada siratro, strain tetua dan mutan dikombinasikan dengan perbandingan 1 : 1 dengan konsentrasi $2,1 \times 10^8 \text{ ml}^{-1}$.
- Tumbuhkan tanaman di rumah kaca dengan suhu dan periode cahaya 14/10 jam masing-masing pada siang/malam. Untuk tanaman kedelai liar, strain tipe liar dan mutan dikombinasikan seperti di atas.

3) Asai GUS

- Panen tanaman 3 minggu setelah inokulasi untuk menentukan okupansi strain tetua dan liar yang mempunyai penanda *gusA*.
- Celupkan akar dalam tabung reaksi yang mengandung larutan asai GUS (5 ml of 0,1 M bufer natrium fosfat pada pH 7,0; 50 μl X-gluc; and 20 μl 10% SDS), vakumkan selama semalam, lalu inkubasi pada suhu 30°C selama 1 jam.
- Catat area yang ditempati warna biru (strain yang ditandai *gusA*) terhadap total area yang ditempati bakteroid sebagai okupansi bintil akar. Diameter 1 mm bintil akar dihitung sebagai bintil-bintil akar.

Gambar 1 berikut adalah contoh dari ekspresi gen GUS



Gambar 1. (A) mutan *Bradyrhizobium japonicum* RIFCB-2 yang memiliki aktivitas GUS (berwarna biru) dan tanpa aktivitas GUS (tidak berwarna); (B) akar Siratro dengan bintil akar yang dikolonisasi oleh strain inokulum yang dimarka dengan GUS; (C) lokasi histokimia GUS dalam jaringan bintil akar

DAFTAR PUSTAKA

- Akao, S. & H. Kouchi. 1984. Light microscopic observation of root hair curling of soybean induced by Rhizobium infection. Jpn.J. Soil Sci. Plant Nutr 60: 53-55

- Allen, O.N. & E.A. Allen. 1981. *The Leguminosae*. A source book of characteristic, uses and nodulation. The University of Wisconsin Press, Wisconsin.
- Barbour, W.M., S.H. Wang, & G. Stacey. 1992. Molecular Genetics of *Bradyrhizobium* Symbiosis. In Biological Nitrogen Fixation. G. Stacey, R.H. Borris, and H.J. Evans (Eds.). Chapman & Hall Inc., USA.
- Burkhard, B., D. Schillik, and A. Puhler. 1987. Physical characterization of *Rhizobium meliloti* megaplasmids. Plasmid 17:13-25.
- Chen, W.X., G.H. Yan, & J.L. Li. 1988. Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. Int. J. Sys. Bacteriol. 38:392-397.
- De Lajudie, P., E. Laurent-Fulele, A. Willems, U. Torck R. Coopman, M.D. Collins, K. Kersters, B. Dreyfus, & M. Gilles. 1998. *Allorhizobium undicola* sp.nov, sp.nov. nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal. Int. J. Sys. Bacteriol. 48: 1277-1290.
- Fuhrmann, J. 1990. Symbiotic effectiveness of indigenous soybean bradyrhizobia as related to serological, morphological, rhizobitoxine, and hydrogenase phenotypes. Appl. Environ. Microbiol. 56: 224-229.
- Jordan, D.C. 1982. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. Int. J. Sys. Bacteriol. 32:136-139.
- Jordan, D.C. 1984. Famili III. Rhizobiaceae Conn 1938, 321AL, p. 234-256. In N.R. Krieg & J.E. Holt (Eds.) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 1. The William and Wilkins Co., Baltimore.
- Keyser, H.H., B.B. Bohlool, T.S. Hu, & D.F. Weber. 1982. Fast-growing rhizobia isolated from root nodules of soybeans. Science 215: 1631-1632.
- Kundig, C., H. Hennecke, & M. Gottfert. 1993. Correlated physical and genetic map of *Bradyrhizobium japonicum* 110 genome. J. bacteriol. 175: 613-622.
- Kuykendall, L.D., B. Saxena, T.E. Devine, & S.E. Udell. 1992. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. Canadian J. Microbiol. 38: 501-505.
- Masterson, R.V., P.R. Russel, & A.G. Atherly. 1982. Nitrogen fixation (*nif*) genes and large plasmid of *Rhizobium japonicum*. J. Bacteriol. 152: 928-931.
- McClelland, M., R. Jones, Y. Patel, & M. Nelson. 1987. Restriction nuclases for pulse-filed mapping of bacterial genomes. Nucleic Acids Res. 15: 5985-6005.
- Scholla, M.H. & G. H. Elkan. 1984. *Rhizobium fredii* sp nov. a fast-growing spesies that effectively nodulates soybeans. Int. J. Sys. bacteriol. 34: 484-486.

- Somasegaran, P. & H.J. Hoben. 1994. Handbook for Rhizobia. Springer-Verlag, New York.
- Suwanto, A. & S. Kaplan. 1989. Physical and genetic mapping of *Rhodobacter spaeroides* 2.4.2. genome: present of two unique circular chromosomes. J. Bacteriol. 17: 5850-5859.
- Vincent, J.M. 1970. A Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria. IBP Handbook 15. Blackwell Scientific Publication. Oxford.
- Willems, A. & M.D. Collins. 1993. Phylogenetic analysis of rhizobia and agrobacteria based on 16S ribosomal RNA gene sequences. Int. J. Sys. Bacteriol. 43: 305-313.
- Wilson, K.J., A. Sessitsch, & A.D.L. Akkermans. 1994. Molecular marker as tools to study the ecology of microorganisms. p. 149-156. In K. Ritz, J. Dighton, & K.E. Giller (Eds.) Beyond the Biomass: Compositioned and Functional Analysis of Microbial Communities. Chickchester. John Willey. New York.
- Xu, L.M., C. Ge, Z. Cui, J. Li, & H. Fan. 1995. *Bradyrhizobium liaoningensis* sp. nov. isolated from the root nodules of soybean. Int. J. Sys. bacteriol. 45: 706-711.
- Yanagi, M. & K. Yamasato. 1993. Phylogenetic analysis of the family *Rhizobiaceae* and related bacteria by sequencing of 16S rRNA gene using PCR and DNA sequencer. FEMS Microbiology Lett. 107: 115-120.
- Young, J.P.W., H.L. Downer, & B.D. Eardly. 1991. Phylogeny of the phototrophic rhizobium strain BTail by polymerase chain reaction-based sequencing of a 16S rRNA gene segment. J. Bacteriol. 173: 2271-2277.
- Young, J.P.W. & K.E. Haukka. 1996. Diversity and phylogeny of rhizobia. New Phytol. 133: 87-94.
- Zuberer, D.A. & W.S. Silver. 1998. Biological dinitrogen fixation (Acetylene reduction) associated with Florida mangrove. Appl. Environ. Microbiol. 35: 567-575.

MIKROBA PELARUT FOSFAT

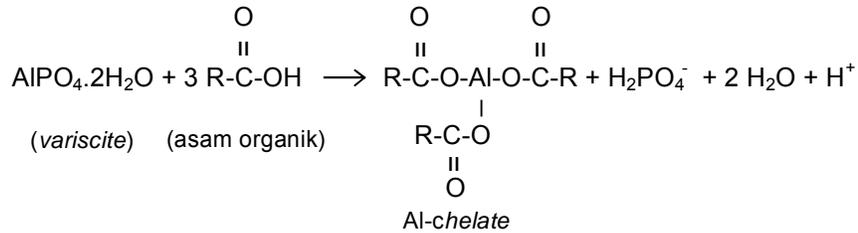
Edi Santosa

Fosfat merupakan salah satu unsur makro esensial, tidak hanya bagi kehidupan tumbuhan tetapi juga bagi biota tanah. Aktivitas mikroba tanah berpengaruh langsung terhadap ketersediaan fosfat di dalam larutan tanah. Sebagian aktivitas mikroba tanah dapat melarutkan fosfat dari ikatan fosfat-tak larut (melalui sekresi asam-asam organik) atau mineralisasi fosfat dari bentuk ikatan fosfat-organik menjadi fosfat-anorganik. Selain tanaman, fosfat anorganik terlarut juga digunakan oleh mikroba untuk aktivitas dan pembentukan sel-sel baru, sehingga terjadi pengikatan (*immobilisasi*) fosfat.

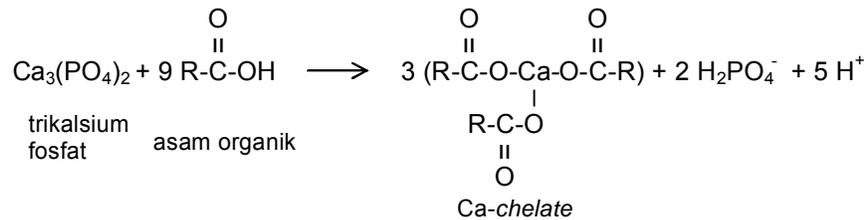
Mikroba tanah seperti bakteri *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Escherichia*, dan *Xanthomonas*, serta fungi *Aspergillus*, *Penicillium*, dan *Culfularia* dan golongan Aktinomesetes seperti *Streptomyces* mempunyai kemampuan melarutkan fosfat-anorganik tak larut dengan mensekresikan asam-asam organik (Subba-Rao, 1982). Setiap mikroba pelarut fosfat (MPF) menghasilkan jenis dan jumlah asam organik yang berbeda dan ada kemungkinan satu jenis MPF menghasilkan lebih dari satu jenis asam organik (Adu-Tae, 2004). Kemampuan asam organik melarutkan fosfat menurun dengan menurunnya konstanta stabilitas ($\log K$) menurut urutan sebagai berikut: asam sitrat > oksalat > tartat > malat > laktat > glukonat > asetat > format.

Fosfat di dalam tanah secara alami terdapat dalam bentuk organik dan anorganik. Kedua macam bentuk tersebut merupakan bentuk fosfat yang tidak larut atau sedikit larut, sehingga ketersediaannya bagi biota tanah sangat terbatas. Mineral fosfat anorganik pada umumnya terikat sebagai $\text{AlPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (*variscite*) dan $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (*strengite*) pada tanah masam dan sebagai $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (trikalsium fosfat) pada tanah basa. Asam-asam organik sangat berperan dalam pelarutan fosfat karena asam organik tersebut relatif kaya akan gugus-gugus fungsional karboksil ($-\text{COO}^-$) dan hidroksil ($-\text{O}^-$) yang bermuatan negatif sehingga memungkinkan untuk membentuk senyawa kompleks dengan ion (kation) logam yang biasa disebut *chelate* (Wagner & Wolf, 1998). Asam-asam organik meng-*chelate* Al, Fe atau Ca, mengakibatkan fosfat terlepas dari ikatan $\text{AlPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, atau $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ sehingga meningkatkan kadar fosfat-terlarut dalam tanah. Keadaan ini akan meningkatkan ketersediaan fosfat dalam larutan tanah.

Pelarutan fosfat dari Al-P atau Fe-P pada tanah masam oleh asam organik yang dihasilkan MPF sebagai berikut:



Sedangkan reaksi pelarutan fosfat dari Ca-P pada tanah basa oleh asam organik sebagai berikut:



Beberapa jenis bakteri sangat efektif melarutkan fosfat dari batuan fosfat maupun residu fosfat dalam tanah. Sebagai contoh, *Bacillus megaterium* var. *phosphaticum* telah dibuat formulanya dalam bentuk inokulan *phosphobacterin*. Inokulan ini berhasil digunakan untuk peningkatan P-tersedia pada tanah-tanah di Uni Soviet tetapi gagal digunakan di Amerika Serikat (Mullen, 1998). Hal ini menunjukkan bahwa kemampuan MPF sangat beragam tergantung dari jenis, daya adaptasi, dan kemampuan hidup pada lingkungan yang berbeda. Kimura *et al.* (1990) juga mengemukakan bahwa MPF dari tanah tertentu jika diinokulasikan pada tanah lainnya belum tentu dapat mempertahankan kemampuan melarutkan fosfat. Oleh karena itu penelitian dan pemanfaatan MPF unggul yang sesuai dengan berbagai agroekosistem lahan pertanian yang lebih spesifik masih sangat diperlukan.

Dalam bab ini diuraikan metode isolasi, karakterisasi, dan enumerasi mikroba pelarut fosfat anorganik tanah.

2.6.1 Isolasi

Prinsip

Kemampuan MPF dalam melarutkan fosfat berbeda-beda, antara lain tergantung dari macam dan jumlah asam organik yang dihasilkan serta sumber fosfat yang digunakan. Semua biota tanah memerlukan fosfat

sehingga pemberian fosfat dari sumber fosfat yang sukar larut pada suatu media akan menyebabkan tidak semua jenis mikroba dapat tumbuh/membentuk koloni pada media tersebut. Koloni yang tumbuh hanya berasal dari pertumbuhan/perbanyakan mikroba yang dapat melarutkan fosfat dari sumber fosfat yang terkandung dalam media. Hal ini menyebabkan terjadinya penyeleksian bagi pertumbuhan mikroba, sehingga sering disebut sebagai media selektif MPF.

Media selektif MPF yang biasa digunakan untuk isolasi adalah media agar Pikovskaya. MPF yang tumbuh pada media ini akan membentuk koloni yang di sekelilingnya terdapat daerah bening (*zona bening*). Daerah bening ini terbentuk karena adanya pelarutan fosfat dari sumber fosfat sukar larut yang ada dalam media oleh asam-asam organik yang dihasilkan koloni mikroba. Waktu yang diperlukan untuk pertumbuhan, warna, dan besar koloni serta luas daerah bening berbeda-beda tergantung dari jenis MPF. Akan tetapi pada dasarnya semakin luas dan semakin jernih pembentukan daerah bening, secara kualitatif menunjukkan semakin tinggi kelarutan fosfat dalam media, sehingga koloni tersebut dapat dipilih/diisolasi sebagai isolat/strain MPF yang mempunyai potensi untuk dapat dikembangkan lebih lanjut.

Media Pikovskaya bisa dimodifikasi sesuai dengan tujuan isolasi. Sebagai contoh, untuk memperoleh strain MPF yang mampu melarutkan fosfat dari Al-P maka pada media digunakan AlPO_4 sebagai sumber fosfat. Dengan cara tersebut akan diperoleh isolat-isolat MPF yang mempunyai potensi untuk dapat dikembangkan pada tanah masam dengan kadar Al relatif tinggi. Demikian pula jika yang dipakai sebagai sumber fosfat adalah FePO_4 , $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ atau batuan fosfat lainnya (terdapat berbagai macam batuan fosfat: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{Cl}_2$, dan lainnya), maka koloni yang tumbuh merupakan koloni MPF yang mampu memanfaatkan fosfat dari senyawa sumber fosfat tersebut.

Hal yang perlu diperhatikan di dalam memodifikasi sumber fosfat pada media Pikovskaya adalah kadar fosfat pengganti sebaiknya dibuat setara dengan kadar fosfat pada pemakaian 5 g $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ dalam 1 L media.

Alat

- Neraca analitik ketelitian dua desimal
- Labu Erlenmeyer 1 L
- Cawan Petri steril
- Tabung reaksi steril
- Pipet mikro 1 ml

Bahan

- Media agar Pikovskaya (Subba-Rao, 1981)
 - Timbang bahan kimia berikut ini masing-masing seberat: 10 g glukosa; 5 g $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ bisa diganti dengan AlPO_4 , Fe PO_4 , atau sumber P lainnya); 0,5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; sedikit MnSO_4 ; sedikit FeSO_4 ; 0,5 g ekstrak ragi; dan 15 g agar. Larutkan dalam akuades sampai volume 1 L.
- Sterilisasi bahan media tersebut dengan autoklaf pada tekanan 0,1 MPa dan suhu 121°C selama 20 menit.
- Keluarkan media yang telah disterilkan dan dinginkan (didiamkan) sampai suhu mencapai $\pm 45-50^\circ\text{C}$ (hangat-hangat kuku).
- Tuang secara aseptik sebagian media (± 600 ml) ke dalam cawan-Petri steril (± 15 ml media pada setiap cawan Petri), goyang/geser supaya permukaan media merata, dan diamkan sampai beku. Media ini merupakan media agar Pikovskaya untuk penanaman/isolasi MPF.
- Tuang secara aseptik sebagian media (± 400 ml) ke dalam tabung reaksi steril (± 15 ml media setiap tabung), letakkan pada posisi miring dengan sudut 30° dan diamkan sampai dingin. Media ini merupakan media agar Pikovskaya miring untuk menyimpan biakan murni MPF.
- Biosida (pilih salah satu):
 - Fungisida:
 - *Brilliant green* (1,25 ppm)
 - *Pentachloronetrobenzene*:
Larutkan 0,5 g *pentachloronetrobenzene* ke dalam 100 ml aseton, untuk 40 ml media.
 - Bakterisida
 - Karbenisilin (50 ppm)
 - Tetrasiklin (50 ppm)

Prosedur

- Larutkan 1 g contoh tanah ke dalam 9 ml akuades steril.
- Buat deret pengenceran 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , dan 10^{-4} .
- Tambahkan biosida (fungisida untuk isolasi bakteri atau bakterisida untuk isolasi fungi) pada setiap deret pengenceran larutan tersebut.
- Pipet masing-masing 1 ml larutan dari pengenceran 10^{-2} , 10^{-3} , dan 10^{-4} dan secara aseptik tuang ke dalam cawan Petri yang berisi media agar Pikovskaya, goyang (cawan Petri diletakkan di atas permukaan meja kemudian digeser ke kanan dan ke kiri atau digeser memutar) sampai larutan merata di seluruh permukaan media.
- Beri label pada setiap cawan Petri sesuai dengan besar pengenceran, selanjutnya inkubasi pada suhu kamar selama 3-6 hari.

- Amati pertumbuhan koloni MPF setelah 3-6 hari inkubasi, pilih koloni yang mempunyai zona bening (*halozone*) paling lebar dan paling jernih untuk diisolasi.
- Secara aseptik ambil koloni yang telah dipilih dengan ose steril, goreskan pada media agar, dan inkubasi pada suhu kamar selama 3-6 hari.
- Koloni yang tumbuh terpisah, ambil secara aseptik dengan ose dan goreskan ke permukaan media agar miring Pikovskaya.
- Beri kode/nomor isolat pada setiap isolat MPF dan simpan di dalam alat pendingin (refrigerator) pada suhu 5°C. Tabung ini berisi biakan murni isolat MPF yang digunakan sebagai sumber inokulan.

2.6.2 Karakterisasi

Prinsip

Zona bening (*halozone*) merupakan tanda awal untuk mengetahui kemampuan MPF dalam melarutkan fosfat. Semakin lebar zona bening, secara kualitatif dapat dianggap sebagai tanda kemampuan MPF melarutkan fosfat dalam media tumbuh semakin besar. Demikian pula semakin bening/terang zona bening menunjukkan pelarutan fosfat semakin intensif. Lebar/garis tengah koloni dan zona bening bisa diukur, pada umumnya semakin besar nilai perbandingan antara garis tengah zona bening: garis tengah koloni, menunjukkan kemampuan MPF dalam melarutkan fosfat secara kualitatif semakin besar, walaupun hal ini belum cukup untuk menggambarkan kemampuan MPF dalam pelarutan fosfat yang sebenarnya (Nautiyal, 1999).

Pengujian lebih lanjut perlu dilakukan untuk mengetahui kemampuan isolat MPF yang telah diisolasi dalam melarutkan fosfat terutama pada media Pikovskaya cair. Di dalam media Pikovskaya cair, sel-sel MPF memanfaatkan nutrisi yang ada dalam media untuk membelah dan berkembang. Pada waktu pembelahan sel, terjadi pembentukan sel-sel baru sehingga MPF membutuhkan fosfat relatif besar. Oleh karena itu pada waktu yang bersamaan MPF menghasilkan asam-asam organik untuk melarutkan fosfat. Kadar fosfat terlarut yang tidak diimobilisasi kembali oleh MPF bisa langsung diukur secara kolorimetri dengan pewarnaan biru molibden.

Untuk memastikan MPF yang diperoleh tidak bersifat patogen perlu dilakukan uji patogenisitas secara kualitatif. Uji patogenisitas dilakukan dengan mengamati (membandingkan) secara visual pertumbuhan tanaman pada media tertentu yang diberi perlakuan inokulasi MPF *nonpatogen*, patogen, dan kontrol (tanpa inokulasi). Pada tanaman yang diinokulasi MPF patogen akan memperlihatkan pertumbuhan yang tidak normal (sakit). Peneliti lain menggunakan tanaman tembakau yang merupakan tanaman

hipersensitif terhadap pengaruh patogen untuk pengujian patogenisitas mikroba.

2.6.2.1 Pengukuran zona bening

Bahan dan alat

- Kaca pembesar
- Penggaris
- Hasil penanaman (koloni) MPF dalam cawan Petri

Posedur

- Amati pertumbuhan koloni MPF dalam cawan Petri dari hasil penanaman pada 2.6.1 (lihat Gambar 1).
- Ukur garis tengah koloni dan garis tengah zona beningnya dengan penggaris dan dengan bantuan kaca pembesar pada koloni yang disertai zona bening. Lakukan pengukuran garis tengah koloni dan zona bening sebanyak 2-3 kali pada posisi yang berbeda, hasil pengukuran dirata-rata.
- Hitung:
 - Lebar zona bening = garis tengah zona bening – garis tengah koloni.
 - Rasio zona bening/koloni = garis tengah zona bening: garis tengah koloni.
- Koloni yang mempunyai nilai rasio tinggi merupakan isolat MPF yang mempunyai peluang untuk dapat dikembangkan/dimanfaatkan lebih lanjut.



Gambar 1. Beberapa koloni bakteri pelarut fosfat (BPF) tumbuh pada media selektif agar Pikovskaya yang membentuk zona bening dengan kejernihan dan diameter yang berbeda-beda

2.6.2.2 Uji pelarutan P pada media cair

Alat

- Neraca analitik ketelitian tiga desimal
- Labu Erlenmeyer 500 ml dan 250 ml.
- Biakan murni MPF
- Tabung reaksi berisi 10 ml akuades steril
- Mikropipet 1 ml
- Penggoyang (*shaker*)
- Kertas saring Whatman No. 1 atau 42.
- Pipet 5 ml.
- Sentrifus.
- Tabung plastik sentrifugase ukuran 50 ml.
- Spektrofotometer UV-VIS

Bahan kimia

- Media Pikovskaya cair (lihat 2.6.1, tanpa agar).
- Pereaksi P pekat.
 - Larutkan 12 g ammonium molibdat $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ dengan 100 ml akuades dalam labu ukuran 1 L.
 - Tambahkan 0,277g kalium antimonil tartrat $[\text{K}(\text{SbO})\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\cdot 0,5\text{H}_2\text{O}]$, tambah akuades menjadi 1 L, kocok.
- Pereaksi pewarna P pekat
 - Campurkan 0,53 g asam askorbat dengan 50 ml pereaksi P pekat.
 - Pereaksi ini harus selalu baru.
- Standar pokok 1.000 ppm PO_4^{3-} (titrisol).
 - Pindahkan larutan standar induk titrisol secara kuantitatif ke dalam labu ukur 1 L, tambah akuades sampai tepat pada garis batas, dan kocok.
- Standar 50 ppm PO_4^{3-} .
 - Pipet 5 ml standar 1.000 ppm PO_4^{3-} ke dalam labu ukur 100 ml, tambah akuades sampai pada garis batas, dan kocok.
- Standar 2,5 ppm PO_4^{3-} .
 - Pipet 5ml standar 50 ppm PO_4^{3-} ke dalam labu ukur 100 ml, tambah akuades sampai pada garis batas, dan kocok.
- Deret standar PO_4^{3-} (0-2,5 ppm).
 - Pipet berturut-turut 0; 0,5; 1; 2; 3; 4; dan 5 ml standar 2,5 ppm PO_4^{3-} ke dalam tabung reaksi.
 - Tambah akuades sampai masing-masing menjadi 5 ml, kocok.
 - Kepekatan deret standar berturut-turut adalah: 0,0; 0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; dan 2,5 ppm PO_4^{3-} .

Prosedur

- Panaskan 500 ml media Pikovskaya cair sampai semua bahan bercampur, bagi ke dalam lima buah labu Erlenmeyer ukuran 250 ml (tiap labu Erlenmeyer diisi 100 ml media), tutup dengan kapas, dan sterilkan seperti pada 2.6.1.2.
- Secara aseptik tuang 10 ml akuades steril ke dalam tabung biakan murni (dari hasil isolasi pada 2.6.1.2), kocok dengan stirer selama 1 menit.
- Secara aseptik pipet 1 ml suspensi dan masukkan ke dalam labu Erlenmeyer yang telah diisi media Pikovskaya cair, tutup rapat, dan goyang dengan penggoyang pada 100 rpm selama 1-2 minggu. Dengan cara yang sama lakukan pada labu Erlenmeyer berisi Pikovskaya cair yang tidak diinokulasi MPF sebagai perlakuan kontrol.
- Saring 20 ml biakan dengan kertas saring (Whatman No. 1 untuk bakteri atau Whatman No. 42 untuk fungi).
- Masukkan filtrat ke dalam tabung sentrifusi, sentrifus pada 1.000 rpm selama 15 menit.
- Pipet 5,0 ml supernatan, tuang ke dalam tabung reaksi, tambahkan 0,5 ml pereaksi P pekat, kocok beberapa menit, dan diamkan 30 menit.
- Ukur absorbansi larutan dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 693 nm. Dengan cara yang sama lakukan pada labu Erlenmeyer berisi media Pikovskaya cair yang tidak diinokulasi MPF sebagai perlakuan kontrol.
- Buat grafik kalibrasi dari deret larutan standar PO_4 . Tambah 0,5 ml pereaksi P pekat pada masing-masing deret standar, kocok beberapa menit, dan diamkan selama 30 menit. Absorbansi larutan diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 693 nm.
- Jika ternyata intensitas warna dari filtrat biakan murni yang diukur melebihi absorbansi dari larutan standar 2,5 ppm PO_4 , encerkan filtrat dengan menambahkan akuades sampai intensitas warna pada kisaran warna larutan standar.

Perhitungan

Kadar PO_4 (ppm) = ppm kurva x fp

Keterangan:

- ppm kurva = kadar contoh yang diperoleh dari kurva hubungan antara kadar deret standar dengan pembacaannya setelah dikoreksi blanko.
- fp = faktor pengenceran (bila ada)

Kadar PO_4 isolat MPF (ppm) = ppm kurva x fp – kadar PO_4 kontrol

2.6.2.3 Uji patogenisitas

Bahan dan alat

- Bahan kimia untuk media Yosida (NH_4NO_3 , NaH_2PO_4 , K_2SO_4 , CaCl_2 , MgSO_4 , MnCl_2 , $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, H_3BO_3 , ZnSO_4 , CuSO_4 , FeCl_3 , dan akuades).
- Biji padi (30 – 50 biji)
- Neraca analitik ketelitian tiga desimal.
- Labu Erlenmeyer 500 ml.
- Cawan Petri steril.
- Tabung reaksi steril ukuran $\Phi = 3\text{-}4$ cm, tinggi =30 cm.
- Biakan murni MPF
- Pipet mikro 1 ml.
- Alkohol 46%
- HgCl_2 0,2 %

Prosedur

- Buat media Yosida *et al.* (1976), timbang bahan kimia untuk membuat larutan stok, sebagai berikut:

Hara	Bahan kimia	Berat (g L^{-1})
Hara makro (masing-masing bahan dilarutkan secara terpisah)		
▪ N	NH_4NO_3	80,0
▪ P	NaH_2PO_4	40,3
▪ K	K_2SO_4	71,4
▪ Ca	CaCl_2	88,6
▪ Mg	MgSO_4	32,4
Hara mikro (semua bahan dicampur/disatukan)		
▪ Mn	MnCl_2	1,5
▪ Mo	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$	0,074
▪ B	H_3BO_3	0,93
▪ Zn	ZnSO_4	0,035
▪ Cu	CuSO_4	0,031
▪ Fe	FeCl_3	7,7

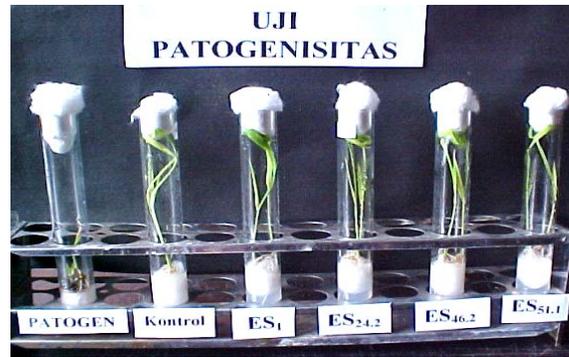
Untuk pembuatan 4 L media, campurkan stok larutan dari masing-masing hara sebagai berikut:

—

Hara	Volume stok larutan (ml)	Kadar hara (ppm)
▪ N	5	40
▪ P	5	10
▪ K	5	40
▪ Ca	5	40
▪ Mg	5	40
▪ Hara mikro	5	

Tambah akuades sampai volume 4 L.

- Panasi larutan bahan tersebut sampai semua bahan bercampur, dibagi ke dalam lima buah tabung reaksi (tiap tabung diisi 100 - 150 ml).
- Masukkan kapas ke dalam tabung sampai tepat di permukaan larutan, tutup tabung dengan kapas, dan sterilkan dengan autoklaf pada tekanan 0,1 Mpa dan suhu 121°C selama 20 menit.
- Keluarkan media dan diamkan sampai dingin.
- Pilih beberapa biji padi yang mempunyai persentase tumbuh $\geq 80\%$.
- Lakukan sterilisasi permukaan kulit pada beberapa biji padi terpilih, yaitu: rendam biji padi tersebut di dalam alkohol 46% selama 1 menit, pindahkan ke dalam akuades steril tiga kali masing-masing 10 menit, pindahkan ke dalam 0,2 % HgCl₂ selama 2 menit, pindahkan/celupkan ke dalam akuades steril enam kali, dan rendam di dalam akuades steril selama 5 jam.
- Secara aseptik sebar/semai biji-biji padi ke dalam cawan Petri yang berisi kapas basah steril dan diamkan selama 2 – 4 hari pada suhu kamar sampai batang dan akar tumbuh sepanjang ± 1 cm.
- Secara aseptik masukkan 1 - 2 kecambah ke dalam tabung yang telah diisi media Yosida steril.
- Secara aseptik masukkan (inokulasikan) 1 ml biakan murni MPF ke dalam tabung (2-3 tabung) dan inkubasi selama 2 - 3 minggu di ruang penumbuh (*growth room*) atau di ruang yang pada saat tertentu tersinari matahari. Dengan cara yang sama inokulasikan mikroba patogen ke dalam tabung lain dan kontrol (tanpa inokulasi) sebagai pembandingan.
- Secara visual amati ada tidaknya pertumbuhan tanaman yang tidak normal. Tanaman yang sehat menandakan bahwa MPF tersebut bukan sebagai mikroba patogen, sedangkan tanaman yang mempunyai tanda-tanda sakit atau pertumbuhan terhambat disebabkan oleh mikroba patogen (Gambar 2).



Gambar 2. Pengujian sifat patogen dari beberapa isolat mikroba pelarut fosfat pada tanaman padi dengan menggunakan media Yosida, paling kiri merupakan isolat fungi patogen

2.6.3 Enumerasi

Prinsip

Kepadatan populasi MPF di dalam tanah dipengaruhi oleh banyak faktor. Penghitungan populasi secara langsung dengan memakai mikroskop (menggunakan hemositometer) hanya dimungkinkan untuk populasi dalam biakan murni, tetapi tidak dimungkinkan bagi populasi MPF di dalam tanah, karena tidak semua sel mikroba dalam tanah mampu melarutkan fosfat. Penghitungan populasi hanya bisa dilaksanakan secara tidak langsung yaitu dengan menghitung koloni dari pertumbuhan setiap sel MPF pada media selektif agar Pikovskaya (*plate count*) atau dengan metode penghitungan jumlah yang paling mungkin (*most probable number* = MPN).

Setiap koloni bakteri pelarut fosfat (BPF) yang tumbuh pada media diasumsikan berasal dari satu sel, sehingga satuan populasi sel g^{-1} atau sel ml^{-1} . Sedangkan bagi koloni fungi pelarut fosfat (FPF) tidak bisa diasumsikan dari pertumbuhan satu sel karena ada beberapa kemungkinan dari setiap pertumbuhan koloni. Satu koloni fungi bisa tumbuh dari setiap bagian fungi misalnya dari potongan hifa, satu spora atau serangkaian spora, dan miselium (kumpulan hifa) sehingga satuan pertumbuhannya merupakan unit/ satuan pembentuk koloni (spk = satuan pembentuk koloni = cfu = *colony forming unit*). Sehingga untuk fungi mempunyai satuan $spk\ g^{-1}$ atau $spk\ ml^{-1}$.

Bahan dan alat

- Media agar Pikovskaya (lihat 2.6.1.2)
- Neraca analitik ketelitian dua desimal
- Labu Erlenmeyer 1 L
- Cawan Petri steril.
- Tabung reaksi steril
- Pipet mikro 1 ml
- Alat penghitung koloni
- Contoh tanah

Prosedur

- Timbang 1 g contoh tanah dalam pinggan aluminium, masukkan ke dalam oven pada suhu 105°C selama 3 jam. Dengan menggunakan penjepit, angkat pinggan aluminium, masukkan ke dalam eksikator, diamkan sampai dingin, dan timbang. Bobotnya merupakan bobot contoh tanah kering (Sulaeman *et al.*, 2005)
- Atur pH media selektif agar Pikovskaya (pada saat pembuatan) menjadi pH 7,0 dengan cara titrasi dengan 0,1 N HCl jika media pH > 7 atau 0,1 N NaOH jika media pH < 7.
- Lakukan penanaman MPF seperti pada 2.6.1 pada pengenceran 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , dan 10^{-6} .
- Inkubasikan pada suhu kamar selama 4-7 hari.
- Hitung koloni yang tumbuh yang disertai dengan zona bening dengan memperhatikan hal-hal sebagai berikut:
 - Jumlah koloni setiap cawan Petri antara 30 – 300, jika tidak ada maka dipilih yang mendekati 300 koloni.
 - Tidak ada satu koloni yang tumbuh melebihi dari setengah cawan Petri.
 - Perbandingan jumlah koloni antara pengenceran yang lebih besar dengan pengenceran sebelumnya (pada pengenceran berturutan), jika sama atau lebih kecil hasilnya dirata-rata, tetapi jika lebih besar data dari pengenceran sebelumnya yang dipakai.
 - Tentukan populasi MPF.

Perhitungan:

$$\text{Populasi MPF (spk g}^{-1}\text{ tanah kering)} = \frac{C \times fp}{bk}$$

Keterangan:

- C = jumlah koloni
- fp = faktor pengenceran
- bk = berat tanah kering.

2.6.4 Ulasan

Penggunaan fungisida ternyata seringkali tidak bisa meniadakan pertumbuhan koloni fungi tetapi hanya bisa menghambat atau mengurangi terbentuknya koloni fungi, demikian pula penggunaan bakterisida. Walaupun begitu penggunaan biosida sangat membantu pekerjaan isolasi MPF terutama isolasi BPF.

Pada pengukuran zona bening, ternyata lebar zona bening juga dipengaruhi oleh ketebalan media agar Pikovskaya dalam cawan Petri. Koloni yang tumbuh pada bagian yang lebih tebal biasanya zona bening akan lebih sempit, sebaliknya pada bagian yang tipis lebar zona bening lebih besar. Untuk menghindari hal tersebut, perlu diperhatikan bahwa pada waktu menuangkan media agar Pikovskaya ke dalam cawan Petri harus diusahakan tebal media di dalam cawan Petri merata. Hal ini dapat dilakukan jika pada waktu menyimpan cawan Petri (sesaat setelah dituangi media agar Pikovskaya), cawan Petri diletakkan pada permukaan tempat yang datar, tidak ada kemiringan sedikitpun. Oleh karena itu luas zona bening hanya bisa dipakai untuk indikasi awal, bahwa koloni merupakan koloni MPF yang mampu melarutkan fosfat dari sumber fosfat penyusun media. Dengan kata lain, lebar diameter zona bening tidak bisa dipakai sebagai pedoman untuk mengukur kemampuan MPF dalam melarutkan fosfat.

Beberapa bakteri dari genus *Pseudomonas* bersifat sebagai penyakit bagi berbagai tanaman seperti kentang yaitu *Pseudomonas solanacearum*. Pengujian sifat patogen bagi MPF perlu dilakukan terutama bagi isolat dari hasil isolasi MPF pada contoh tanah yang tidak ada tanaman atau yang berasal dari rizosfer tanaman yang mempunyai pertumbuhan kurang normal. Oleh karena itu pengambilan contoh tanah untuk isolasi MPF dianjurkan pada tanah rizosfer yang pertumbuhan tanamannya bagus.

Setelah diamati, seringkali ditemukan bahwa tidak semua koloni yang tumbuh pada media Pikovskaya membentuk zona bening. Hal ini karena sebagian fosfat dari sumber fosfat yang digunakan walaupun tanpa MPF, bisa larut dalam media, sehingga walaupun kelarutannya sangat sedikit/terbatas maka mikroba tertentu yang kebetulan ikut tertuang di dalam cawan, mampu memanfaatkan ketersediaan fosfat tersebut dan mampu membentuk koloni. Keadaan ini menyebabkan adanya persoalan pada waktu penghitungan koloni MPF.

DAFTAR PUSTAKA

- Adu-Tae, A.S.J. 2004. Efisiensi Pemupukan Fosfat dan Hasil Kacang Tanah (*Arachis hypogaea* L.) Varietas Lokal Kupang Barat Akibat Pemberian Pupuk Fosfat, Kotoran Sapi, dan Bakteri Pelarut Fosfat. Desertasi untuk Memperoleh Gelar Doktor. Program Pascasarjana Universitas Padjadjaran Bandung.
- Kimura, R., M. Nishio, & K. Katoh. 1990. Utilization of Phosphorus by Plant After Solubilization by Phosphate Solubilizing Microorganisms in Soil. Nasional Grassland Research Institute. Nasu, Japan and Nasional Agriculture Research Center. Tsukuba, Japan.
- Mullen, D.M. 1998. Transformation of other elements. p. 369-386. In D.M. Silvia, J.J. Fuhrmann, P.G. Hartel and D.A. Zuberer (Eds.) Principles and Applications of Soil Microbiology. Prentice Hall New Jersey 07458.
- Nautiyal, S.C. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. FEMS Lett. 170: 265 – 270.
- Subba-Rao, N.S. 1981. Biofertilizers in Agriculture. Oxford & IBH Publishing Co. New Delhi, Bombay.
- Subba-Rao, N.S. 1982. Phosphate solubilization by Soil Microorganisms. p. 295-303. In N.S. Subba-Rao (Ed.) Advances in Agricultural Microbiology. Oxford & IBH Publishing Co. New Delhi, Bombay, Calcuta.
- Sulaeman, Suparto, & Eviati. 2005. Petunjuk Teknis Analisis Kimia Tanah, Tanaman, Air dan Pupuk. Penyunting B.B. Prasetyo, D. Santoso dan L.R. Widowati. Balai Penelitian Tanah. Badan Litbang Pertanian. Departemen Pertanian.
- Wagner, H.G. & D.C. Wolf. 1998. Carbon transformation and soil organic matter formation. p. 218-257. In D.M. Silvia, J.J. Fuhrmann, P.G. Hartel, & D.A. Zuberer (Eds.) Principles and Applications of Soil Microbiology. Prentice Hall. New Jersey.
- Yoshida, D.D., D.A. Forno, J.H. Cock, & K.A. Gomez. 1976. Laboratory Manual for Physiological Studies of Rice. 3rd Edition. International Rice Research Institute, Los Baños.

CENDAWAN MIKORIZA ARBUSKULER

R.D.M. Simanungkalit

Cendawan mikoriza arbuskuler (cendawan MA) sampai sekarang digolongkan kepada ordo Glomales. Dalam penelitian cendawan MA digunakan berbagai metode, mulai dari metode isolasi sporanya, pengamatan kolonisasi mikoriza dalam akar, penetapan jumlah propagul dalam tanah, penanaman spora tunggal identifikasi berdasarkan morfologi spora dan penggunaan teknik molekuler. Untuk berbagai aspek di atas juga terdapat berbagai metode dengan variasi-variasinya.

Isolasi spora pada dasarnya menggunakan metode penyaringan basah dan dekantasi, yang selanjutnya diikuti sentrifusi dan penyaringan untuk memisahkan spora. Sentrifusi juga bervariasi menggunakan gradient gula dengan konsentrasi gula yang berbeda.

Pewarnaan akar diperlukan untuk melihat dengan baik adanya kolonisasi akar sebagai bukti terjadinya simbiosis tanaman inang dengan cendawan MA. Berbagai zat warna dapat digunakan seperti *methylene blue*, *tryphan blue*, *fuchsin acid*, dan sebagainya.

Penetapan jumlah propagul dilakukan dengan metode MPN (*most probable number*). Propagul yang infeksiif tidak hanya spora tetapi juga hifa dan akar bermikoriza yang terdapat dalam tanah (media). Oleh karena itu penetapan jumlah propagul dengan metode MPN merupakan metode yang baik untuk mencakup ketiga jenis propagul tersebut.

Identifikasi spora yang banyak dipakai adalah berdasarkan struktur dan morfologi spora. Deteksi dan identifikasi dengan teknik molekuler telah melahirkan pendapat bahwa cendawan MA ini lebih beraneka ragam daripada yang dipikirkan sebelumnya. Teknik-teknik molekuler yang berbasis *polymerase chain reaction* (PCR), misalnya *restriction fragment length polymorphism* (RFLP), *random amplification of polymorphic DNA* (RAPD) memungkinkan karakterisasi asam nukleat diamplifikasi dalam jumlah yang sangat sedikit, dipakai untuk mendeteksi dan mengidentifikasi cendawan MA dapat dilihat pada Simon *et al.* (1992, 1993), Wyss & Bonfante (1993), Clapp *et al.* (1995), Zézé *et al.* (1996), Lanfranco *et al.* (1995). Metode identifikasi yang disajikan dalam buku ini hanyalah berdasarkan morfologi spora.

2.7.1 Isolasi Spora

2.7.1.1 Metode penyaringan basah dan dekantasi yang diadaptasi dari Gerdemann & Nicolson (1963)

Prinsip

Saringan metal berbagai ukuran dipakai untuk dapat memisahkan spora. Saringan yang lebih kasar (500-2.000 μ) dipakai untuk memisahkan bahan-bahan organik dan partikel tanah yang kasar, sedangkan saringan halus (38-250 μ) dipakai untuk spora-spora yang berbeda ukuran.

Bahan dan alat:

- Contoh tanah
- Air keran.
- Beker gelas
- Cawan Petri
- Alat pengaduk/pengocok tanah
- Saringan berbagai ukuran (53, 100, 150, 250 μ)
- Sentrifus dengan rotor horizontal.

Prosedur

- Campur tanah dan air dengan perbandingan 1:4 (v/v), lalu aduk dengan pengaduk gelas atau alat pengocok pakai magnit selama 2 menit, setelah itu biarkan beberapa detik agar partikel-partikel tanah yang berat mengendap.
- Tuangkan suspensi tanah ini di atas saringan metal (500-2.000 μ) untuk memisahkan bahan-bahan organik dan tampung cairan yang melalui saringan itu dalam beker gelas. Bilas saringan agar semua partikel kecil masuk ke dalam beker gelas.
- Kocok kembali suspensi yang diperoleh pada butir 2 di atas dan biarkan agar partikel-partikel yang berat mengendap.
- Tuangkan suspensi ini di atas saringan metal ukuran 38-250 μ kalau ingin mengelompokkan spora-spora itu berdasarkan ukurannya.
- Bilas materi yang tertahan pada saringan agar semua bahan-bahan koloid sudah tercuci.
- Balikkan saringan, lalu bilas perlahan-lahan dengan semprotan air yang kecil di atas cawan Petri sehingga semua spora yang ada pada tiap saringan tercuci ke dalam cawan Petri tadi. Kemudian amati di bawah mikroskop stereo.

2.7.1.2 Metode sentrifusi gula yang dimodifikasi dari Jenkins (1964)

Prinsip

Metode ini masih juga menggunakan teknik penyaringan basah dan dekantasi, hanya pada metode ini ada tahapan sentrifusi gula untuk melepaskan spora dari pelet partikel tanah.

Bahan dan alat

- Air keran
- Beker gelas
- Larutan gula pasir (454 g L⁻¹ air)
- Kertas saring Whatman No. 42
- Ember plastik
- Saringan metal 20, 270, 325, dan 350 mesh
- Tabung sentrifus 50 ml
- Sentrifus dengan rotor horizontal

Prosedur

- Tempatkan 100-500 ml tanah di atas saringan 20 mesh dan cuci dengan air untuk memisahkan serasah (bahan organik). Air cucian dan tanah ditampung dalam ember plastik.
- Air cucian dalam ember ini kemudian diaduk, setelah itu dibiarkan kira-kira 30 detik agar partikel-partikel tanah yang berat mengendap. Kemudian suspensi ini disaring dengan saringan 270 mesh. Hasil saringan ini selanjutnya dibilas ke dalam beker gelas agar semua spora dan partikel-partikel tanah yang ada pada saringan tercuci.
- Pindahkan suspensi ini ke dalam tabung sentrifusi dan disentrifus pada 2.000 rpm selama 5 menit.
- Dekantasi larutan supernatan dengan hati-hati dan peletnya suspensikan kembali pada larutan gula. Selanjutnya sentrifus lagi pada 2.000 rpm selama 1 menit
- Tuangkan supernatan pada saringan kertas Whatman No. 42 dengan corong di atas labu Erlenmeyer dan selanjutnya bilas dengan air 2-3 kali untuk membersihkan gula dari spora.

2.7.3 Kuantifikasi Kolonisasi Cendawan Mikoriza Arbuskuler (MA) dalam Akar Tanaman (% Kolonisasi Mikoriza)

Prinsip

Simbiosis antara cendawan MA dan tanaman inang ditandai dengan terjadinya kolonisasi cendawan itu dalam akar tanaman inang. Kolonisasi ini baru terlihat dengan jelas kalau contoh akar itu dijernihkan dan diwarnai dengan zat warna tertentu dan dilihat di bawah mikroskop cahaya. Penjernihan dilakukan untuk melarutkan bagian-bagian sel sehingga yang terlihat hanya struktur-struktur cendawan MA (vesikel, hifa dan arbuskel) dalam akar. Struktur-struktur ini

menyerap zat warna yang dipakai. Akar yang dikolonisasi cendawan MA terutama adalah bagian kortek akar rambut muda yang merupakan bagian yang paling aktif untuk penyerapan hara. Mikoriza jarang ditemukan pada akar tua yang tidak sukulen. Karena itu perlu pemilihan akar yang tepat untuk mengkuantifikasi kolonisasi ini.

Alat

- Alat-alat gelas yang diperlukan untuk pembuatan larutan
- Cawan Petri yang berkotak-kotak (*gridline*)
- Penangas air
- Mikroskop stereo dan mikroskop binokuler

Bahan/larutan

- Larutan 10% KOH (untuk penjernihan akar)
 - Larutkan 10 g KOH dalam 90 ml air (sesuaikan dengan kebutuhan)
- Larutan HCl (memasamkan akar agar memudahkan penyerapan zat warna)
 - Campur 1 ml HCl pekat dengan 99 ml air (HCl 1%) atau campur HCl teknis dengan air dengan perbandingan 1:4
- Asam laktat
- Larutan pewarna (gunakan salah satu):
 - Larutan pewarna *acid fuchsin* (Kormanik & McGraw, 1982)
 - Campur 875 ml asam laktat (grade laboratorium) dengan 63 ml gliserin dan 63 ml air kran untuk membuat larutan asam laktat. Kemudian larutkan 0,1 g *acid fuchsin* dalam larutan asam laktat tersebut.
 - Larutan pewarna *trypan blue (cotton blue)* (Koch & Moawad, 1975)
 - Buat larutan laktofenol dengan mencampur 40 ml air, 65 ml gliserin, 33 ml asam laktat dan 80 g fenol (hati-hati menggunakan fenol karena beracun). Larutkan *trypan blue* di dalam laktofenol untuk membuat larutan *trypan blue* 0,2%
 - Larutan pewarna *aniline blue* (Koske & Gemma, 1989)
 - Larutkan 0,25 g *aniline blue* dalam campuran 25 ml air dan 475 ml asam laktat
- Larutan pencuci warna (disesuaikan dengan larutan pewarna yang digunakan):
 - Larutan pencuci warna (*destaining solution*) *acid fuchsin*
 - Campur 875 ml asam laktat (grade laboratorium) dengan 63 ml gliserin dan 63 ml air kran.
 - Larutan pencuci *trypan blue*.
 - Larutkan 80 g fenol dalam campuran 40 ml air, 65 ml gliserin, 33 ml asam laktat.
 - Larutan pencuci *aniline blue*

- Campur 25 ml air dan 475 asam laktat.
- Larutan FAA (formalin-aseto-alkohol bila contoh akar perlu diawetkan karena baru diproses untuk waktu yang lama)
 - Campur formalin, asam asetat, dan alkohol 50% dengan perbandingan 90:5:5.
- Larutan H₂O₂ basa (bila diperlukan untuk akar yang mengandung pigmen, seperti akar ubi kayu misalnya).
 - Tambahkan 3 ml NH₄OH (amonia rumah tangga dapat dipakai) kepada 30 ml H₂O₂ 10% dan 567 ml air keran

Catatan: Hati-hati membuat dan menggunakan zat warna *trypan blue*, *acid fuchsin*, dan *aniline blue*, karena ketiganya berbahaya bagi kesehatan. Gunakan masker ketika bekerja dengan ketiga zat warna tersebut.

Pemrosesan akar

- Ambil contoh akar yang masih muda dari lima titik pada sistem akar. Cuci bersih, lalu potong-potong menjadi segmen-segmen sepanjang 1 cm.
- Timbang seberat 2 g dari tiap ulangan dan tempatkan dalam tabung reaksi

Penjernihan dan pewarnaan dengan pemanasan

- Tambahkan larutan KOH 10% ke dalam tiap tabung reaksi sebanyak tigaperempat tinggi tabung reaksi, sehingga larutan dan segmen akar tidak sampai melimpah keluar waktu dipanaskan. Tempatkan tabung-tabung itu dalam rak besi
- Tempatkan rak itu dalam penangas air. Panaskan selama 30-60 menit pada suhu 70⁰C, tergantung pada kondisi materi akar yang dipanaskan (Suhu dapat ditinggikan/direndahkan, demikian pula waktunya dapat lebih pendek atau lebih lama. Contoh akar tanaman padi misalnya sangat lunak dan dapat hancur bila dipanaskan lebih lama dari 30 menit pada suhu 70⁰C). Larutan KOH berfungsi untuk melarutkan sitoplasma dan inti sel tanaman, sehingga zat warna dapat menembus dengan mudah.
- Tuangkan larutan KOH dari tiap tabung reaksi dan bilas dengan air kran 3-5 kali sampai warna air pencucian tidak berwarna coklat lagi.
- Tuangkan larutan H₂O₂ basa ke tiap tabung reaksi bila contoh akar mengandung pigmen tertentu, dan biarkan selama 10-20 menit sehingga pemutihan akar berlangsung dengan baik.
- Tuangkan larutan H₂O₂ dan bilas dengan air keran 3-4 kali untuk menghilangkan larutan H₂O₂.
- Tambahkan larutan HCl 1% ke tiap tabung reaksi dan biarkan selama 3-4 menit. Kemudian tuangkan larutan HCl itu. Jangan dibilas, karena

pengasaman itu bertujuan untuk memperoleh pewarnaan yang baik nantinya.

- Berikan larutan salah satu zat warna yang tersebut di atas ke tiap tabung reaksi secukupnya sehingga semua segmen akar terendam dalam larutan.
- Tempatkan kembali rak besi itu dalam penangas air pada suhu 70°C selama 10-60 menit sampai diperoleh pewarnaan yang baik (tergantung jenis tanaman dan ukuran akar).
- Tuangkan sisa larutan pewarna ke dalam wadah gelas tertentu untuk dikumpulkan.
- Sesuai dengan pewarnaan yang dipakai, berikan larutan pencuci warna yang sesuai ke tiap tabung reaksi, lalu kocok sehingga zat warna yang terserap akar terlarut ke dalam larutan pencuci warna, kecuali yang ada pada struktur-struktur mikoriza.

Catatan: Asam laktat dari larutan hasil pencucian ini dapat didaur ulang dengan menghilangkan zat warna yang tercampur di dalamnya. Caranya 10 g karbon aktif diberikan ke dalam 1 L bekas larutan pencuci warna tadi dan dibiarkan semalam. Kemudian disaring dengan kertas filter Whatman No. 1 atau 2 untuk menghilangkan materi yang kasar dan partikel karbon yang besar, sesudah itu disaring lagi dengan kertas saring Whatman No. 42 untuk menghilangkan partikel karbon yang halus. Selanjutnya larutan pencuci warna ini dapat dipakai kembali).

Penjernihan dan pewarnaan tanpa pemanasan

Metode ini makan waktu lebih lama daripada pewarnaan dengan pemanasan. Anilin biru disarankan untuk dipakai karena sampai sekarang zat warna ini terbukti tidak berbahaya dibandingkan dengan *acid fuchsin*, *tryphan blue*, atau *chloral black E*.

Proses pewarnaannya adalah sebagai berikut:

- Jernihkan contoh akar dalam larutan 20% KOH selama 1-3 hari.
- (Perlu dilakukan uji coba untuk mendapatkan waktu penjernihan yang optimal).
- Tuangkan larutan KOH, dan bilas akar dengan air keran sehingga bersih. Kemudian asamkan akar dengan memberi larutan HCl 0,1 M.
- Tuangkan larutan HCl, lalu berikan larutan pewarna *aniline blue* (cara pembuatannya lihat pada bahan/larutan di atas) dan biarkan selama 1-3 hari.
- Tuangkan sisa larutan pewarna ke dalam wadah gelas tertentu untuk dikumpulkan.
- Berikan larutan pencuci warna ke tiap tabung reaksi, lalu biarkan bermalam untuk memberi kesempatan zat warna yang terserap akar terlarut ke dalam larutan pencuci warna, kecuali yang ada pada struktur-struktur mikoriza.

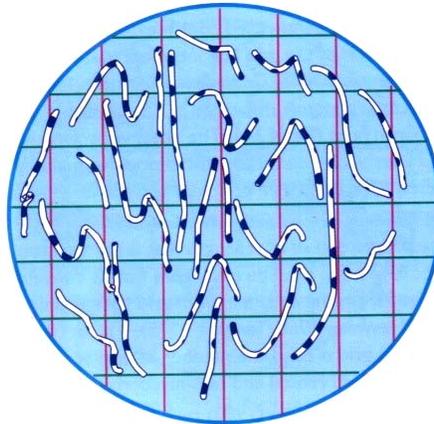
- Tuangkan larutan pewarna yang tercuci dari contoh akar ke dalam suatu wadah tertentu (asam laktat dari larutan pewarna ini dapat juga didaurulang dengan cara yang tersebut pada pewarnaan dengan pemanasan di atas)

Mikroskopi dan penetapan % kolonisasi

- Tebarkan segmen-segmen akar dari tiap tabung reaksi secara acak pada cawan Petri berkotak-kotak (*gridline*).
- Amati di bawah mikroskop stereo segmen-segmen akar bermikoriza yang berpotongan dengan garis vertikal dan horizontal (*gridline*) pada cawan Petri (lihat Gambar 1)
- Nyatakan % kolonisasi akar dengan

$$\frac{\text{MGV} + \text{MGH}}{\text{Jumlah akar yang diamati}} \times 100\%$$

MGV = Mikoriza yang memotong garis vertikal
 MGH = Mikoriza yang memotong garis horizontal



Gambar 1. Segmen-segmen akar yang akan diamati dalam cawan Petri bergaris vertikal dan horizontal (Brundrett *et al.*, 1996)

2.7.3 Penetapan Jumlah Propagul

Prinsip

Komponen yang infeksi dari cendawan MA tidak hanya spora saja tetapi juga miseliumnya dan potongan akar bermikoriza. Untuk mengetahui potensi inokulumnya, perlu ditetapkan secara kuantitatif semua komponen yang infeksi tersebut, tetapi penetapan ini akan menjadi sangat rumit. Estimasi potensi inokulum ini dapat ditetapkan dengan teknik *most probably number*. Metode yang diuraikan di bawah ini didasarkan pada metode Porter (1979) dan Sieverding (1991).

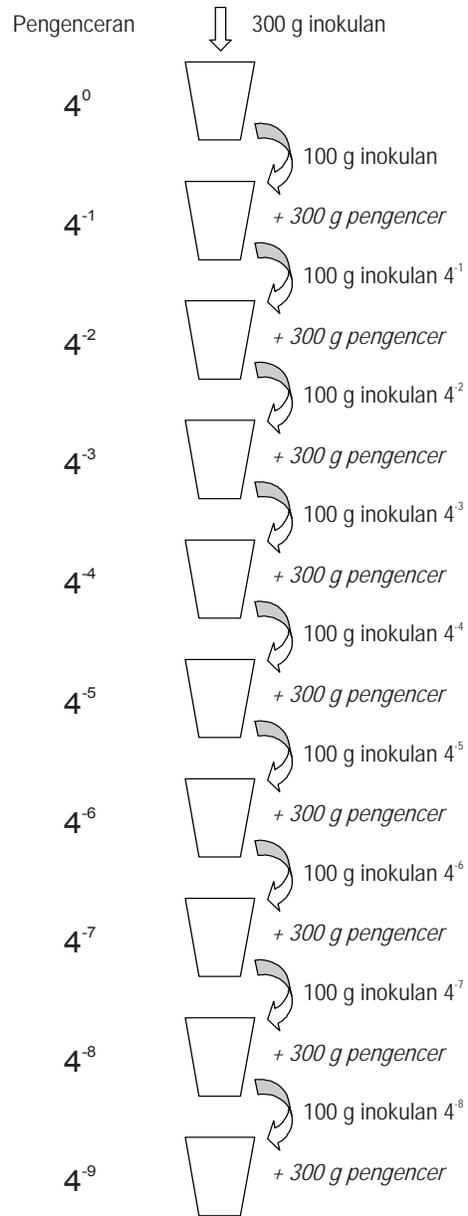
Bahan dan alat

- Larutan hara Yoshida
- Gelas plastik
- Inokulan
- Zeolit
- Objek gelas dan penutup
- Mikroskop binokuler
- Autoklaf

Prosedur

- Timbang 50 g inokulan atau contoh tanah yang akan ditetapkan potensi inokulumnya di atas dan keringkan di oven pada suhu 105°C sampai bobotnya konstan. Ulangan dua kali. Tentukan kadar airnya.
- Sterilisasi zeolit sebanyak 13,5 kg dengan dua kali autoklaf. Zeolit ini selanjutnya akan dipakai sebagai pengencer.
- Timbang 300 g inokulan atau contoh tanah tanpa pengencer (disebut sebagai pengenceran 4^0). Tempatkan dalam gelas plastik.
- Timbang 100 g inokulan atau contoh tanah dan tempatkan dalam gelas plastik. Tambahkan 300 g pengencer, lalu campur rata. Campuran ini menghasilkan pengenceran 4^{-1} .
- Ambil 100 g hasil pengenceran 4^{-1} dan tempatkan dalam gelas plastik lain. Tambahkan 300 g pengencer, lalu aduk rata. Campuran ini menghasilkan pengenceran 4^{-2} .
- Ambil 100 g hasil pengenceran 4^{-2} dan tempatkan dalam gelas plastik lain. Tambahkan 300 g pengencer, lalu campur rata. Campuran ini menghasilkan pengenceran 4^{-3} .
- Pengenceran tersebut terus dilakukan hingga menghasilkan pengenceran 4^{-4} , 4^{-5} , 4^{-6} , 4^{-7} , 4^{-8} , dan 4^{-9} . Diagram pengenceran dapat dilihat pada Gambar 2.
- Setiap pengenceran diulang 5x. Pengenceran dapat dilakukan sekaligus untuk lima ulangan.
- Setelah pengenceran selesai, medium diiri dengan air steril sampai kapasitas lapang.

- Pemupukan dilakukan dengan menggunakan larutan hara Yoshida *et al.* (1976). Pembuatan tiap larutan stok dan campuran larutan (4 L) dapat dilihat pada halaman 63 dalam buku ini. Berikan 5 ml campuran larutan pada minggu pertama dan 10 ml pada minggu 2-3 (sekali tiap minggu), dan 20 ml tiap kali pada minggu 4-8 (dua kali seminggu).
- Tanam tiga benih tanaman indikator pada setiap gelas plastik dan setelah seminggu dibiarkan hanya 2 tanaman per gelas plastik. Pertanaman di kamar kaca dapat dilihat pada Gambar 3.
- Setiap kali penyiraman tanaman dilakukan sampai kapasitas lapang untuk mempertahankan kelembapan.
- Panen akar dilakukan 8 minggu setelah tanam. Pisahkan tajuk dari akar, dan bersihkan akar dari medium tumbuhnya.
- Ambil contoh akar dari tiap pengenceran dan tiap ulangan. Potong akar-akar ini menjadi potongan-potongan kira-kira 1 cm.
- Setelah akar dijernihkan, warnai dengan *acid fuchsin* atau zat pewarna lain. 20 potongan akar disusun pada dua gelas objek dan ditutup dengan penutup gelas (*cover slips*).
- Amati di bawah mikroskop. Tentukan apakah ada infeksi atau tidak. Catat pengamatan pada sebuah tabel dengan tanda + bila ada infeksi dan tanda – bila tidak ada infeksi.



Gambar 2. Diagram kelipatan empat pada metode MPN



Gambar 3. MPN tanaman jagung menggunakan polibag (gambar atas) dan tanaman siratro menggunakan gelas plastik (gambar bawah)

Perhitungan

- 1). Contoh hasil pengamatan MPN

Taraf pengenceran	I	II	III	IV	V	Jumlah ulangan terinfeksi
4 ⁰	+	+	+	+	+	5
4 ⁻¹	+	+	+	+	+	5
4 ⁻²	+	+	+	-	+	4
4 ⁻³	+	-	+	+	+	4
4 ⁻⁴	+	+	+	-	-	3
4 ⁻⁵	-	+	-	+	+	3
4 ⁻⁶	+	+	-	-	-	2
4 ⁻⁷	-	-	-	-	+	1
4 ⁻⁸	-	-	-	-	-	0
4 ⁻⁹	-	-	-	-	-	0
Jumlah						27

2). Cara perhitungan MPN

$$\log \Omega = x \cdot \log a - K$$

Ω = jumlah propagul infeksi

x = jumlah rata-rata ulangan yang terinfeksi

jumlah ulangan yang terinfeksi

jumlah ulangan per pengenceran

$$y = s - x$$

s = jumlah taraf pengenceran

a = faktor pengenceran (4 untuk contoh yang diberikan)

K = nilai yang diperoleh dari tabel Fisher & Yates (1963)

Tabel Fisher & Yates (1963) untuk pengenceran kelipatan empat

x	Nilai K	y	Nilai K
---	---------	---	---------

0,4	0,707	3,5	0,550
0,6	0,618	3,0	0,548
0,8	0,577	2,5	0,545
1,0	0,559	2,0	0,537
1,5	0,555	1,5	0,522
2,0	0,553	1,0	0,488
2,5	0,552	0,8	0,464
		0,6	0,431
		0,4	0,375

Bila $x > 2,5$, atau $y > 3,5$ yang diberikan pada Tabel di atas, maka nilai $K = 0,552$ yang dipakai. Perhitungan berdasarkan contoh di atas adalah sebagai berikut :

$$x = 27/5 = 5,4; y = 10 - 5,4 = 4,6; a = 4$$

$$\begin{aligned} \log \Omega &= 5,4 \cdot \log 4 - 0,552 \\ &= 5,4 \cdot 0,6021 - 0,552 \\ &= 3,2513 - 0,552 \\ &= 2,6993 \end{aligned}$$

$$\Omega = 500,4$$

Bila kadar air inokulan tadi 10%, maka 100 g inokulan mengandung:

$$100/100-90 \times 500,4 = 556 \text{ propagul MA infeksi}$$

Penghitungan selang kepercayaan 95% :

$$\log \Omega = \log \Omega \pm s/\sqrt{n} \cdot z \quad \begin{aligned} s &= \sqrt{0,0201} \text{ untuk pengenceran kelipatan } 4 \\ n &= \text{jumlah ulangan per pengenceran} \\ z &= 1,645 \text{ untuk taraf } 95\% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \log \Omega_{s,i} &= \log 556 \pm \sqrt{0,0201}/\sqrt{5} \cdot 1,645 \\ &= 2,7450 \pm 0,4483/2,2361 \cdot 1,645 \\ &= 2,7450 \pm 0,2005 \cdot 1,645 \end{aligned}$$

$$\log \Omega_s = 2,7450 + 0,3298 = 3,0748$$

$$\Omega_s = 1188$$

$$\log \Omega_l = 2,7450 - 0,3298 = 2,4152$$

$$\Omega_l = 260$$

Jumlah propagul MA infeksi pada inokulan tersebut = 556 (260 – 1.188) per 100 g inokulan kering.

2.7.4 Pertanaman Spora Tunggal

Prinsip

Cendawan MA tidak dapat ditumbuhkan pada media buatan karena cendawan ini merupakan simbiosis obligat, sehingga untuk perkembangannya cendawan ini harus bersimbiosis dengan suatu tanaman. Spora-spora yang dikumpulkan dari lapang dapat terdiri atas berbagai spesies. Upaya pemurnian harus dilakukan dengan menginokulasikan satu spora dengan tanaman inang tertentu, dengan tujuan untuk mendapatkan satu isolat yang kemungkinan merupakan satu spesies tertentu.

Bahan

- Zeolit
- Arang sekam
- Fosfat alam (sebagai sumber P) dan larutan Yoshida (tanpa hara P)
- Contoh tanah dan pot plastik untuk tanaman pancingan (*trapping*)
- Gelas plastik (sebagai wadah campuran zeolit dan arang sekam) untuk pertanaman spora tunggal
- Benih jagung
- Gula pasir
- Kertas saring
- *Chloramine T*
- HgCl₂

Alat

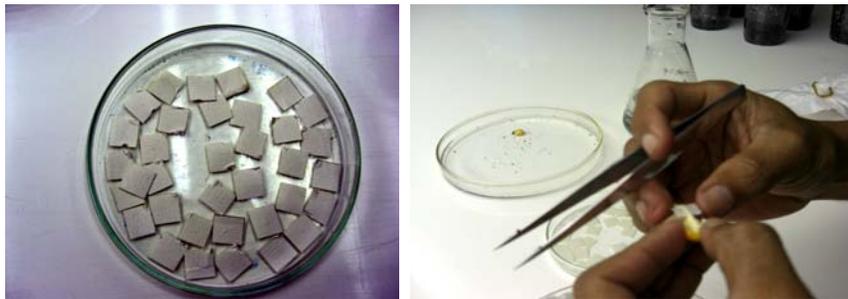
- Beker gelas (sebagai wadah mencampur zeolit dan arang sekam)
- Saringan metal berukuran 38, 53, 100, dan 500 μ
- Blender
- Sentrifus

Prosedur

- 4) Pertanaman pancingan
 - Tempatkan \pm 2 kg contoh tanah dalam pot (kalau contoh tanah ini kurang, tambahkan tanah pengencer yang sudah steril, agar volume tanah ini memadai untuk lama pertanaman pancingan 2-3 bulan).
 - Airi hingga kapasitas lapang.
 - Beri pupuk fosfat alam, dan larutan Yoshida (lihat halaman 77) tanpa hara P secukupnya untuk tanaman jagung.
 - Tanam empat benih jagung dan setelah 10 hari jarangkan menjadi dua tanaman.
 - Siram tanaman sesuai dengan kebutuhan.
 - Panen tanaman setelah berumur 2-3 bulan dengan jalan memotong tanaman pada pangkal batang.
- 5) Isolasi spora

- 50 g contoh tanah ditambah 300 ml air, lalu diblender tiga kali, masing-masing 1 menit.
 - Saring suspensi yang diperoleh dengan saringan bertingkat yang disusun bertingkat mulai dari ukuran yang terbesar paling atas dan terkecil paling bawah Hasil saringan teratas biasanya berupa serasah dan potongan akar tanaman. Satukan hasil dari tiga saringan lain dalam satu beker gelas. Bagi-bagikan suspensi ini ke dalam tabung-tabung sentrifus.
 - Timbang tiap tabung agar seimbang sebelum dimasukkan ke dalam sentrifus.
 - Sentrifugasi tabung-tabung ini dengan kecepatan 1.500 putaran per menit (rpm) selama 90 detik.
 - Buang supernatannya, tambahkan larutan gula 48%, dan aduk, sehingga endapan yang ada terlarut.
 - Setimbangkan semua tabung, lalu sentrifugasi dengan kecepatan 1.000 rpm selama 1 menit.
 - Tuangkan supernatannya ke dalam saringan metal ukuran 38 μ dan semprot saringan dari belakang dan tampung spora yang disemprot dalam cawan Petri.
 - Pilih spora yang masih segar dan utuh dengan bentuk dan warna yang berbeda dan berukuran 38-450 μ , dengan asumsi bahwa spora ini dari takson yang berbeda.
- 6) Inokulasi spora tunggal
- Kecambah benih jagung steril (disterilisasi dengan larutan $HgCl_2$ selama 10 menit) di atas kertas saring basah yang banyaknya cukup untuk spora-spora terpilih di atas. Gunakan kecambah yang berumur 3-4 hari.
 - Sterilkan tiap spora terpilih dengan menempatkannya di atas kertas saring yang sangat jenuh dengan larutan Chloramine T 2% selama 20 menit.
 - Letakkan tiap-tiap spora dengan menggunakan jarum/pinset steril pada potongan kecil kertas saring steril berukuran 1x 1 cm, lalu tempelkan pada akar kecambah jagung (lihat Gambar 4).
 - Tanam kecambah dalam media campuran zeolit dan arang sekam dengan perbandingan 3:1 (b/b) dalam gelas plastik. Tempatkan gelas-gelas plastik dalam ruang tumbuh (lihat Gambar 5).
 - Pupuk dengan larutan Yoshida (lihat halaman 77) tapi tanpa hara P dan sebagai gantinya gunakan fosfat alam. Berikan larutan hara 10 ml pada minggu pertama; 20 ml tiap kali pada minggu 2-3, sekali tiap minggu; 20 ml tiap kali pada minggu keempat dan selanjutnya, dua kali seminggu. Sesuaikan dengan pertumbuhan tanaman.
 - Siram tanaman dengan air steril sampai kapasitas lapang. Airi sesuai dengan kebutuhan tanaman.

- Panen tanaman setelah berumur kira-kira 2 bulan. Cek kolonisasi mikoriza pada akar sebelum dipanen sesuai dengan prosedur pada 2.7.2. Tanaman dikatakan terkolonisasi oleh cendawan MA, apabila pada jaringan akar terdapat struktur hifa, arbuskel, dan/atau vesikel.
- Lakukan isolasi spora untuk identifikasi sesuai dengan prosedur isolasi spora di atas.
- Bahan spora siap diamati di bawah mikroskop dan diidentifikasi.



Gambar 4. Cawan Petri dengan kertas saring berisi spora tunggal (gambar kiri) dan penempelan spora pada akar kecambah jagung (Foto: Rohani C.B. Ginting)



Gambar 5. Tanaman jagung yang diinokulasi spora tunggal di ruang tumbuh

2.7.5 Identifikasi Cendawan Mikoriza Arbuskuler

Prinsip

Identifikasi cendawan MA dapat dilakukan berdasarkan morfologi sporanya, ataupun dengan menggunakan teknik molekuler. Taksonomi cendawan MA yang dipakai sekarang berdasarkan morfologi sporanya. Perbedaan morfologinya ini dapat dilihat dari perkembangan spora, susunan spora, bentuk spora, ukuran spora, warna spora, pola lapisan dinding spora dan reaksi warnanya, ornamentasi pada dinding spora, isi spora, perkecambahan spora, hifa.

Bahan

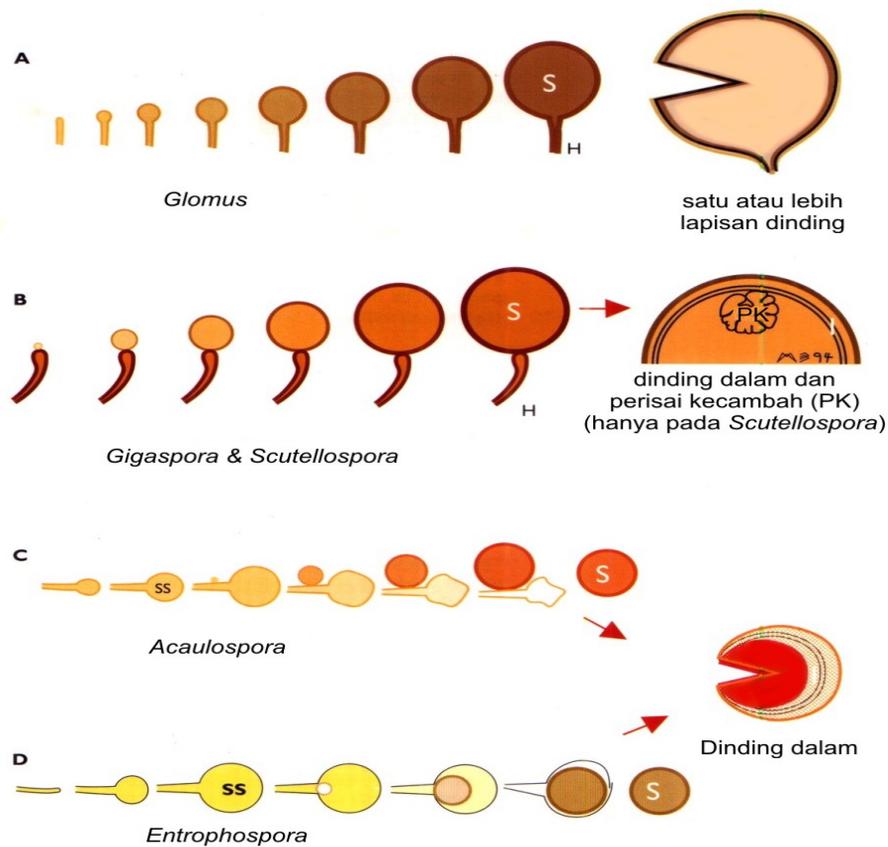
- Spora (baik yang berasal dari lapang atau hasil pertanaman spora tunggal)
- Pereaksi Melzer
 - Larutkan 1,5 g kalium jodida, 0,5 g jodine, kloral hidrat 100 g dalam 22 ml air
- Polivinil alkohol –lacto-gliserol (PVLG)
 - Larutkan 1,66 g polivinil alkohol dalam 10 ml air, 10 ml asam laktat dan 1 ml gliserin

Alat

- Objek gelas dan kaca penutup (slip)
- Kaca arloji (*watch glass*) tempat spora-spora yang akan diamati
- Mikroskop binokuler yang baik (kualitas tinggi sehingga mampu melihat detail dari spora) dan dilengkapi kamera (bisa dipakai dengan *bright-field illumination* dan *Nomarski interference illumination*)
- Pinset
- Jarum untuk memindahkan spora.

Perkembangan spora

Perkembangan spora merupakan salah satu kriteria utama yang digunakan untuk mengidentifikasi genus cendawan Glomales (Morton, 1988). Spora dari spesies-spesies *Scutellospora* dan *Gigaspora* berkembang dari hifa *subtending bulbous*, sedangkan spora dari spesies *Glomus* terbentuk pada hifa sempit (*narrow*) atau bersinar (*flaring*). *Acaulospora* dan *Entrophospora* mempunyai spora yang *sessile* setelah terlepas dari *sporiferous saccule*. Banyak spesies *Glomus* membentuk spora dalam akar dan juga dalam tanah, tetapi genus-genus lain pada umumnya tidak bersporulasi dalam akar yang hidup. Skema perkembangan spora spesies *Glomus*, *Gigaspora*, *Scutellospora*, *Acaulospora*, dan *Entrophospora* dapat dilihat pada Gambar 6 di bawah.



Gambar 6. Skema perkembangan spora cendawan (Brundrett *et al.*, 1996)

Susunan spora

Spora cendawan Glomales dapat diproduksi tunggal atau berkelompok (agregat) yang disebut sebagai sporokarp (lihat Gambar 7). Tetapi istilah ini salah kaprah, karena massa spora yang diproduksi oleh cendawan Glomales biasanya jauh lebih kecil dan lebih sederhana strukturnya daripada sporokarp (jamur dan *truffles*) yang dihasilkan oleh Ascomycetes dan Basidiomycetes. Agregasi spora cendawan Glomales sering mengandung materi tanah, mungkin tidak mengandung banyak hifa khusus, tetapi mungkin mempunyai peridium (lapisan luar hifa). Genus *Sclerocystis* dibedakan dari *Glomus* berdasarkan susunan spora dalam sporokarp.



Gambar 7. Agregat spora pada *Glomus microaggregatum*

Bentuk spora

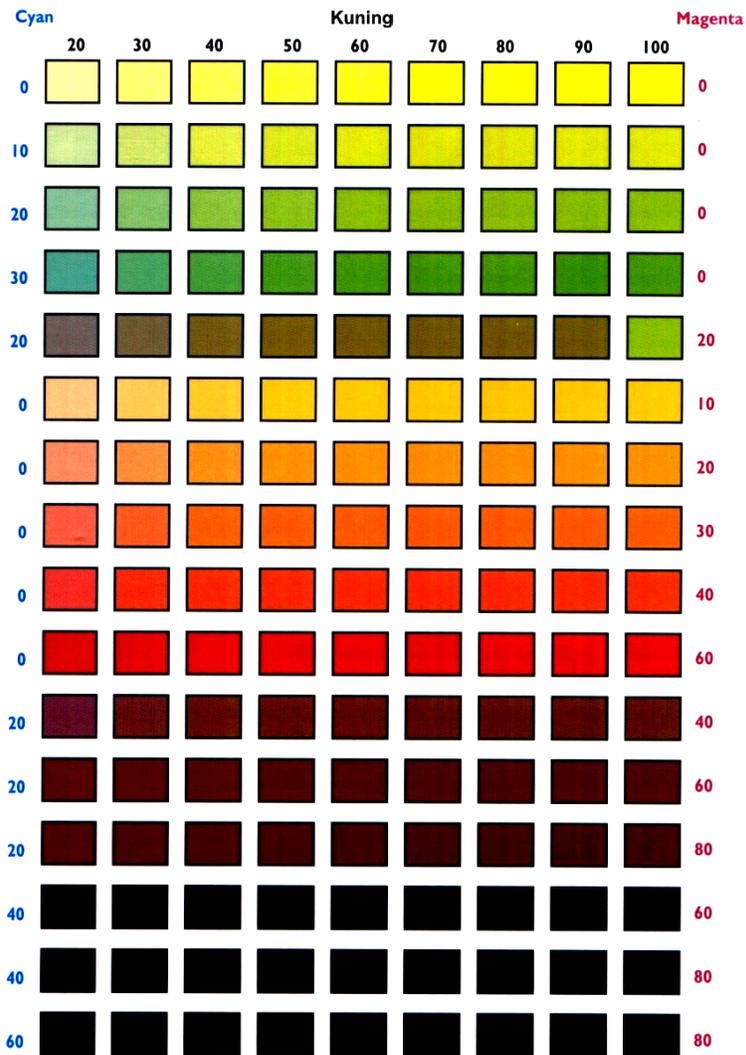
Spora kebanyakan cendawan Glomales bulat, tetapi beberapa spesies mempunyai spora bentuk oval, oblong, atau kadang-kadang bentuk lain. Tangkai hifa yang tetap menempel pada spora dapat berbentuk silinder, *flared into a conical shape* membengkak dan beberapa spora, atau membengkak, dan beberapa spora mempunyai hifa ganda atau tangkai hifa bercabang. Tampak spora dari spora-spora dewasa dapat *occluded* oleh lapisan-lapisan dinding atau materi-materi lain (lihat Morton, 1988).

Ukuran spora

Ukuran spora dianggap kurang berguna dibandingkan dengan banyak kriteria taksonomi lain, karena keragaman ukurannya (Morton 1988), tetapi ukuran spora yang berbeda sangat besar dapat membantu membedakan spesies. Ukuran spora cendawan Glomales berkisar dari yang sangat kecil (20-50 μm) sampai sangat besar (200-1.000 μm). Spora endofit yang halus dapat berukuran sekecil 5 μm , tetapi biasanya diabaikan saja.

Warna spora

Warna spora beragam antara isolat maupun dalam isolat cendawan Glomales dan dapat dipakai untuk membantu identifikasi. Warna spora dapat diidentifikasi dengan menggunakan peta warna (Brundrett *et al.*, 1996). Peta warna ini dapat dilihat pada Gambar 7.

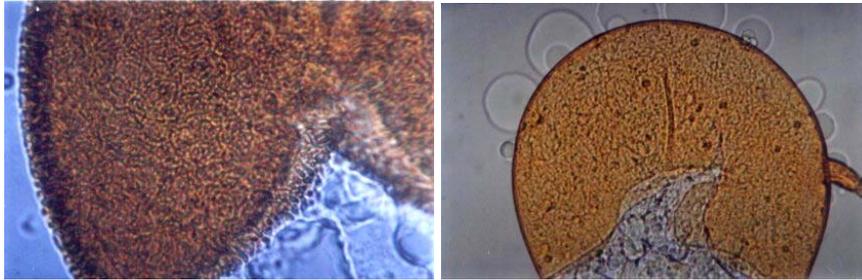


Gambar 8. Peta warna dapat digunakan untuk menggambarkan spora cendawan MA. Warnanya dapat digambarkan sebagai % CYM (cyan, kuning, magenta) (Brundrett *et al.*, 1996)

Ornamentasi (hiasan) spora

Ornamentasi ini meliputi lubang, retikulasi (jaringan), duri, dan papillae yang terdapat pada permukaan spora. Kebanyakan ornamentasi ini terdapat pada spora *Scutellospora* dan *Acaulospora*. Spora berwarna kusam yang terlihat di bawah mikroskop sering mempunyai papillae, atau ornamentasi permukaan yang

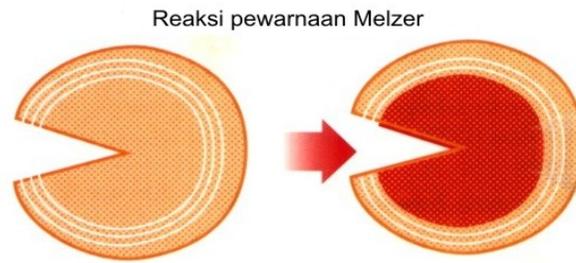
mendifraksi sinar, dan dapat dilihat dengan pembesaran 100x pakai minyak imersi, sedangkan spora yang bersinar kemungkinan tidak memiliki ornamentasi. Berbagai ornamentasi ini dapat dilihat pada Gambar 9.



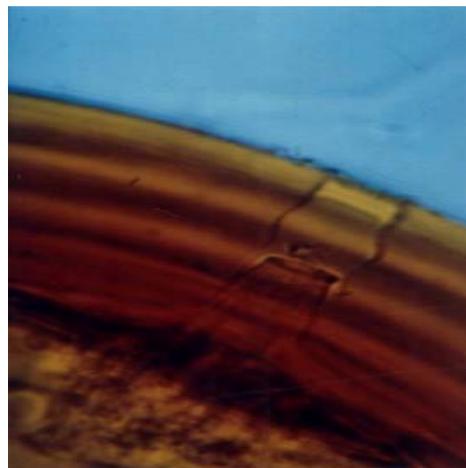
Gambar 9. Contoh ornamentasi pada permukaan spora

Lapisan-lapisan dinding spora dan reaksi warnanya

Dinding spora cendawan Glomales memiliki satu atau lebih lapisan yang berbeda tebal, struktur, penampilan dan reaksi warnanya. Ada delapan tipe lapisan dinding yaitu: dinding berlapis (*lamine*), dinding *evanescent*, dinding unit, dinding *germinal*, dinding membran, dinding *coriaceous*, dinding beaded, dan dinding amorf (<http://invam.caf.wvu.edu/fungi/taxonomy/concept/convtrad.htm>). Walker (1983) membagi dinding spora ini menjadi empat tipe, yaitu: satuan, *laminated*, *evanescent*, dan membran (Tabel 1). Spesies *Acaulospora*, *Entrophospora* dan *Scutellospora* secara khas memiliki struktur dinding yang kompleks, terdiri atas satu dinding luar yang tebal dan satu atau lebih lapisan dinding dalam yang tipis. Lapisan-lapisan dinding ini hanya dapat dilihat bila sporanya dipencet, diamati di bawah mikroskop compound. Dengan pewarna Melzer, satu atau lebih lapisan dinding akan berwarna merah atau *purple* (Gambar 10). Reaksi warna Melzer dapat terjadi pada lapisan dinding dalam atau luar pada spora semua genus, tetapi reaksi warna yang khas tidak terjadi pada spora-spora yang tua, yang rusak, atau yang sudah disimpan dalam bahan pengawet. *Glomus* atau *Gigaspora* umumnya memiliki struktur yang lebih sederhana dari genus-genus lain, tetapi *Glomus* kerap mempunyai beberapa lapisan dinding. Spora *Glomus* yang belum dewasa memiliki reaksi warna Melzer yang lemah, dan tidak terjadi pada spora yang lebih tua. Spora *Glomus* yang muda kerap mempunyai lapisan dinding luar yang rapuh, dan hilang ketika spora menjadi tua. Berbagai lapisan dinding spora ini dapat dilihat pada Gambar 11.



Gambar 10. Pewarnaan Melzer pada bagian dalam dinding spora (Brundrett *et al.*, 1996)



Gambar 11. Berbagai lapisan dinding spora dan adanya tabung kecambah

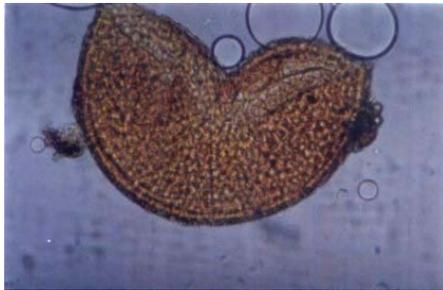
Tabel 1. Tipe dinding spora

Tipe dinding	Definisi	Dijumpai pada spesies
Satuan (unit)	Dinding yang kaku berlapis tunggal, dapat dibedakan dengan jelas dari dinding lain dan konsisten di antara spora-spora pada tingkat kema-tangan yang sama dalam satu spesies	<i>Glomus caledonium</i> <i>Gigaspora gigantea</i> <i>Acaulospora trapei</i> <i>Glomus geosporum</i>

Laminated	Dinding yang terbuat dari beberapa lapisan lepas ketika spora matang. Jumlah lapisan pada dinding semacam ini bertambah ketika spora menjadi tua.	<i>Gigaspora margarita</i> <i>Gigaspora gigantea</i> <i>Glomus etunicatum</i> <i>Glomus macrocarpum</i> <i>Glomus geosporum</i>
Evanescent	Dinding satuan atau berlapis yang pecah dan terlepas ketika spora matang	<i>Glomus gerdemanni</i> <i>Glomus albidum</i> <i>Glomus occultum</i> <i>Glomus etunicatum</i>
Membran	Dinding yang sangat tipis yang kerap berkerut dan hancur pada larutan hipertonik. Biasanya tidak kaku, karena itu biasanya tidak pecah ketika spora ditekan	<i>Acaulospora laevis</i> <i>Acaulospora spinosa</i> <i>Gigaspora pellucida</i> <i>Gigaspora calospora</i> <i>Gigaspora gilmorei</i> <i>Gigaspora heterogama</i> <i>Gigaspora reticulata</i>

Isi spora

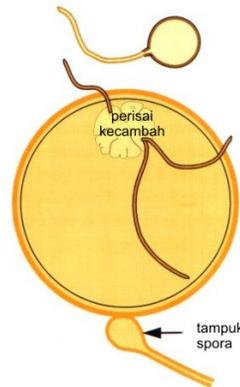
Spora mengandung lipid dan isi yang lain, yang bermacam-macam warnanya dan dapat berupa tetesan besar atau kecil (Gambar 12) atau butiran (granul). Ukuran atau susunan tetesan lipid dapat membantu identifikasi cendawan ini, tetapi berubah kalau spora menjadi tua. Spora cendawan Glomales kerap mengandung organisme parasit, terutama bila contoh tanah berasal dari lapang. Parasit ini menyebabkan terjadinya lubang pada dinding spora dan/atau perubahan sitoplasma (Lee & Koske, 1994).



Gambar 12. Tetesan lipid keluar ketika spora dipencet

Perkecambahannya spora

Mekanisme perkecambahan spora dapat juga dipakai untuk membedakan cendawan Glomales, terutama spesies *Scutellospora* mempunyai perisai (*shield*) kecambah (Gambar 13) dengan lipatan-lipatan yang kompleks pada dinding dalam. Ketika spora *Scutellospora* berkecambah, hifa muncul dengan perisai ini dari kompartemen dan kemudian tumbuh melalui dinding luar. Spora *Acaulospora* juga berkecambah dengan membentuk perisai, sedangkan spora *Gigaspora* membentuk semacam kutil (*warts*) di bagian dalam dinding spora.



Gambar 13. Skema tampuk spora dan perisai kecambah pada spora *Acaulospora* dan *Scutellospora* (Brundrett *et al.*, 1996)

Hifa tanah

Isolat-isolat cendawan Glomales mempunyai perbedaan yang besar dalam penampilan sistem miselium tanah, misalnya ketebalan dinding, pewarnaan, struktur yang berkaitan, dan sebagainya. Hanya sayang gambaran-gambaran seperti ini jarang diperhatikan pada studi taksonomi. *Scutellospora* memiliki hifa *melanized* yang sangat nyata, tetap berwarna coklat sesudah proses penjernihan dan pewarnaan, sedangkan hifa spesies Glomales berwarna hialin atau agak kurang berpigmen (kuning atau coklat). Cendawan Glomales menghasilkan hifa 'runner' yang menyebar dan kasar dan hifa absorpsi bercabang halus. Diameter hifa Glomales sangat bervariasi, mulai dari 5 μm sampai 20 μm , sedangkan *fine endophytes* berdiameter 2 μm atau kurang. Dinding hifa berbagai spesies *Glomus* sangat tebal dan berwarna sangat kuat.

Struktur yang berkaitan dengan hifa tanah

Vesikel tambahan yang disebut juga badan atau sel tambahan (*auxiliary bodies or cells*) merupakan struktur berkelompok yang dibentuk oleh hifa *Scutellospora* dan *Gigaspora* dalam tanah (Gambar 14). Vesikel tambahan ini dapat juga digunakan untuk mengidentifikasi spesies-spesies kedua genus ini. Hifa eksternal spesies dari *Glomus* dan *Acaulospora* sering juga membentuk 'vesikel' bulat dan kecil dalam tanah.



Gambar 14. *Auxiliary cell* dalam tanah (Brundrett *et al.*, 1996)

Pembuatan preparat dan pengamatan mikroskopi

- Ambil spora dengan pinset khusus atau pipet halus atau jarum preparat dan tempatkan spora pada gelas objek yang telah diberi larutan perekat PVLG dan tutup hati dengan gelas penutup mulai dari satu sisi ke arah sisi lain, sehingga terhindar adanya gelembung udara. Perlahan tekan gelas penutup sehingga gelembung udara yang masih ada keluar.
- Untuk melihat lapisan-lapisan dinding (terutama untuk spesies *Scutellospora* dan *Acaulospora* tempatkan juga spora pada objek gelas yang telah diberi larutan Melzer.
- Amati preparat tadi di bawah mikroskop binokuler dan catat ciri-ciri seperti diuraikan di atas dan tentukan genus/spesiesnya berdasarkan taksonomi di bawah.

Taksonomi

Kunci yang dipakai untuk mengidentifikasi genus pada cendawan MA adalah kunci takson pada Glomales dari Morton & Benny (1990) seperti ditunjukkan di bawah

Kunci takson pada Glomales

- | | |
|---|--|
| <p>A. Hanya arbuskel terbentuk pada akar bermikoriza.
'Azygospora' terbentuk pada apex sel sporogenous pada hifa fertil, membentuk sel tambahan (auxiliary cells)</p> | <p>GIGASPORINEAE
Gigasporaceae (B)</p> |
| <p>B. Tabung kecambah terbentuk langsung melalui dinding spora; kelompok dinding dalam yang fleksibel tidak ada; sel tambahan papillate atau <i>echinulate</i> halus</p> | <p><i>Gigaspora</i></p> |

- BB. Tabung kecambah terbentuk dari perisai kecambah; kelompok dinding dalam yang fleksibel selalu ada; sel tambahan knobby, broadly papillate, atau smooth *Scutellospora*
- AA. Arbuskel dan vesikel terbentuk pada akar bermikoriza; 'klamidospora' terbentuk secara terminal atau lateral pada atau dalam hifa fertil; sel tambahan tidak terbentuk GLOMINEAE (C)
- C. 'Klamidospora' terbentuk secara apikal dari hifa fertil Glomaceae (D)
- D. Tubuh buah suatu sporokarp terdiri dari spora-spora dengan dinding-dinding lateral adherent satu sama lain; hifa penghubung embedded dalam suatu plexus hifa sentral; klamidospora dalam suatu lapisan tunggal kecuali pada dasar (at the base); dasar terdiri dari hifa steril *Sclerocystis*
- DD. Struktur buah sporocarp tidak terbentuk seperti pada 'D' di atas; Spora juga terbentuk secara tunggal atau dalam agregat yang longgar sampai ketat dalam tanah, kurang umum dalam tanah *Glomus*
- CC. 'Klamidospora' terbentuk dari atau dalam 'leher' suatu sporiferous saccule ACAULO-SPORACEAE (E)
- E. Spora keluar secara lateral dari leher sporiferous saccule *Acaulospora*
- EE. Spora terbentuk dalam leher sporiferous saccule *Entrophospora*

DAFTAR PUSTAKA

- Brundrett, M., N. Bougher, B.Dell, T.Grove, & N.Malajczuk. 1996. Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture. ACIAR Monograph 32. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra.
- Clapp, J.P., J.P.W. Young, J. Merryweather, & A.H. Fitter. 1995. Diversity of fungal symbionts in arbuscular mycorrhizas from a natural community. *New Phytol.* 130: 259-265.
- Fisher, R. A. & F. Yates. 1963. Statistical tables for biological, agricultural and medical research. Oliver and Boyd. Edinburgh.
- [Http://invam.caf.wvu.edu/fungi/taxonomy/concepts/convtrad.htm](http://invam.caf.wvu.edu/fungi/taxonomy/concepts/convtrad.htm). Integration of conventional and developmental definitions of morphological characters. Diakses tanggal 24 Juni 2006.
- Gerdermann, J.W. & T.H. Nicolson. 1963. Spore of mycorrhizal Endogons species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 46: 235-244
- Jenkins, W.R. 1964. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant Dis. Rep.* 48: 692
- Koch, von H. & A. Moawad. 1977. Mineralstoffanalyse in Pflanzenmaterial und Mykorrhizainfektionsprüfung in Wurzeln. Institut für Tropischen und Subtropischen Pflanzenbau, Göttingen.

- Kormanik, P.P. & A.C. McGraw. 1982. Quantification of vesicular-arbuscular mycorrhizae in plant roots. p. 37-45. *In* N.C. Schenck (Ed.) *Methods and Principles of Mycorrhizal Research*. The American Phytopathological Society, St. Paul.
- Koske, R.E. & J.N. Gemma. 1989. A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. *Mycol. Res.* 92: 486-505.
- Lanfranco, L., P. Wyss, C. Marzaki, & P. Bonfante. 1995. Generation of RAPD-PCR primers for identification of isolates of *Glomus mosseae*, and arbuscular mycorrhizal fungus. *Mol. Ecol.* 4: 61-68.
- Lee, P.-J., & R.E. Koske. 1994. *Gigaspora gigantea*: parasitism of spores by fungi and actinomycetes. *Mycol. Res.* 98: 458-466.
- Morton, J.B. 1988. Taxonomy of VA mycorrhizal fungi classification, nomenclature, and identification. *Mycotaxon* 32: 267-324.
- Morton, J.B. & G.L. Benny. 1990. Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): a new order, Glomales, two new suborders, Glomineae and Gigasporineae, and two new families, Acaulosporaceae and Gigasporaceae, with an emendation of Glomaceae. *Mycotaxon* 37: 471-491.
- Porter, W.M. 1979. The "Most Probable Number" method for enumerating infective propagules of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in soil. *Aust. J. Soil. Res.* 17: 515-519.
- Sieverding, E. 1991. *Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Management in Tropical Ecosystems*. Technical Cooperation, Federal Republic of Germany, Eschborn.
- Simon, L., L. Lalonde, T. Bruns. 1992. Specific amplification of 18S ribosomal genes from vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 291-295.
- Simon, L., R.C. Lévesque, M. Lalonde. 1993. Identification of endomycorrhizal fungi colonizing roots by fluorescent single strand conformation polymorphism-polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 4211-4215.
- Walker, C. 1983. Taxonomic concepts in the Endogonaceae: spore wall characteristics in species descriptions. *Mycotaxon* 18: 443-455.
- Wyss, P. & P. Bonfante. 1993. Amplification of genomic DNA of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi by PCR using short arbitrary primers. *Mycol. Res.* 97: 1351-1357.
- Yoshida, D.D., D.A. Forno, J.H. Cock, & K.A. Gomez. 1976. *Laboratory Manual for Physiological Studies of Rice*. 3rd Edition. International Rice Research Institute, Los Baños.
- Zézé, A., M. Hosny, V. Gianinazzi-Pearson, & H. Dulieu. 1996. Characterization of a highly repeated DNA sequence (SCI) from the arbuscular mycorrhizal fungus *Scutellospora castanea* and its use as a diagnostic probe *in planta*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2443-2448.

BAKTERI SIDEROFOR

Edi Husen

Siderofor (*siderophore*) adalah senyawa pengompleks Fe^{3+} atau pengkhelat besi spesifik yang dihasilkan oleh beberapa jenis mikroba untuk menyembunyikan unsur besi di lingkungan rizosfir, sehingga tidak tersedia bagi perkembangan mikroba patogen. Kondisi ini umumnya terjadi pada tanah-tanah bereaksi netral sampai basis dimana kelarutan unsur Fe^{3+} rendah. Namun dalam beberapa kasus, pengkhelatan Fe^{3+} dari mineral Fe-P pada tanah-tanah masam pernah pula dilaporkan (Reid *et al.*, 1985; Mullen, 1998). Kemampuan mikroba menghasilkan siderofor berimplikasi pada pengendalian mikroba patogen.

Beberapa jenis rizobakteri telah diidentifikasi mampu menghasilkan siderofor seperti *Pseudomonas fluorescens* B10 yang memproduksi *yellow-green fluorescent siderophores* atau *pseudobactin* yang kemudian terbukti dapat menghambat perkembangan fungi patogen *Erwinia caratovora* penyebab busuk pada kentang (Subba-Rao, 1999). Beberapa laporan lain memaparkan kemampuan bakteri siderofor mengendalikan penyakit layu rebah yang disebabkan oleh cendawan *Pythium ultimum* dan busuk akar oleh cendawan *Fusarium oxysporum* (Kloepper, 1993). Hasil penelitian Bakker (2006) pada bakteri penghasil siderofor *Pseudomonas putida* WCS358 juga membuktikan bahwa bakteri ini menginduksi kekebalan sistemik tanaman *Arabidopsis thaliana* karena mampu menekan penyakit yang menyerang daun walaupun bakteri ini terdapat pada zona perakaran.

Pengujian kemampuan bakteri menghasilkan siderofor dikembangkan dari media miskin unsur Fe. Pencucian peralatan gelas dengan HCl untuk menghilangkan sisa-sisa Fe yang mungkin masih melekat pada gelas dan penggunaan air deionisasi atau akuades menjadi persyaratan penting dalam pengujian. Fuhrmann (1994) mengembangkan teknik *microbial lawn* pada media agar King's B yang defisien Fe untuk menguji reaksi antagonis bakteri penghasil siderofor potensial. Namun saat ini, media agar chrome azurol S (CAS) yang dikembangkan Schwyn & Neilands (1987) lebih populer dipakai karena kemudahan mendeteksi koloni bakteri penghasil siderofor yang berwarna kuning (oranye) yang sangat kontras dengan warna biru media kompleks CAS agar.

Dalam bab ini diuraikan metode pengujian bakteri penghasil siderofor menggunakan media agar kompleks Fe-CAS dari Schwyn & Neilands (1987) yang dimodifikasi oleh Alexander & Zuberer (1991).

2.8.1 Prinsip

Siderofor memiliki afinitas yang tinggi terhadap unsur Fe ($K_f > 10^{30}$). Bakteri penghasil siderofor mengikat unsur Fe di luar dinding sel dan selanjutnya Fe diangkut ke dalam membran sel melalui reseptor spesifik (Neiland, 1982). Media kompleks Fe-CAS menyediakan berbagai nutrisi bagi bakteri kecuali unsur Fe yang jumlahnya sangat terbatas dan terperangkap dalam media. Hanya bakteri penghasil siderofor yang mampu hidup dan berkembang biak pada media agar Fe-CAS karena siderofor dapat melepaskan dari media dan menyembunyikannya yang ditandai oleh koloni bakteri berwarna kuning (oranye) yang sangat kontras dengan warna biru media agar Fe-CAS agar.

2.8.2 Metode Pengujian

Bahan

- Suspensi sel bakteri (*potential siderophore producing bacteria*) yang akan diuji (dari tanah atau biakan murni)
- Cawan Petri
- Labu Erlenmeyer
- Beker gelas
- Pipet mikro

Semua peralatan gelas direndam dan dicuci dengan larutan 3M HCl atau yang lebih pekat untuk menghilangkan sisa-sisa unsur Fe yang mungkin masih melekat pada peralatan gelas, kemudian dibilas dengan akuades.

Bahan kimia dan larutan (media)

- Media Fe Chrome Azurol S (CAS = $C_{23}H_{13}C_{12}O_9SNa_3$) adalah campuran dari empat macam larutan (larutan I, II, III, dan IV) yang dibuat dan disterilisasi secara terpisah.
- Larutan I (larutan indikator Fe-CAS) → 100 ml
 - Campurkan 10 ml larutan 1 mM $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (dalam 10 mM HCl) dengan 50 ml larutan CAS ($1,21 \text{ mg ml}^{-1}$). Campuran ini menghasilkan warna ungu gelap. Sambil diaduk, secara perlahan campuran ini ditambahkan ke dalam 40 ml HDTMA (*hexadecyl-trimethylammonium bromide*) ($1,82 \text{ mg ml}^{-1}$). Campuran ketiga larutan ini menghasilkan warna biru gelap.
 - Autoklaf larutan selama 15 menit, kemudian dinginkan sampai suhu 50°C .
- Larutan II (larutan bufer + agar) → 800 ml

- Larutkan 30,24 g PIPES (*peperazine-N,N'-bis[2-ethanesulfonic acid]*) dengan 750 ml larutan garam yang mengandung 0,3 g KH_2PO_4 , 0,5 g NaCl, dan 1 g NH_4Cl . Atur pH 6,8 dengan KOH 50%, kemudian tambahkan 15 g agar. Cukupkan volume larutan sampai 800 ml dengan akuades.
- Autoklaf larutan selama 15 menit, kemudian dinginkan sampai suhu 50°C .
- Larutan III (larutan glukosa dan unsur mikro) \rightarrow 70 ml
 - Larutkan 2 g glukosa, 2 g manitol, dan unsur mikro (493 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 11 mg CaCl_2 ; 1,17 mg $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 1,4 mg H_3BO_3 ; 0,04 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 1,2 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; dan 1 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) dalam 70 ml akuades.
 - Autoklaf larutan selama 15 menit, kemudian dinginkan sampai suhu 50°C .
- Larutan IV (larutan asam cassamino 10%) \rightarrow 30 ml
 - Larutkan 3 g asam cassamino dalam 30 ml akuades (10%, berat volume), kemudian disterilisasi dengan saringan mikro (0,2 μm).

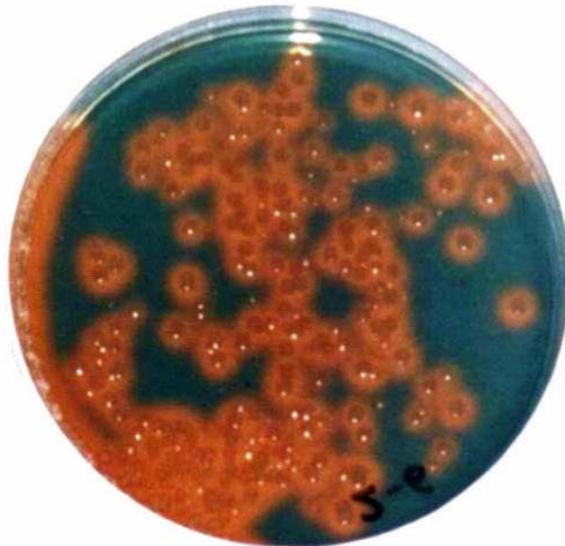
Prosedur

7) Pembuatan media Fe-CAS agar

- Pada suhu larutan sekitar 50°C , tambahkan larutan III dan IV ke dalam Larutan II (larutan bufer + agar). Larutan I (larutan indikator) ditambahkan terakhir dengan mengaduk secara perlahan sampai keempat larutan tercampur rata (hindari terbentuknya gelembung). Campuran ini menghasilkan media kompleks Fe-CAS yang berwarna biru sampai biru kehijauan.
- Tuang larutan kompleks Fe-CAS ke dalam cawan Petri (masing-masing 20 ml), kemudian diamkan sampai agar membeku.

8) Inokulasi dan inkubasi

- Inokulasi Fe-CAS agar dengan suspensi sel bakteri dengan metode gores atau sebar. Untuk metode sebar, gunakan sebanyak 50 μL suspensi sel bakteri dari beberapa tingkat pengenceran. Selanjutnya inkubasi cawan Petri pada suhu kamar.
- Setelah masa inkubasi (24 jam atau lebih), bakteri penghasil siderofor yang tumbuh ditandai oleh koloni berwarna kuning (oranye) yang kontras dengan warna biru media Fe-CAS agar seperti tampak pada Gambar 1.



Gambar 1. Koloni bakteri yang berwarna kuning (oranye) mengindikasikan kemampuan bakteri mensekresikan siderofor untuk melepaskan dan mengikat Fe dari kompleks Fe-CAS agar (Husen, 2002)

2.8.3 Ulasan

Beberapa hal yang perlu diperhatikan dalam analisis adalah: (i) semua reagen atau bahan kimia yang digunakan untuk membuat larutan indikator (larutan I) harus dibuat baru (*fresh*) untuk tiap *batch* agar dan (ii) penggunaan air akuabides (2 kali distilasi) untuk penyiapan media sering digunakan untuk menjamin keberhasilan analisis.

Media agar Fe-CAS dapat digunakan untuk keperluan isolasi bakteri siderofor dari sampel tanah, rizosfir, maupun dari akar tanaman.

DAFTAR PUSTAKA

- Alexander, D.B. & D.A. Zuberer, 1991. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biol. Fertil. Soils* 2: 39-45.
- Bakker, P.A.H.M., I. van der Sluis, B. Verhagen, M. de Jong, & L.C. van Loon. 2006. Determination of *Pseudomonas putida* WCS358 that are involved in induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. Auburn University Web Site, Available: <http://www.ag.auburn.edu/argentina/pdfmanuscripts/kloepper.pdf>. [Accessed 30 June 2006].
- Fuhrmann, J.J. 1994. Isolation of Microorganisms Producing Antibiotics. p. 379-405. *In* R.W. Weaver, S. Angle, P. Bottomley, D. Bezdicek, S. Smith, A. Tabatabai, and A. Wollum (Eds.) *Methods of Soil Analysis (Microbiological and Biochemical Properties)*. SSSA. Wisconsin, USA.
- Husen, E. 2002. Growth Enhancement of Hot Pepper (*Capsicum annuum* L.) by Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR). Master Thesis (Soil Science). University of The Philippines at Los Banos. Philippines.
- Kloepper, J.W. 1993. Plant growth promoting rhizobacteria as biological control agents. p. 255-274. *In* F.B. Meeting, Jr. (Ed.) *Soil Microbial Ecology, Applications in Agricultural and Environmental Management*. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Mullen, M.D. 1998. Transformation of other elements. p 369-386. *In* D.M. Silvia, J.J. Fuhrmann, P.G. Hartel, D.A Zuberer (Eds.) *Principles and Application of Soil Microbiology*. Prentice Hall. New Jersey.
- Neilands, J.B. 1982. Microbial envelope proteins related to iron. *Annu Rev. Microbiol* 36: 285-309
- Reid, R. K., C.P.P. Reid, & P.J. Szaniszló. 1985. Effect of synthetic and microbially produced chelates on the diffusion of iron and phosphorus to a simulated root in soil. *Biol. Fertil. Soils* 1:45-52.
- Schwyn, B & J.B. Neilands. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem* 160: 47-56
- Subba-Rao, N.S. 1999. *Soil Microbiology (4th Edition of Soil Microorganisms and Plant Growth)*. Science Publishers, Inc. USA.

MIKROBA PEROMBAK BAHAN ORGANIK

Rosmimik & Erny Yuniarti

Mikroba perombak bahan organik adalah kelompok mikroba yang berperan mempercepat proses perombakan (dekomposisi) bahan organik yang umumnya terdiri atas senyawa selulosa dan lignin yang dikenal dengan nama lignoselulosa. Dalam proses perombakan bahan organik, mikroba yang berperan sebagai perombak dapat berasal dari kelompok bakteri, cendawan dan aktinomisetes yang akan bekerja secara sinergis dalam menghasilkan produk akhir berupa humus yang stabil (N, P, K, Ca, Mg, dan lain-lain). Mikroba dari kelompok cendawan mempunyai kemampuan yang lebih besar dalam merombak bahan organik dibandingkan dengan kelompok bakteri dan aktinomiset. Kelompok bakteri atau cendawan yang berperan dalam merombak selulosa lebih dikenal dengan nama mikroba selulolitik dan ligninolitik untuk kelompok bakteri atau cendawan yang berperan dalam merombak lignosa.

Bakteri penghasil lignoselulase yang dapat merombak limbah lignoselulosa diantaranya, *Mycobacteriales*, *Actinomycetales*, dan *Eubacteriales* dan anggota *Clostridium*. Berbagai jenis cendawan yang telah diteliti menghasilkan enzim selulase antara lain *A. terreus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *Eupenicillium javanicum*, *Fusarium solani*, *Myrothecium verrucaria*, *Neurospora sitophilla*, *P. funiculosum*, *Chaetomium* spp., *P. iriensis*, *P. vereculosum*, *Phanerachaete chrysosporium*, *Polyporus adustus*, *Pellicularia filamentosa*, *Trichoderma reesei*, *T. harzianum*, *T. purpurogenum*, *T. koningi* (Enari, 1983). Cendawan-cendawan tersebut diisolasi dari tanah, sampah dan kayu lapuk menghasilkan enzim ekstraseluler selulolitik yang terdiri atas enzim endoglukanase, exoglukanase dan B-glukosidase. Dalam proses perombakan bahan organik, enzim selulolitik bekerja secara sinergis dengan tiga kelompok enzim tersebut. Cendawan putih pembusuk (*Phanerachaete chrysosporium*, *Coriolus versicolor* dan *Phlebia radiata*) yang diisolasi dari jerami padi menghasilkan ekstra seluler ligninolitik. Enzim ini mengandung lignin peroksidase (Lip), peroksidase Mn bebas (MnP) dan beberapa tipe lakase. Enzim ligninolitik ini dapat memutuskan ikatan lignin.

2.9.1 Prinsip

Mikroba pendegradasi bahan organik, bakteri dan cendawan selulolitik diisolasi dengan media agar selektif CMC (*carboxymethyl cellulose*), dan cendawan ligninolitik dengan media agar selektif lignin-

benomyl-guaiacol. Aktivitas mikroba selulolitik pada media agar CMC ditunjukkan dengan adanya warna jernih tepat di sekitar koloni setelah diwarnai merah kongo 1% dan aktivitas ligninolitik pada media agar lignin-benomyl ditunjukkan dengan adanya warna merah tepat di bawah dan sekitar koloni akibat quinon produk oksidasi guaiacol.

2.9.2 Isolasi Mikroba Selulolitik (Coronel & Joson, 1986)

Alat

- Labu Enlemeyer
- Cawan Petri
- Tabung reaksi
- Pipet mikro
- Inkubator dengan mesin pengocok

Bahan

- Contoh kayu lapuk, tanah, sampah
- Larutan pengencer
 - Masukkan 45 ml dan 9 ml akuades ke dalam botol-botol pengencer lalu sterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 0,1 Mpa selama 15 menit.
- Medium basal selulolitik
 - Larutkan 1 g KH_2PO_4 ; 0,5 g K_2SO_4 ; 0,5 g NaCl; 0,5 g FeSO_4 ; 1 g NH_4NO_3 ; 0,01 g MnSO_4 ; CMC 200 ml (10 g dalam 200 ml akuades); dan 20 g agar, lalu tepatkan 1 L dengan akuades. Autoklaf pada suhu 121°C pada 0,1 Mpa selama 15 menit, lalu setelah hangat kuku tuangkan ke dalam cawan Petri.
- Merah kongo 1 % (1 g merah kongo dalam 100 ml akuades)
 - Larutkan 1 g merah kongo dalam 100 ml akuades.
- NaOH 1%
 - Larutkan 1 g NaOH dalam 100 ml akuades.
- Potato dextrose agar (PDA)

Prosedur

- Masukkan 5 g contoh ke dalam 45 ml akuades steril lalu inkubasi selama 30 menit pada inkubator goyang dengan kecepatan 150 rpm.
- Buat seri pengenceran hingga 10^{-8} .
- Pipet 100 μl suspensi contoh dari masing-masing tingkat pengenceran, lalu inokulasikan dalam medium agar basal selulolitik dengan metode cawan sebar, inkubasi 3-5 hari di suhu kamar. Adanya mikroba selulolitik ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening di sekeliling isolat setelah diberi pewarna merah kongo 1%.

Pemurniaan mikroba selulolitik

- Pindahkan koloni mikroba selulolitik yang sudah tumbuh pada medium basal selulolitik ke medium selulolitik yang baru.
- Inkubasi selama 3–5 hari pada suhu kamar, lakukan pengamatan sampai diperoleh koloni tunggal.
- Simpan di dalam agar miring PDA untuk cendawan selulolitik koloni tunggal dan media Luria Bertani (LB) untuk bakteri selulolitik koloni tunggal. Selain itu bisa juga disimpan dalam agar miring yang berisikan media basal selulolitik.

2.9.3 Isolasi Mikroba Ligninolitik (Thorn *et al.*, 1996)

Alat

- Lihat 2.9.2

Bahan

- Medium basal ligninolitik
 - Larutkan 0,5 g KH_2PO_4 ; 0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1 g NH_4NO_3 ; 0,1 g KCl; 0,02 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,05 g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 2 g malt ekstrak, dan 15 g agar dalam 1 L akuades. Autoklaf medium basal bersama batang pengocok magnetik dalam Erlenmeyer, lalu ketika suhu media $\pm 55^\circ\text{C}$, tambahkan bahan-bahan sebagai berikut: 5 ml larutan KOH 1 M; 0,4 ml guaiakol; 1 g indulin AT (alkali lignin) yang disiapkan dengan cara melarutkan dalam 10 ml dioksan; 60 mg antibiotik *Clortetracycline*-HCl; 30 mg streptomisin sulfat; 30 mg penisilin G; dan 4 mg benomil (seperti benlate 50 WP), lalu kocok dan tuang ke dalam cawan Petri.
- Larutan Diazodium Blue B (DBB) 1 mg ml^{-1}
 - Larutkan 10 mg DBB dalam 10 ml bufer Tris HCl 0,1 M pH 7, dingin.

Prosedur

- Sebanyak 5 g berat basah (2,5 – 4,5 g berat kering) contoh tanah dimasukkan ke dalam 500 ml natrium pirofosfat 0,1% (w/v) steril dalam botol Mason 1 L.
- Kocok pada inkubator pengoyang selama 1 jam dengan suhu 4°C untuk mendispersikan gumpalan tanah dan koloid.
- Suspensi tanah disaring menggunakan saringan bertingkat No. 60 ($250 \mu\text{m}$) dan No. 270 ($53 \mu\text{m}$) dan cuci dengan air mengalir dingin secara singkat.
- Partikel yang tertinggal pada saringan mesh $53 \mu\text{m}$ dicuci dengan akuades selama 5 menit.

- Satu ml suspensi partikel organik diencerkan dalam air steril sampai 10^2 dan sebanyak 0,4 ml dari pengenceran tersebut disebar pada medium agar lignin-guaiacol-benomil, lalu inkubasi pada suhu ruang selama 2 minggu.
- Seujung kecil jarum, partikel pada saringan mesh 53 diinokulasi ke dalam medium agar isolasi lignin-benomil-guaiacol.
- Inkubasi pada posisi terbalik selama 1-2 minggu pada suhu ruang. Amati setiap melihat adanya koloni yang membentuk warna merah, warna merah disebabkan aktivitas lakase atau peroksidase.
- Amati koloni yang timbul dengan mikroskop untuk melihat adanya konidia dan *clump connections* sebagai ciri dari basidiomisetes.
- Tumbuhkan kultur dalam 75 ml medium cair malt ekstrak, pH 6 dalam Erlenmeyer 125 ml, inkubasi pada penggoyang 100 rpm dan suhu ruang, dan selanjutnya panen ketika berumur 2 minggu. Miselium kultur dicuci dengan akuades, lalu ditaruh dalam gelas bening dan langsung warnai dengan larutan DBB. Reaksi positif, yaitu terbentuk warna merah sampai ungu setelah 15 - 60 detik penambahan DBB.

Pemurnian koloni cendawan ligninolitik

- Pindahkan koloni cendawan ligninolitik ke media agar malt ekstrak yang mengandung antibiotik.
- Inkubasi pada suhu ruang selama 5-7 hari, lalu pindahkan satu koloni ke medium agar agar miring malt ekstrak, lalu inkubasi lagi.
- Terhadap biakan murni lakukan pengamatan mikroskop untuk melihat adanya konidia dan *clump connection*.

DAFTAR PUSTAKA

- Coronel, L.M. & L.M. Josen. 1986. Isolation, screening and characterization of cellulose utilizing bacteria. *Philip. J. Sci.* 2: 223-226.
- Enari, T.M. 1983. Microbial cellulase. p. 183 – 223. *In* W.M. Fogarty (Ed.) *Microbial Enzymes and Biotechnology*. Appl. Sci Interscience Publisher, New York.
- Thorn, R.G, C.A. Reddy, D. Harris, & E.A. Paul. 1996. Isolation of saprophytic Basidiomisetes from soil. *Applied and Enviromental Microbiology* 62: 4288-4292.

MIKROBA PENDEGRADASI POLUTAN

Erny Yuniarti & Rohani Cinta Badia Ginting

Kemajuan industri telah menciptakan sebagian besar senyawa toksik ke lingkungan dan menyebabkan pencemaran luas pada tanah dan air. Herbisida, insektisida, dan pupuk kimia sintetik yang digunakan dalam aktivitas pertanian, serta bahan kimia sintetik lainnya seperti bahan sisa pembuatan plastik, pewarna, pigmen, pelarut, obat-obatan, senyawa hidraulik, retradan api, senyawa-senyawa berhalogen yang dihasilkan melalui aktivitas industri, secara sengaja atau tidak sengaja dilepaskan ke lingkungan dan mengubah proses-proses dan kondisi (ekosistem) lingkungan sehingga menciptakan situs pencemaran. Pencemaran membahayakan flora dan fauna karena dapat terjadi akumulasi senyawa toksik pada rantai makanan dan menimbulkan berbagai masalah kesehatan akut dan kronis pada manusia.

Bahan-bahan polutan umumnya adalah senyawa xenobiotik dari produk industri kimia sintetik dengan komponen-komponen struktural tidak alamiah yang merupakan kimia anthropogenik. Xenobiotik mempunyai ciri heteroatom (yaitu oksigen, nitrogen, sulfur) dalam kerangka karbon, substituen halogen, bercabang, atau struktur polimerik. Struktur xenobiotik memiliki ciri kombinasi elemen struktural yang diperoleh melalui proses anthropogenik. Senyawa-senyawa xenobiotik bersifat rekalsitran atau resisten terhadap biodegradasi seperti yang ditunjukkan oleh senyawa alamiah seperti lignin dan asam humat (Hickey, 1998) dan beberapa komponen minyak bumi (Jain *et al.*, 2005).

Minyak bumi merupakan campuran kompleks berbagai senyawa, yang dapat dibagi menjadi empat kelompok utama yaitu 1) alkana; 2) senyawa aromatik; 3) resin; dan 4) asphaltena. Fraksi alkana paling mudah didegradasi secara biologis, sementara fraksi polar (yaitu resin dan asphaltena) resisten terhadap degradasi biologis. Senyawa-senyawa aromatik, terutama PAH (*polycyclic aromatic hydrocarbons*) memiliki sifat dapat didegradasi pada tingkat pertengahan tetapi perlu mendapat perhatian karena toksisitasnya dan kecenderungannya berakumulasi secara biologis. Mikroba merupakan pendaur ulang alamiah yang mampu mengubah senyawa organik toksik menjadi produk yang tak berbahaya, yang umumnya berbentuk CO₂ dan air (Jain *et al.*, 2005). Beberapa mikroba pendegradasi hidrokarbon ditampilkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Berbagai mikroba pendegradasi polutan hidrokarbon

Senyawa hidrokarbon	Mikroba pendegradasi
Nitroaromatik (pelarut, prekursor derivat amino aromatik, sintesis pewarna, obat-obatan, pestisida (paration, metil paration, dinoseba, dinitrokresol, nitrofena, bahan-bahan ekflosif seperti TNT, RDX, dan HMX)	Kelompok <i>Pseudomonas</i> , <i>Nocardia</i> , dan <i>Arthrobacter</i>
Aliphatik (hidrokarbon petroleum)	Spesies-spesies bakteri <i>Acinetobacter</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Alcaligenes</i> , <i>Burkholderia</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Bacillus</i> dll
Sikloalkana	<i>Pseudomonas citronellolis</i> , <i>Brevibacterium erythrogenes</i> , dan <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Aromatik	<i>Pseudomonas</i> , <i>Ralstonia</i> , <i>Burkholderia</i> , <i>Sphingomonas</i> , <i>Flavobacterium</i> dan <i>Bacillus</i>
PAH (hidrokarbon aromatik polisiklik)	Bakteri <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> , <i>Alcaligenes denitrificans</i> , <i>Mycobacterium</i> sp., <i>Pseudomonas putida</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>P. versicularis</i> , <i>P. cepacia</i> , <i>P. paucimobilis</i> , <i>Rhodococcus</i> sp., <i>Corynebacterium renale</i> , <i>Moraxella</i> sp., <i>Bacillus cereus</i> , <i>Beijerinckia</i> sp., <i>Micrococcus</i> sp., dan <i>Sphingomonas</i> sp Fungi <i>Phanerochaete sordida</i>
Aliphatik berunsur halogen (asam haloalkanoat, haloalkana, trikloroetana, dan etilena dibromida)	<i>Pseudomonas</i> , <i>Alcaligenes</i>
Aromatik berklor (asam benzoat, asam salisilat, asam fenoksiasetat, dan dibenzifurana, Pentaklorofenol (PCP)	<i>Klebsiella pneumonia</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Pseudomonas mendocina</i> , <i>Pseudomonas cichhori</i> dan <i>Pseudomonas</i>

Sumber: Jain *et al.* (2005)

Dalam tulisan ini hanya menjelaskan isolasi dan enumerasi mikroba pendegradasi polutan hidrokarbon polisiklik aromatik yang merupakan komponen minyak bumi.

2.10.1 Prinsip

Mikroba pendegradasi polutan diisolasi dengan media pengkayaan berupa medium garam minimal yang disuplementasi dengan sumber C jenis poli hidrokarbon aromatik (PAH) atau senyawa xenobiotik tertentu sebagai substrat selektif. Medium pengkayaan berguna untuk mengaktifkan mikroba yang berada dalam lingkungan dengan kondisi stres. Seleksi isolat-isolat pendegradasi hidrokarbon dilakukan dengan cawan semprot (*spray plate*). Biakan dari media pengkayaan digores kuadran pada media garam minimal dan setelah itu disemprot sumber C berupa PAH tertentu dalam larutan eter. Pendegradasi PAH akan menunjukkan zona jernih sekitar koloni. Kelimpahan bakteri pendegradasi hidrokarbon dihitung dengan prosedur MPN pada cawan mikrotiter 96 sumur/lubang. Untuk perlakuan mikroba pendegradasi PAH, sumur/lubang positif akan berubah warna menjadi kuning atau coklat yang disebabkan akumulasi produk oksidasi sebagian substrat aromatik. Untuk perlakuan mikroba pendegradasi alkana dan total hidrokarbon, Iodonitrotetrazolium violet (INT) digunakan untuk mengidentifikasi sumur/lubang positif. Setelah inkubasi selama 2 minggu, 50 pL INT (3 g L^{-1}) ditambahkan ke dalam masing-masing sumur/lubang kedua cawan. Dalam sumur/lubang positif, INT direduksi menjadi formazan tak larut yang terdeposit secara intraselular sebagai presipitat berwarna merah. Sumur/lubang positif diberi skor setelah inkubasi dengan INT semalam pada suhu ruang.

2.10.2 Isolasi dan Seleksi Bakteri Pendegradasi PAH (Supuka *et al.*, 2001)

Alat

- Inkubator dengan pengocok
- Pipet mikro (1 ml, 200 μl) dan tip
- Desikator vakum
- Sprayer

Bahan

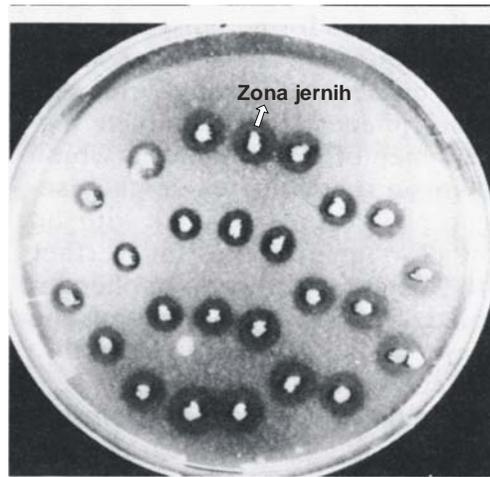
- Medium minimal bebas karbon (*carbon free medium minimal*, CFMM)
 - Larutkan secara berurutan 3,0 g NH_4NO_3 ; 2,2 g Na_2HPO_4 ; 0,8 g KH_2PO_4 ; 0,01 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,005 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,005 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dengan akuades 1.000 ml. Sesuaikan pH larutan menjadi pH 7,5 dengan menambah NaOH 0,1 N, lalu tambahkan

- 15 g agar. Sterilisasi medium pada suhu 121°C, tekanan 0,1 MPa selama 20 menit. Dinginkan medium lalu tambahkan substrat PAH dengan konsentrasi akhir 100 mg L⁻¹.
- Larutan stok PAH (fenantrena, antrakena, fluorena, atau dibenzotiofena) sebagai sumber karbon dan energi.
 - Larutkan masing-masing PAH dengan dimetil sulfoksida (DMSO), lalu sterilisasi menggunakan penyaring mikro (Millipore 0.22 µm)
 - Luria Bertani (LB) broth
 - Larutkan 10 g tripton, 5 g ekstrak khamir, dan 5 g NaCl dengan akuades 1.000 ml. Sesuaikan pH larutan menjadi pH 7,2. Sterilisasi medium pada suhu 121°C, 0,1 MPa selama 15 menit.
 - Luria Agar (LA)
 - Tambahkan 15 g agar dengan 1.000 ml larutan LB, lalu sterilisasi pada suhu 121°C, tekanan 0,1 MPa selama 15 menit.
 - Fenantrena steril
 - Sterilisasi fenantrena padat dengan mengkristalkannya kembali dari campuran air dan etanol, lalu kumpulkan secara aseptik dengan filtrasi dan pengeringan dalam desikator vakum.
 - Membran filter (*millipore*) 0,22 µm

Prosedur

- Kumpulkan contoh tanah dari berbagai situs terkontaminasi minyak dan simpan pada suhu 4°C sampai digunakan.
- Buat biakan pengkayaan dengan melarutkan 20 g tanah basah dengan 100 ml medium pengkayaan CFMM dan diinkubasi di dalam inkubator pada kecepatan 200 rpm, suhu 30°C selama semalam.
- Subkultur berturut-turut tiga kali dengan mencampur 5 ml suspensi dengan 45 ml media CFMM segar yang mengandung PAH (misalnya fenantrena) dan inkubasi pada kondisi yang sama. Isolasi bakteri pendegradasi fenantrena dari biakan pengkayaan dengan teknik cawan semprot atau *spray-plate* (Kiyohara *et al.*, 1982).
- Inokulasi sebanyak 1 lup biakan pengkayaan dengan digores kuadran ke medium agar LA tanpa fenantrena untuk mendapatkan koloni murni. Inkubasi media LA yang telah diinokulasi pada suhu 30°C sampai muncul koloni bakteri.
- Inokulasi koloni tunggal yang berbeda ke dalam media LB, lalu inkubasi selama semalam pada suhu ruang dan disimpan pada suhu 4°C.
- Totolkan dengan tusuk gigi steril kira-kira sebanyak 10³ pada media CFMM tanpa fenantrena. Kemudian dengan segera semprot seluruh permukaan media agar secara merata dengan fenantrena 10% (dalam eter). Eter dengan segera akan terevaporasi dari permukaan media pada suhu ruang, dan lapisan tipis fenantrena yang berwarna putih tertinggal pada permukaan agar.

- Inkubasi media agar CFMM yang telah diinokulasi dan disemprot fenantrena 10% pada suhu ruang.
- Bakteri pendegradasi fenantrena ditunjukkan oleh zona jernih di sekitar koloni (Gambar 1). Prosedur yang sama dapat digunakan untuk pertumbuhan bakteri pendegradasi hidrokarbon lainnya.



Gambar 1. Bakteri pendegradasi fenantrena ditunjukkan oleh zona jernih (Kiyohara *et al.*, 1982).

2.10.2 Enumerasi bakteri pendegradasi alkana dan PAH (Wrenn & Vennosa, 1996)

Alat

- Inkubator dengan pengocok
- Pipet mikro (1 ml, 200 μ m) dan tip
- Cawan mikrotiter 96 sumur/lubang

Bahan

- Naftalena
- n-pentadekana
- Substrat pertumbuhan selektif untuk mendegradasi alkana (n-heksadekana) atau total hidrokarbon (dua jenis minyak bahan bakar) yang disterilisasi dengan filtrasi (0,22 μ m)

- Substrat pertumbuhan selektif untuk mendegradasi PAH (campuran PAH yang terdiri atas 10 g fenantrena, 1 g antrakena, 1 g fluorena, dan 1 g dibenzotiofena yang dilarutkan dalam satu L pentana)
- n-oktadekana
- Pristana
- Iodonitrotetrazolium violet (INT) yang disterilisasi menggunakan membran filter
- Larutan NaCl 2%
- Medium Bushnell-Haas (Difco Products, Detroit, Mich)
- Bufer natrium pirofosfat 0,1%, pH 7,5

Prosedur

9) Persiapan medium dan substrat

- Siapkan medium Bushnell Haas dengan menggunakan suplemen 2% NaCl sebagai medium pertumbuhan untuk ketiga hidrokarbon dan berikan sebanyak 180 pl (piko liter) per sumur/lubang.
- Untuk mendegradasi hidrokarbon yang berbeda, gunakan substrat selektif yang berbeda pula. Substrat pertumbuhan selektif untuk mendegradasi alkana, PAH, dan total hidrokarbon berturut-turut adalah n-heksadekana, campuran PAH (10 g fenantrena, 1 g antrakena, 1 g fluorena, dan 1 g dibenzotiofena per L pentana), dan dua minyak bahan bakar (F2).
- Masukkan segera campuran substrat PAH ke dalam masing-masing sumur/lubang dalam cawan mikrotiter sebanyak 10 pl/sumur, karena pentana menguap dengan cepat maka campuran PAH terdeposit pada permukaan sumur/lubang dan penambahan ini dilakukan sebelum sumur/lubang diisi medium pertumbuhan.
- Tambahkan substrat selektif heksadekana dan F2 (5 pl/sumur/lubang) ke dalam cawan pendegradasi alkana dan pendegradasi hidrokarbon sebelum sumur/lubang diisi dengan medium pertumbuhan dan sebelum inokulasi.

10) Pengenceran, inokulasi suspensi contoh, pengamatan

- Larutkan sebanyak 10 g contoh tanah dengan 90 ml larutan bufer natrium pirofosfat dan lakukan serial pengenceran sampai 10^{-10} .
- Inokulasikan sebanyak 20 pl dari masing-masing pengenceran ke dalam sumur/lubang pada satu baris sebanyak delapan ulangan. Inokulasi pengenceran 10^{-10} ke dalam baris 11, pengenceran 10^{-9} ke dalam baris 10 dan seterusnya. Baris pertama diinokulasi dengan contoh yang tidak diencerkan dan baris 12 tidak diinokulasi (kontrol steril).
- Inokulasi masing-masing pendegradasi PAH, alkana, dan total hidrokarbon ke dalam cawan mikrotiter yang berbeda.

- Inkubasi selama 2 minggu untuk perlakuan isolasi mikroba pendegradasi PAH dan alkana, dan selama 3 minggu untuk isolasi mikroba total pendegradasi hidrokarbon pada suhu ruang.
- Pada perlakuan pendegradasi PAH, sumur/lubang positif akan berubah warna menjadi kuning atau coklat yang disebabkan akumulasi produk oksidasi sebagian substrat aromatik.
- Gunakan Iodonitrotetrazolium violet (INT) untuk mengidentifikasi sumur/lubang positif pada perlakuan mikroba pendegradasi alkana dan total hidrokarbon. Setelah inkubasi selama 2 minggu, tambahkan 50 pL INT (3 g L^{-1}) ke dalam masing-masing sumur/lubang kedua cawan. Dalam sumur/lubang positif, INT direduksi menjadi formazan tak larut yang terdeposit secara intraselular sebagai presipitat berwarna merah. Beri skor positif setelah inkubasi dengan INT semalam pada suhu ruang.
- Gunakan program komputer untuk menghitung MPN masing-masing katagori pendegradasi hidrokarbon. Koreksi bias positif jumlah yang dilaporkan yang merupakan karakteristik table MPN.

2.10.3 Ulasan

Media seleksi bakteri pendegradasi fenantrena selain dengan media agar garam minimal juga dapat dilakukan dengan menggunakan media nutrien agar (Kiyohara *et al.*, 1982).

DAFTAR PUSTAKA

- Hickey W.J. 1998. Biochemistry and metabolism of Xenobiotic Chemicals. p. 447-468. *In* D.M. Sylvia, J.J. Furhmann, P.G. Hartel, and D.A. Zuberer (Eds.) Principles and Application of Soil Microbiology. Prentice Hall. New Jersey.
- Jain R.K., M. Kapur, S. Labana, B. Lal, P.M. Sarma, D. Bhattacharya, & S. Thakur. 2005. Microbial diversity: Application of microorganism for biodegradation of xenobiotics. *Current Science* 89: 101-112.
- Kiyohara, H., K. Nagao, & K. Yana. 1982. Rapid screen for bacteria degrading water insoluble, solid hydracarbons on agar plates. *Appl Environ Microbiol* 43: 454-457.
- Supuka N., P. Pinphanichakarna, K. Pattaragulwanita, S. Thaniyavarna, T. Omorib, & K. Juntongjina. 2001. Isolation and characterization of a fenantrenae-degrading *Sphingomonas* sp. strain P2 and its ability to degrade Fluoranthen and pyrene via cometabolism. *Science Asia* 27: 21-28.
- Wrenn, B. A. & A.D. Vennosa. 1996. Selective enumeration of aromatic and aliphatic hydrocarbon degrading bacteria by a most-probable-number procedure: *Canadian Journal of Microbiology* 42: 252-258.

MIKROBA PENGAKUMULASI LOGAM BERAT

Rasti Saraswati & Erny Yuniarti

Penggunaan pestisida, pupuk fosfat dalam kegiatan pertanian serta pembuangan limbah industri, emisi asap kendaraan bermotor dan bahan bakar minyak bumi menyebabkan kontaminasi logam berat pada tanah dan perairan. Beberapa logam berat esensial sebagai unsur mikro, namun pada konsentrasi tinggi toksik bagi organisme dengan membentuk senyawa kompleks dalam sel.

Mikroba pada habitat situs terkontaminasi logam berat mengembangkan beberapa mekanisme toleransi terhadap logam berat, yaitu dengan cara *efflux*, kompleksasi atau reduksi logam berat atau menggunakan logam berat sebagai penerima terakhir elektron pada respirasi anaerob. Mekanisme toleransi terhadap logam seperti tembaga, seng, arsenik, kromium, kadmium, and nikel telah diidentifikasi dan digambarkan dengan detail. Sebagian besar mekanisme toleransi mikroba terhadap logam adalah dengan cara *efflux* metal ke luar sel (Spain, 2003).

Mekanisme toleransi mikroba terhadap logam berat dengan cara kompleksasi meliputi produksi polisakarida ekstraselular yang memiliki sifat-sifat anion yang berfungsi sebagai bioakumulator yang efisien, produksi metabolit organik yang memiliki sifat pengkelat dan membentuk kompleks dengan logam (*Aspergillus niger*, *Penicillium spinulosum* dan *Verticillium psalliotae*), presipitasi, serta kristalisasi ekstraselular oleh bakteri pereduksi sulfat sehingga membentuk deposit sulfida yang kaya akan logam, dan pembentukan metalothionin (protein kaya sistein dalam sel dapat mengikat logam) yang berfungsi untuk detoksifikasi, penyimpanan, dan regulasi ion logam dalam sel (Gadd, 1990).

Mikroba yang toleran logam berat dengan mekanisme selain *efflux* disebut sebagai mikroba pengakumulasi logam berat. Bakteri ini dapat dimanfaatkan untuk mengatasi pencemaran lingkungan yang disebabkan oleh logam berat. Bakteri, kapang, ganggang, dan ragi mampu mengakumulasi logam berat Ag, Au, Cd, Co, Cu, Fe, Ni, U, Zn (Gadd & White, 1993; Dave, 1994). *Pseudomonas*, *Thiobacillus*, *Bacillus*, dan bakteri penambat N₂ dilaporkan mampu mengakumulasi logam berat (Mullen, 1989). Di dalam tanah, sel-sel mikroba baik mati maupun hidup dan produknya dapat merupakan bioakumulator logam berat yang sangat efisien.

Dalam subbab ini diuraikan teknik isolasi dan uji kemampuan mikroba pengakumulasi logam berat.

2.11.1 Prinsip

Isolat-isolat bakteri mikroba pengakumulasi logam berat (MPLB) diisolasi dari situs-situs terkontaminasi logam berat dengan metode Puple *et al.* (1995). Suspensi contoh diinokulasikan pada media PEG (pepton glukosa – ekstrak ragi) dan setelah waktu inkubasi tertentu pada suhu ruang dilapisi dengan medium nutrient agar (NA) yang mengandung logam tertentu dengan berbagai konsentrasi. Koloni yang tumbuh diberi gas H₂S dalam desikator. Koloni mikroba pengakumulasi logam berat adalah koloni yang berwarna hitam. Warna hitam disebabkan terbentuknya senyawa logam sulfur yang berwarna hitam. Kemampuan MPLB mengakumulasi logam diujikan kembali pada media cair PEG yang mengandung logam tertentu dengan konsentrasi terukur. Pengurangan logam dalam supernatan dianalisis dengan AAS (*atomic absorption spectrophotometer*) pada panjang gelombang 248,5 nm.

2.11.2 Isolasi dan Seleksi Mikroba Pengakumulasi Logam Berat (Pumpel *et al.*, 1995)

Alat

- Botol gelap bertutup
- Wadah larutan stok logam berat
- Cawan Petri
- Neraca analitik
- Autoklaf
- Microwave
- Labu Erlenmeyer 250 ml
- Pipet mikro
- Tips
- Eppendorf
- AAS
- Desikator

Bahan

- Filter mikro 0,22 µm
- H₂S
- Media PEG (pepton glukosa – ekstrak ragi)

- Larutkan 4 g pepton, 2 g glukosa, 1 g ekstrak ragi, dan 15 g bakto agar dalam 1.000 ml akuades. Sterilisasi media dengan autoklaf pada suhu 121°C, 0,1 MPa, selama 15 menit.
- Media nutrient agar (NA)
- Larutan stok AgNO₃ 1.000 ppm
- Larutan stok Pb(NO₃)₂ 1.000 ppm
- Larutan stok Cd(NO₃) 1.000 ppm
- Larutan stok Cu(NO₃) 1.000 ppm
- Larutan stok MnSO₄.7H₂O 1.000 ppm
- Larutan stok FeSO₄.7H₂O 1.000 ppm
- Larutan stok ZnSO₄.7H₂O 1.000 ppm
- Larutan stok Co(NO₃) 1.000 ppm

Sterilisasi larutan logam dengan cara filtrasi menggunakan filter mikro 0,22 µm.

Prosedur

11) Isolasi

- Encerkan 10 g contoh tanah dengan larutan glukosa 0,1% lalu inkubasi pada inkubator goyang selama ± 2 jam, kemudian lakukan seri pengenceran hingga 1.000 kali.
- Inokulasi masing-masing hasil pengenceran sebanyak 100 µl ke dalam medium agar cawan pepton glukosa – ekstrak ragi (PGE) dengan metode cawan sebar lalu inkubasi pada suhu 30°C, RH 60 % diruang gelap selama 2-3 hari.
- Remajakan koloni yang tumbuh pada media agar PGE sebanyak dua ulangan lalu inkubasi lagi seperti kondisi semula.
- Setelah koloni tumbuh dan berdiameter 2-4 mm, lalu tuangkan medium NA yang mengandung Pb dan Cd (Pb(NO₃)₂ dan Cd(NO₃)₂) pada permukaan medium PGE yang telah ditumbuhi MPLB.
- Kemudian inkubasi biakan agar cawan yang telah dilapis media NA yang mengandung logam Pb atau Cd selama 2-3 hari.
- Beri koloni mikroba (bakteri, Khamir) yang tumbuh dengan gas H₂S dalam desikator selama 10 menit. Bakteri yang mampu mengakumulasi logam berat ditunjukkan dengan ciri-ciri koloni bewarna gelap. Untuk logam lain dilakukan dengan prosedur yang sama.
- Isolasi koloni yang mampu mengakumulasi logam berat dari medium agar ke PGE yang baru. Selanjutnya karakterisasi MPLB terhadap karakter fisiologi, biokimia, dan DNA. Selanjutnya, mikroba unggul dalam mengakumulasi logam berat akan diidentifikasi jenisnya.

12) Uji kemampuan akumulasi logam berat

- Inokulasi mikroba (10^9 sel ml^{-1}) pengakumulasi logam berat pada media cair PGE dengan berbagai pH yang mengandung logam yang terukur.
- Kocok biakan pada inkubator penggoyang selama 5 (lima) hari. Panen biakan yang telah tumbuh dengan cara sentrifusasi pada kecepatan 5.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C .
- Ukur kandungan logam supernatan menggunakan AAS pada panjang gelombang 248,5 nm. Pengurangan konsentrasi logam merupakan kemampuan reduksi logam berat oleh mikroba. Sebagai kontrol digunakan supernatan dari media logam tanpa mikroba.

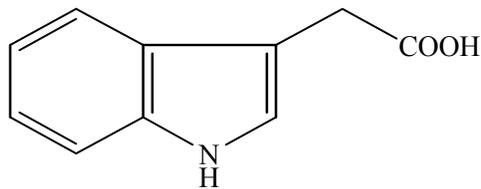
DAFTAR PUSTAKA

- Dave, S.R. 1994. Biosorption of heavy metal. *Proch.Acad. Environ. Biol.* 3(1): 21-24.
- Gadd, G.M. 1990. Metal tolerance. p 178-210. *In* C. Edward (Ed.). *Microbiology of extreme environments*. Mcgraw-Hill. New York.
- Gadd, G.M. & C. White. 1993. Microbial treatment of metal pollution-working biotechnology. *Trends in Biotechnology* 3 (2): 353-359.
- Mullen, M.D., D.C. Wolf, F.G. Ferris, T.J. Beveridge, C.A. Fleming, & G.W. Bailey. 1989. Bacterial sorption of heavy metal. *Appl. Environ. Microbial.* 55: 3143-3149.
- Pumpel, T., Pernfu, B. Pigher, L. Diels, & F. Schiner. 1995. A rapid screening method for the isolation of metal-accumulating microorganisms. *Ind. Microbiol J.* 14: 213-217.
- Spain, A. 2003. Implications of microbial heavy metal tolerance in the environment. *Reviews in Undergraduate Research* 2: 1-6.

MIKROBA PENGHASIL ASAM INDOL ASETAT

Erny Yuniarti & Jati Purwani

Auksin merupakan senyawa yang mewakili golongan senyawa yang mampu menginduksi pemanjangan batang pada wilayah sub-apikal (Weerasooriya, 2005) dan menginduksi pertumbuhan bagian tanaman lainnya. Auksin berupa senyawa asam dengan turunannya. Auksin alami yang sering ditemui adalah asam indol-3-asetat (AIA) (Gambar 1).



Gambar 1. Struktur asam indol-3-asetat/AIA (Weerasooriya, 2005)

Asam indol asetat (AIA) yang diproduksi oleh non tumbuhan diistilahkan dengan AIA (auksin) eksogen. AIA eksogen dapat disintesis oleh sejumlah spesies non tumbuhan meliputi bakteri, fungi, dan alga (Tien *et al.*, 1979; Frankenberger & Poth, 1987; Maor *et al.*, 2004). Kemampuan menghasilkan AIA tersebar di antara kelompok bakteri yaitu bakteri tanah, bakteri efitik, bakteri endofitik (Patten & Glick, 1996).

Beberapa bakteri tanah yang dikenal dengan rhizobakteri pemacu tumbuh tanam mampu memproduksi AIA untuk meningkatkan produktivitas tanaman. Inokulasi tanaman dengan rhizobakteri *Azospirillum brasilense* Sp13t SR2 dapat meningkatkan pertumbuhan tanaman bagian atas lebih tinggi daripada tanaman yang diberi hormon tumbuh AIA pada konsentrasi optimum sebesar 0,01 ppm (Tien *et al.*, 1979).

Dalam tulisan ini dijelaskan metode analisis AIA yang dihasilkan kultur murni mikroba secara *in vitro* dan AIA dari tanah (laju produksi AIA potensial mikroba tanah). Metode analisis secara kualitatif menggunakan media agar cawan yang juga digunakan untuk menghitung populasi bakteri penghasil AIA. Analisis AIA secara kuantitatif menggunakan metode kolorimetri dan HPLC (*high-pressure liquid chromatography*).

2.12.1 Prinsip

Asam indol asetat yang dihasilkan oleh mikroba dapat dideteksi dan diukur secara kualitatif dan kuantitatif. Analisis secara kualitatif pada media cawan agar yang diperkaya dengan triptofan dicirikan oleh terbentuknya halo berwarna merah di sekitar koloni setelah diberi pereaksi Gordon & Weber (1951). Dalam analisis kuantitatif secara kolorimetri, ekstrak biakan mikroba atau tanah yang mengandung AIA diberi pereaksi Weber dan Gordon sehingga terbentuk larutan berwarna merah yang dapat terukur pada panjang gelombang 530 nm. Dengan metode HPLC, AIA dalam ekstrak dipisahkan dari komponen-komponen lain berdasarkan distribusi AIA dalam fase gerak dan fase diam.

2.12.2 Asai Kemampuan Mikroba Menghasilkan AIA secara Kualitatif (Brick *et al.*, 1991)

Alat

- Cawan Petri
- Labu takar 100 ml
- Botol pengencer

Bahan

- L-triptofan steril (filter 0,22 μm)
- Membran nitroselulosa
- Larutan pengencer
 - Masukkan 9 ml akuades ke dalam botol pengencer lalu sterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit.
- Pereaksi Gordon & Weber (1951)
 - Larutkan 8,12 g FeCl_3 dengan air deionisasi dalam labu takar 100 ml dan cukupkan volume sampai 100 ml. Campurkan 1ml larutan FeCl_3 dengan 50 ml HClO_4 35% dalam botol gelap.

Prosedur

- Inokulasi media agar cawan yang disuplementasi dengan 5 mM L-triptofan dengan isolat-isolat mikroba lalu segera lapisi dengan membran nitroselulosa.
- Inkubasi media yang telah diinokulasi dan dilapisi membran nitroselulosa hingga koloni bakteri tumbuh dan mencapai diameter 1 hingga 2 mm.
- Setelah inkubasi, angkat membran nitroselulosa dari media agar cawan lalu rendam dalam reagen Gordon & Weber atau pindahkan membran ke filter paper yang telah dijenuhi dengan reagen Gordon & Weber dan biarkan pada suhu ruang hingga tampak halo berwarna merah yang

berbeda seputar koloni pada membran nitroselulosa. Reaksi kolorimetri terhadap AIA terbatas pada daerah yang dekat sekitar masing-masing koloni, dan spesifik untuk isolat-isolat yang menghasilkan AIA, terjadi dalam waktu 1 jam setelah membran ditempatkan di dalam reagen, dan sensitif pada sejumlah kecil (50 pmol) AIA di dalam 2 mm² spot.

- Prosedur ini dapat digunakan untuk enumerasi populasi bakteri penghasil AIA. Encerkan 1 g (tanah atau tanaman) sampai 10⁻⁶ lalu inokulasikan dengan metode cawan sebar sebanyak 0,1 ml dari masing-masing pengenceran ke media agar cawan yang disuplementasi dengan 5 mM L-triptofan.
- Inkubasi media agar cawan yang telah diinokulasi pada suhu ruang selama 24 jam, setelah inkubasi hitung jumlah koloni bakteri yang tumbuh pada agar cawan.
- Pada media agar cawan yang ditumbuhi sampai 50 koloni lapisi dengan membran nitroselulosa. Selanjutnya, lakukan prosedur seperti di atas untuk menentukan koloni penghasil AIA.

2.12.3 Asai Kemampuan Mikroba Menghasilkan AIA secara Kuantitatif dengan Spektrofotometer

Alat

- Spektrofotometer
- Labu takar 100 ml
- Timbangan analitik
- Kuvet
- Sentrifus
- Tabung reaksi
- Pipet mikro 1 ml

Bahan

- Pereaksi Gordon dan Weber (1951)
 - Lihat 2.12.2.
- Larutan stok AIA
 - Larutkan 0,01 g AIA dengan 50 akuades dalam gelas piala menggunakan magnet pengocok lalu cukupkan volume menjadi 100 ml.

Prosedur

- Sentrifus 20 ml kultur pada kecepatan 8.000 rpm pada suhu 4°C selama 10 menit lalu saring supernatan dengan membran filter 0,45 µm.
- Pipet 1 ml supernatan yang telah disaring ke dalam tabung reaksi bersih lalu tambah dengan 2 ml pereaksi Gordon & Weber. Sebagai kontrol, campurkan 1 ml supernatan media steril yang telah disaring dengan 2 ml pereaksi Gordon dan Weber. Kocok lalu inkubasi campuran supernatan dan pereaksi selama 25 menit, kemudian ukur absorbansinya pada $\lambda = 530 \text{ nm}$.

Standar kalibrasi

- Buat larutan standar AIA 0,2; 1; 5; 15; 20; 25; 30; 35; 40; 45 ppm dari larutan stok AIA 100 ppm.
- Tambah masing-masing 1 ml larutan standar dengan 2 ml pereaksi Gordon & Weber. Sebagai blanko, tambahkan 1 ml akuades dengan 2 ml pereaksi Gordon & Weber. Kocok larutan, inkubasi selama 25 menit.
- Ukur absorbansi seperti di atas. Absorbansi terkoreksi adalah absorbansi larutan standar dikurangi absorbansi blanko. Kurva standar menyatakan hubungan konsentrasi AIA (X) dan absorbansi terkoreksi (Y) dengan persamaan regresi $Y = a + bX$.

Perhitungan

- Koreksi absorbansi AIA sampel dengan cara mengurangi absorbansi AIA contoh dengan absorbansi AIA kontrol.
- Konversikan nilai absorbansi contoh terkoreksi (Y) menjadi konsentrasi AIA (X) menggunakan persamaan kurva standar AIA.

2.12.4 Asai Kemampuan Mikroba Menghasilkan AIA secara Kuantitatif dengan HPLC Detektor UV/Vis

Alat

- HPLC Shimadzu Liquid Chromatograph LC-3A dengan Detector UV/Vis

Bahan

- Membran filter 0,45 µm
- HCl 0,1 N
- Metanol
- Eter

Prosedur

- Sentrifus 20 ml kultur pada kecepatan 8.000 rpm pada suhu 4°C selama 10 menit lalu saring supernatan dengan filter 0,45 µm.
- Sesuaikan pH supernatan yang telah disaring menjadi pH 2,8 dengan HCl 1,0 N, untuk memprotonasi dan meningkatkan lipofilisitas gugus karboksil.
- Ekstraksi larutan supernatan dengan eter sebanyak tiga kali lalu pindahkan fraksi eter yang terbentuk ke gelas piala dan keringkan di ruang asam. Setelah eter terevaporasi sempurna, larutkan kembali ekstrak dengan 1,0 ml metanol.
- Sebelum diinjeksikan ke HPLC, saring ekstrak dalam metanol dengan filter membran berukuran 0,45 µm. Jenis HPLC yang digunakan ialah *Shimadzu Liquid Chromatograph* LC-3A dengan *Detector* UV/Vis pada panjang gelombang 254 nm. Kromatogram HPLC dihasilkan melalui penginjeksian 10 µl ekstrak yang telah disaring ke *reverse phase column* (*Chrompack column Litchr. 5RP18*; diameter 150 x 4.6 mm). Fase gerak yang digunakan ialah metanol 60% dengan kecepatan alir sebesar 1,0 ml menit⁻¹.

2.12.5 Pengukuran Laju Produksi AIA oleh Mikroba Potensial dalam Sampel Tanah dengan HPLC Detektor UV/Vis dan Fluorometer (Lebuhn & Hartmann, 1995)

Alat

- Penangas ultrasonikasi (volume 2 L, *high frequency/HF*, *power* 80/160 W)
- Tabung sentrifus polipropilena (50 ml)
- Unit polipropilena steril (alat suntik steril yang dilengkapi dengan filter selulosa asetat 0,2 µm)
- Unit filtrasi (gelas, saringan Teflon dengan diameter 20 mm) dengan filter selulosa asetat (0,45 µm)
- pH meter (akurasi pengukuran nilai pH ± 0,01 sesuai untuk larutan yang mengandung sedikit pelarut organik)
- Manifold ekstraksi fase padat dengan kolom polipropilena (volume bed 2 ml, reservoir 10 ml) yang berisi resin Amberlite XAD (200-400 mesh; Bio-Rad or Supelco)
- Unit HPLC
 - Pompa presisi tinggi (*high precision pump*), paling sedikit 250 bar, volume lup 200 µm.
 - Kolom: 250 x 4 mm Hyperchrome ODSII C18, ukuran partikel 5 µm
 - Guard column: 20 x 4 Hyperchrome ODSII C18, ukuran partikel 5 µm
 - Monitor fluoresen (panjang gelombang eksitasi dan emisi UV bervariasi)

- Monitor absorpsi UV (panjang gelombang bervariasi, 220-500 nm)
- Integrator (dua saluran, memungkinkan visualisasi *baseline* dan kalkulasi area puncak)
- Spektrofotometer

Bahan

13) Ekstraksi, inkubasi, dan kalibrasi

- H₃PO₄ pekat (85%, p.a (proanalisis))
- Akuabides (20°C)
- Larutan bufer fosfat netral (PP7, 0,2 M, pH 7)
 - Larutan A: timbang 27,8 NaH₂PO₄ (p.a) dalam labu takar 1.000 ml, larutkan dengan akuabides, dan encerkan dengan akuabides.
 - Larutan B: timbang 53,65 g Na₂HPO₄.7H₂O (p.a) dalam labu takar 1.000 ml, larutkan dengan akuabides, dan encerkan dengan akuabides.
 - Campurkan 390 ml larutan A dan 610 ml larutan B.
- Larutan bufer fosfat asam (PP2,25, pH 2,25)
 - Sesuaikan pH dari 1.000 ml larutan PP7 menjadi 2,25 dengan H₃PO₄ pekat.
- Larutan trp inkubasi (L-triptofan)
 - Timbang 100 mg L-triptofan dalam gelas piala 20 ml steril, larutkan dalam 10 ml PP7 steril filter dengan magnet pengocok (kondisi steril, 20°C, keadaan gelap, kira-kira 30 menit) dengan pulsa ultrasonik intermitten (sebentar-sebentar). Gunakan larutan ini segera setelah dibuat.
- Larutan stok AIA untuk kalibrasi
 - Larutkan 200-250 µg asam indol asetat dengan larutan bufer fosfat netral steril dalam labu takar steril 50 ml (kondisi steril, 20° C, keadaan gelap, kira-kira 10 menit).
 - Simpan larutan pada suhu 4°C dan pada keadaan gelap tetapi tidak lebih dari 2 hari.

14) Ekstraksi fase padat

- Metanol (HPLC grade)
- Larutan bufer fosfat asam (PP2,25)
- Etanol (absolut, HPLC grade)

15) Fase gerak

- Larutan C (larutan stok untuk fase gerak)
 - Campurkan 125 ml 2-propanol (HPLC grade) dengan 875 ml akuabides (20°C) dalam labu takar 1.000 ml.
- Fase gerak HPLC 1 (pH 4.33)
 - Timbang 399 mg asam sitrat monohidrat (p.a) dalam gelas piala 2.000 ml, dan larutkan dengan 1.000 ml larutan C, lalu kocok

dengan pengocok magnetik. Sesuaikan pH menjadi 4,25 – 4,30 (20°C, tanpa pengocokan) dengan NaOH 32%, sesuaikan pH 4,33 dengan NaOH 3%. Karena penyesuaian kekuatan ionik dengan benar adalah penting, jangan sampai berlebihan atau mentitrasi kembali. Isi fase gerak ke dalam labu melingkar, evakuasi sampai gelembung udara lebih besar yang pertama muncul, dan sonikasi selama 5 - 10 menit dalam penangas ultrasonik. Hindari kontak pelumas laboratorium dengan fase gerak.

- Fase gerak HPLC 2 (pH 2,13)
 - Timbang 600 mg NaH_2PO_4 (p.a) ke dalam gelas piala 2.000 ml dan larutkan dengan 1.000 ml larutan C lalu kocok dengan pengocok magnetik. Sesuaikan pH menjadi 2,13 (20°C, tanpa pengocokan) dengan H_3PO_4 pekat. Hilangkan gelembung udara pada vakum parsial seperti dijelaskan di atas pada fase gerak HPLC 1.

Prosedur

16) Kandungan aktual dan ekstraksi

- Segera setelah penyaringan (<2 mm), timbang 3 g sampel tanah lembab (jaga pada suhu *in situ*) ke dalam tabung sentrifus polipropilena.
- Tambahkan 5 ml PP7, campur larutan tanah dengan spatula (hindari kehilangan pada spatula dan dinding dalam tabung), kocok agregat dengan sonikasi selama 5 detik dalam ultrasonik bath.
- Sentrifus suspensi tanah pada 5.000 x g (*swing-out rotor*) selama 30 menit pada suhu 4°C. Ambil supernatan dengan hati-hati, filter (0,45 µm) dengan *slight partial vacuum* ke dalam gelas vial 15 ml.
- Cuci permukaan tanah dua kali dengan 1 ml larutan PP7, filter suspensi cucian dan cuci permukaan peralatan filtrasi bagian dalam dua kali dengan 1 ml PP7 ke dalam vial sehingga diperoleh 9-10 ml filtrat. Filtrat atau supernatan ini langsung bisa digunakan untuk pengukuran kadar IAA dengan spektrofotometer. Apabila untuk analisis dengan HPLC, sesuaikan pH filtrat dengan H_3PO_4 pekat (9 tetes) sampai 2,1 – 2,4.

17) Laju produksi potensial, inkubasi dan ekstraksi

- Sesuaikan kadar air sampel tanah lembab (< 2 mm) sampai 50% kapasitas lapang maksimum dan ekuilibrase selama 7 hari pada suhu 20°C pada keadaan gelap (ganti air yang hilang dengan menyemprot air hujan dengan *sprayer*).
- Timbang 3 g tanah yang telah diekuilibrase ke dalam tabung sentrifus, tambahkan 1 ml larutan L-triptofan steril (simpan sisa larutan triptofan inkubasi pada kondisi steril selama 24 jam suhu

- 20°C pada keadaan gelap untuk determinasi produk degradasi trp autoxidatif).
- Aduk suspensi tanah dengan spatula dan hindarkan kehilangan suspensi pada spatula dan permukaan dalam tabung sentrifus. Inkubasi selama 24 jam pada 20°C dan keadaan gelap.
 - Setelah inkubasi, tambahkan 4 ml PP7, aduk lagi dengan spatula, hancurkan agregat dengan sonikasi selama 5 detik dalam inkubator ultrasonik. Lakukan ekstraksi seperti di atas.
- 18) Produk degradasi trp autoxidatif
- Timbang 3 g tanah telah diekuilibrasikan dalam tabung sentrifus lalu tambahkan 1 ml larutan trp inkubasi yang telah disimpan pada suhu 20°C dalam keadaan gelap selama 24 jam.
 - Segera setelah itu, tambahkan 4 ml PP7, lalu kocok dan ekstraksi suspensi tanah. Ekstrak tanah yang mengandung produk degradasi trp autoxidatif terekstraksi fosfat yang dihasilkan selama 24 jam dan kandungan aktual, mewakili latar belakang laju produksi potensial.
- 19) Ekstraksi larutan standar kalibrasi
- Timbang 3 g sampel tanah yang telah diekuilibrasikan dalam tabung sentrifus.
 - Tambahkan 5 ml larutan standar steril untuk kalibrasi, aduk dengan spatula dan biarkan suspensi tanah selama 1 menit dan biarkan adsorpsi senyawa pada partikel tanah.
 - Hancurkan agregat dengan sonikasi selama 5 detik dalam inkubator ultrasonik dan lakukan ekstraksi.
- 20) Ekstraksi fase padat (SPE) filtrat
- Aktifkan kolom SPE yang mengandung 250 mg berat kering Amberlite XAD-2 selama paling sedikit 1 jam dengan 5 ml metanol, cuci dengan 10 ml akuabides, ekuilibrasikan selama paling sedikit 1,5 jam dengan 10 ml PP2,25, sesuai anjuran pabrik.
 - Alirkan filtrat tetes demi tetes melalui kolom SPE yang telah diekuilibrasikan pada vakum parsial yang tepat, cuci vial filtrasi dengan 2 ml PP 2,25, tambahkan cucian ke kolom SPE dan cuci permukaan dalam kolom dua kali dengan 1 ml PP 2,25. Sampai tahap elusi berikutnya jangan biarkan kolom berjalan kering (*run dry*).
 - Untuk pertukaran pelarut, *run dry* kolom pada vakum parsial selama 10 menit (hilangkan residu air selagi mungkin).
 - Tempatkan labu takar volumetrik 5 ml di bawah kolom dan aplikasikan 2,5 ml etanol pada vakum parsial sampai tetesan kedua muncul.
 - Tutup dan biarkan 5 menit untuk interaksi etanol dengan senyawa teradsorpsi.
 - Elusi tetesan senyawa, dan tambahkan 2,5 ml etanol dengan cepat sebelum permukaan volume pertama mencapai permukaan resin.

- *Run dry* kolom selama 5-10 menit, sesuaikan volume elusi sampai 5 ml dengan etanol. Kocok dengan baik, disintegrasi kemacetan yang mungkin terjadi dengan ultrasonikasi cepat, biarkan sampel semalam dalam gelap pada -20°C untuk sedimentasi fosfat yang terflokulasi.
- 21) Pengukuran kandungan sebenarnya (sampel tanpa penambahan trp)
- Hubungkan secara seri monitor absorpsi UV (-0,01 - +0,99 rAU) dan monitor fluorescens (sensitifitas tinggi, kisaran 16, respon medium). Data ditransfer secara simultan ke integrator 2 saluran.
 - Ekuilibrasikan sistem pada suhu 20°C dengan fase mobil HPLC 1 dengan laju alir 1,1 ml menit⁻¹ sampai garis dasar (*baseline*) pada iradiasi UV 233 nm (UV 233) stabil (1 – 2 jam).
 - Bersihkan sistem dengan menginjeksi etanol berulang sampai tidak ada puncak fluorescens (terutama trp) pada eksitasi 280 nm dan emisi 360 nm (Fluor 280/360) yang termonitor di samping puncak pelarut.
 - Ukur larutan standar ekstraksi pertama pada UV 233 dan fluor 280/360 dengan fase gerak 2 selama paling sedikit 60 menit sampai puncak terakhir (indol) muncul.
 - Konfirmasi bahwa tidak ada puncak di luar kisaran (sinyal fluorometri <680 mV membuktikan kelinieran determinasi). Sampel di luar kisaran harus diencerkan.
 - Ukur pada kondisi ini satu rangkaian dua sampel aktual (tanpa trp) diikuti larutan standar. Ukur rangkaian satu campuran standar diikuti dua sampel aktual pada UV 316 dan fluor 315/405 (atau fluor 340/408).
 - Ekuilibrasikan sistem dengan fase gerak HPLC 2 selama paling sedikit 30 menit dan ukur sampel pada kondisi kromatografi ini.
- 22) Penentuan laju produksi potensial (contoh dengan diberi trp)
- Ukur sampel yang diinkubasi dengan trp seperti di atas (lihat pengukuran kandungan aktual). Untuk sampel ini, trp di luar kisaran tidak dapat ditentukan. Sistem *overload* (dalam hal ini trp) menyebabkan kontaminasi sampel berikutnya (juga standar kalibrasi).
 - Oleh karena itu, kalkulasi laju produksi potensial dan kandungan aktual hanya menggunakan standar kalibrasi yang diukur di antara serangkaian determinasi kandungan aktual.
 - Bersihkan sistem secara hati-hati dengan serangkaian injeksi akuabides dan etanol sampai tidak termonitor puncak trp pada fluor 280/360, terutama jika kandungan aktual dideterminasi berikutnya.

Perhitungan

- Hitung kandungan senyawa indolik yang terukur per berat kering tanah (105°C, berat konstan).

- Identifikasi puncak dengan waktu retensinya yang berbeda pada kedua fase gerak dan karakteristik spektrumnya.
- Hitung setiap puncak secara terpisah pada fase gerak yang sesuai, pada kondisi absorpsi UV dan atau kondisi fluoresen.
- Lakukan kuantifikasi untuk puncak tidak di luar kisaran dan terdeteksi pada kondisi analisis dimana gangguan puncak lain kecil. Determinasi fluoresen lebih dapat dipercaya daripada hasil pengukuran absorpsi UV.

$$\text{Kandungan aktual (ng X. g}^{-1} \text{ dm)} = \frac{S_{\text{aktual}} \cdot \text{WR} \cdot 250}{(C - S_{\text{aktual}}) \cdot \text{dm}}$$

$$\text{Laju produksi potensial (ng X . g}^{-1} \text{ dm} \cdot 24^{-1}) = \frac{(S_{\text{potensial}} - \text{AD}) \cdot \text{WR} \cdot 250}{(C - S_{\text{aktual}}) \cdot \text{dm}}$$

- S_{aktual} = area puncak kandungan aktual (rU) sampel yang diukur dengan injeksi 20 μm eluen etanol.
- $S_{\text{potensial}}$ = area puncak laju produksi potensial (rU.24⁻¹) sampel yang diukur dengan injeksi 20 μm eluen etanol.
- WR = jumlah senyawa referensi yang ditimbang (AIA) dalam 20 μl eluen etanol yang diinjeksikan, mewakili kandungan total (kandungan yang dapat diekstraksi dan tidak dapat diekstraksi).
- 250 = faktor pengenceran (20 μl eluen etanol diukur dari 5 ml eluen etanol).
- X = senyawa AIA yang diukur.
- C = area puncak standar kalibrasi yang diukur per 20 μl eluen etanol yang diinjeksikan (relative units, rU).
- AD = area puncak sampel degradasi trp auxodatif (rU.24 jam⁻¹).
- dm = berat kering tanah (mewakili 3 g tanah lembab, tanah yang diekstrak).

DAFTAR PUSTAKA

- Brick, J.M., M. Richard, Bostock, & S.E. Silverstone. 1991. Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by *Bacteria* immobilized on a nitrocellulose membrane. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 535-538.
- Frankenberger, W.T. & M. Poth. 1987. Biosynthesis of indole-3-acetic acid by the pine ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 2908-2913.
- Gordon, S.A. & R.P. Weber. 1951. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant Physiol* 26:192-195.

- Lebuhn M. & A. Hartmann. 1995. Auxin, L-tryptophan and related indolic and phenolic catabolites. p. 268-280. *In* F Schinner, R. Ohlinger, E. Kandeler, & R. Margesin (Eds.) *Methods in Soil Biology*. Springer Lab Manual.
- Maor, R, S. Haskin, H. Levi-Kedmi, & A. Sharon. 2004. *In planta* production of indole-3-acetic acid by *Colletotrichum gloeosporioides* sp. *Aeschynomene*. *App. Environ. Microbiol* 70:1852-1854.
- Patten, C.L. & B.R. Glick. 1996. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Can J Microbiol*. 42:207–220.
- Tien, TM, M.H. Gaskin, & D.H. Hubell. 1979. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). *Appl. Environ. Microbiol* 37: 1016-1024.
- Weerasooriya R. 2005. Auxin: indole-3-acetic acid (IAA), a hormone with diverse effects: synthesis and applications. <http://www.projectlabs.com/htmldocs/auxin.html>. [31 Mar 2005].

BAKTERI KOLIFORM

Erny Yuniarti

Keberadaan bakteri koliform feces dalam lingkungan air menunjukkan bahwa air telah terkontaminasi dengan feces manusia atau hewan berdarah panas yang mengandung bakteri atau virus patogen. Sebagian besar patogen-patogen saluran pencernaan penyebab berbagai wabah penyakit enterik tersebut, tergolong famili *Enterobacteriaceae*. Di antara banyak mikroorganisme asal feces yang menyebabkan wabah penyakit dari tular air adalah *Salmonella typhi* (demam tifus), *Shigella* spp. (shigellosis), *Salmonella paratyphi* (salmonellosis), *Vibrio cholerae* (kolera), *Camphylobacter jejuni* (disentri) dan *Escherechia coli* patogenik (diare). Selain itu adalah virus seperti virus hepatitis A (infeksi hepatitis), virus polio (poliomelitus), dan protozoa seperti *Entamoeba histilotyca* (disentri amuba) dan *Giardia*.

Koliform didefinisikan sebagai kelompok bakteri Gram-negatif, berbentuk batang, oksidase-negatif, aerob sampai anaerob fakultatif, tidak membentuk spora, mampu tumbuh secara aerobik pada media agar yang mengandung garam empedu, dan mampu memfermentasikan laktosa dengan membentuk gas dan asam dalam waktu 48 jam pada suhu 37°C. Jumlah koliform yang diperoleh dari inkubasi pada suhu 37°C tersebut biasanya dinyatakan sebagai total koliform. Sementara koliform fekal merupakan bagian dari koliform total dan dipresentasikan oleh total bakteri koliform toleran panas yang mampu tumbuh pada suhu $44,5 \pm 0,2^\circ\text{C}$ dengan memfermentasikan laktosa dan memproduksi asam dan gas (Lynch & Poole, 1979).

Kelompok bakteri koliform terdiri atas genus dan spesies bakteri, yaitu *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Aeromonas*, dan *Escherichia coli* yang semuanya tergolong famili *Enterobckteriaceae*. Spesies yang disebutkan terakhir merupakan spesies yang keberadaanya paling tinggi (Leclerc *et al.*, 1981 dalam Alonso *et al.*, 1999). Knowles (1982) mengisolasi koliform seperti *Klebsiella* dan *Enterobacter*, *Erwinia*, dan *Escherechia coli* dari tanah yang dimanfaatkan sebagai pupuk hayati karena kemampuannya menambat N_2 dari udara.

Penggunaan pupuk kandang atau kompos yang sebagian atau seluruhnya berasal dari limbah feces ke lahan pertanian merupakan salah satu penyebab penyebaran patogen ke dalam tanah yang selanjutnya mengkontaminasi sumber air tanah dan produk segar pertanian. Lamanya patogen bertahan dalam tanah bergantung pada kelembapan, pH, tipe,

kandungan bahan organik, suhu tanah dan paparan sinar matahari. Sinar matahari dan udara kering dapat membunuh patogen. Bakteri dan virus tidak dapat menembus tanaman yang utuh (tidak rusak) namun patogen dapat bertahan pada permukaan sayuran terutama daerah perakaran. Untuk mencegah kemungkinan masuknya patogen ke sumber air tanah dan produk segar dibutuhkan keamanan mikrobiologis atas pupuk organik dan pembenah tanah yang digunakan dalam pertanian. Enumerasi koliform merupakan analisis paling sederhana dan cepat serta dapat dipakai sebagai indikator keberadaan patogen dalam air, tanah, pembenah tanah, dan pupuk organik.

Tiga metode enumerasi koliform yang sering digunakan adalah metode inokulasi langsung pada medium agar, Millipore membran-Filter, dan MPN (*most probable number*) dengan cara fermentasi tabung ganda menggunakan medium cair. Enumerasi koliform dengan metode filtrasi membran relatif lebih cepat namun kelemahannya hanya bisa digunakan untuk contoh air dan tidak bisa diaplikasikan untuk contoh air dengan kekeruhan tinggi (Lynch & Poole, 1979). Metode MPN dengan tabung ganda lebih baik dibandingkan dengan metode hitungan cawan karena lebih sensitif dan dapat mendeteksi koliform dalam jumlah yang sangat rendah di dalam contoh (Fardiaz, 1989).

Dalam tulisan ini diuraikan metode analisis koliform dengan cara fermentasi tabung ganda yang sesuai untuk contoh pupuk kandang, kompos, dan tanah.

2.13.1 Prinsip

Dalam media LSTB (*lauryl sulfate tryptose broth*), koliform memfermentasi laktosa dan menghasilkan gas yang terperangkap dalam tabung Durham dalam waktu 48 jam pada suhu 37°C. Untuk konfirmasi keberadaan koliform digunakan medium *brilliant-green* untuk menghambat bakteri yang membentuk endospora dan mengakibatkan pembacaan uji positif yang salah pada uji tabung LSTB. Uji lengkap koliform dilakukan dengan menumbuhkan biakan dari media BGLBB (*brilliant green bile lactose broth*) ke media cawan agar EMB (*eosine methylene blue*). Pada media EMB, koloni *Escherichia coli* membentuk kilauan hijau metalik dan gelap di pusat koloni. Kilauan hijau metalik tampak jelas dengan cahaya refleksi.

2.13.2 Enumerasi Total Koliform dengan Metode MPN (Raymundo *et al.*, 1991)

Alat

- Tabung bertutup ulir
- Tabung Durham
- Cawan Petri
- Pipet mikro (1 ml dan 200 µl)
- Inkubator
- Lup inokulasi
- Blender
- Botol pengencer

Bahan

- *Lauryl sulfate tryptose broth* (LSTB) dengan tabung Durham
 - Larutkan 20 g triptosa (*casein digest pankcreatic*); 5,0 laktosa; 2,75 g K₂HPO₄; 2,75 KH₂PO₄; 5,0 g NaCl; 0,1 g CaCl₂ berurutan dengan akuades 1.000 ml. Tuang media yang telah larut ke dalam tabung-tabung berulir yang mengandung tabung Durham masing-masing sebanyak 10 ml. Sterilisasi tabung-tabung berisi media pada suhu 121°C, tekanan 0,1 MPa, selama 15 menit.
- *Brilliant green bile lactose broth* (BGLB) dengan tabung Durham
 - Larutkan 10 g pepton; 10 g laktosa; 20 g Oxgall; 0,0133 g *brilliant green* dengan akuades 1.000 ml. Sesuaikan pH menjadi pH 7,2. Tuang media yang telah larut ke dalam tabung-tabung berulir yang mengandung tabung Durham masing-masing sebanyak 10 ml. Sterilisasi tabung-tabung berisi media pada suhu 121°C, 0,1 MPa, selama 15 menit.
- *Eosine methylene blue* (EMB) agar cawan
 - Larutkan 10 g pepton; 5 g laktosa; 5 g sukrosa; 2 g K₂HPO₄; 0,4 g Eosin Y; dan 0,0065 g biru metilena dengan 1.000 ml akuades dalam Erlenmeyer. Sesuaikan pH menjadi pH 7.2. Tambahkan 13,5 g agar. Sterilisasi media pada suhu 121°C, 0,1 MPa, selama 15 menit. Setelah hangat kuku (45°C) tuang ke cawan Petri steril.
- Agar miring *nutrient agar* (NA)
 - Larutkan NA dalam akuades dengan jumlah sesuai takaran yang diberikan pabrik lalu rebus dalam penangas sampai agar larut. NA yang telah larut dituang ke dalam tabung-tabung reaksi sebanyak 9 ml lalu tutup dan sterilisasi pada 121°, 0,1MPa, selama 15 menit. Setelah steril, media NA dimiringkan pada papan miring sampai beku.

- Reagen pewarnaan Gram
 - Larutkan amonium oksalat kristal violet:
Larutan A: larutkan 2 g kristal violet (90%) dalam 20 ml etanol 95%
Larutan B: larutkan 0,8 g amonium oksalat dalam 80 ml akuades.
Campurkan larutan A dan B
 - Larutan *Gram's Iodine* (Ingol):
Larutkan 1 g iodine (yodium) dan 2 g KJ dalam 300 ml akuades.
 - Larutan safranin (counterstain):
Encerkan 10 ml safranin O (2,5% dalam etanol 95%) dengan 100 ml akuades.
- Biakan *E. coli* sebagai kontrol
- Larutan pengencer akuades steril
 - Masukkan akuades masing-masing 99 ml dan 9 ml ke botol-botol pengencer. Sterilisasi tabung-tabung berisi larutan pengencer pada suhu 121°C, 0,1 MPa, selama 15 menit.
- Larutan pengencer garam fisiologis (NaCl 0,85%)
 - Larutkan 8,5 g NaCl dengan 500 ml akuades lalu cukupkan akuades menjadi 1.000 ml. Masukkan 90 ml dan 9 ml larutan garam fisiologi ke dalam botol-botol pengencer. Sterilisasi tabung-tabung berisi larutan pengencer pada suhu 121°C, 0,1 MPa, selama 15 menit.

Prosedur

23) Persiapan contoh pupuk kandang, kompos atau tanah

- Kering oven (105°C) 5 g contoh (pupuk kandang, kompos, atau tanah) selama 24 jam, lalu timbang. Ukur berat kering dikalkulasikan terhadap persentase berat basah untuk faktor koreksi.
- Masukkan 11 g contoh (pupuk kandang atau kompos limbah feses) ke dalam 99 ml akuades steril, lalu diblender 40 detik. Selanjutnya, buat pengenceran sampai 10^{-5} .
- Untuk contoh tanah, masukkan 10 g contoh tanah lembap ke dalam 90 ml garam fisiologis steril, lalu kocok dengan mesin penggoyang selama 30 menit atau kocok dengan tangan dengan menggoyang botol 50 kali. Selanjutnya buat pengenceran suspensi tanah sampai 10^{-6} (kurang atau lebih tergantung jumlah perkiraan bakteri koli yang ada dalam tanah).

24) Uji penduga

- Inokulasi lima set tiga tabung yang mengandung 10 ml LSTB, masing-masing 1 set tiga tabung dengan 1 ml suspensi contoh dari pengenceran 10^{-1} , tiga tabung LSTB lainnya dengan 1 ml dari pengenceran 10^{-2} , dan tiga tabung berikutnya dengan 1 ml dari

pengenceran 10^{-3} dan seterusnya. Inkubasi semua tabung pada suhu 37°C selama 24 jam. Amati adanya pembentukan gas pada tabung Durham dalam biakan media LSTB. Inkubasi kembali apabila biakan LSTB tabung negatif (tidak terdeteksi adanya gelembung udara selama 24 jam).

- Amati pertumbuhan dan produksi gas. Uji praduga positif adanya koliform dicirikan oleh pembentukan gas dalam tabung LSTB.
- Catat semua tabung LSTB positif dan lihat tabel MPN untuk tiga tabung per pengenceran (Tabel Lampiran 1) dan hitung MPN penduga bakteri koliform per g (berat kering sampel).

25) Uji penguat

- Transfer 1 lup suspensi biakan dari masing-masing tabung LSTB positif ke satu tabung BGLBB 2%. Inkubasi tabung pada 37°C selama 48 jam.
- Amati adanya pertumbuhan (kekeruhan) dan pembentukan gas pada tabung BGLBB untuk menegaskan adanya koliform.
- Terbentuknya gas di dalam LSTB atau di dalam BGLBB tidak selalu menunjukkan jumlah bakteri koli karena mikroba lainnya mungkin juga ada yang dapat memfermentasi laktosa dengan membentuk gas, misalnya bakteri asam laktat dan khamir tertentu. Oleh karena itu perlu dilakukan uji penguat pada media agar cawan EMB (Fardiaz, 1989). Inokulasi 1 lup biakan dari tabung BGLBB pada media agar cawan dengan cara gores kuadran lalu inkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam.
- Tentukan MPN koliform dalam contoh berdasarkan jumlah tabung BGLBB yang menunjukkan adanya pembentukan gas pada 37°C selama 48 jam dan pertumbuhan koloni pada media agar cawan EMB.
- Hitung MPN penguat koliform per g (berat kering sampel).

26) Uji lengkap

- Gores satu koloni tipikal (bagian tengah koloni gelap dengan kilauan hijau metalik untuk *E. coli* atau koloni kecoklatan konvek, mukoid untuk *Enterobacter* dan organisme koliform lain) dari EMB ke media agar miring NA dan inokulasi ke media LSTB. Inkubasi agar miring selama 24 jam dan tabung LSTB selama 48 jam pada suhu 37°C .
- Uji lengkap dilakukan untuk melihat apakah isolat yang diambil benar merupakan bakteri koliform.
- Buat pewarnaan Gram terhadap biakan dalam media agar miring NA dan amati adanya pembentukan gas pada media LSTB. Adanya gas dalam tabung LSTB dan penampakan bakteri Gram negatif, yang tidak membentuk spora merupakan uji lengkap adanya koliform.

Rumus perhitungan

$$\text{Jumlah populasi / (g bk)} = \frac{\text{Nilai MPN X FP}}{\text{b.k. contoh}}$$

Dimana b.k. contoh = berat basah contoh x (1 - kadar air)

(Lihat cara penetapan kadar air pada 2.2.2)

FP (faktor pengenceran) = 1/pengenceran tabung yang di tengah

bk = berat kering contoh

Cara perhitungan

- Setiap hasil pengenceran contoh diinokulasikan masing-masing 1 ml ke dalam 3 tabung LSTB atau BGLBB (MPN dengan tiga tabung). Setelah inkubasi, dilihat tabung yang positif. Kombinasi yang dipilih dimulai dari pengenceran tertinggi yang masih menghasilkan semua tabung positif, sedangkan pada pengenceran berikutnya ada tabung yang negatif. Kombinasi yang dipilih terdiri atas tiga pengenceran.
- Misalnya pada pengenceran 10^{-3} , ketiga tabung menghasilkan pertumbuhan positif, pada pengenceran 10^{-4} dua tabung positif, pada pengenceran 10^{-5} satu tabung positif, dan pada pengenceran 10^{-6} tidak ada tabung yang positif. Kombinasi tabung positif menjadi 3, 2, 1, 0, dan jika diambil tiga pengenceran yang pertama kombinasinya adalah 3, 2, 1. Setelah dicocokkan dengan tabel nilai MPN (lihat lampiran tabel MPN), hasilnya adalah sebagai berikut:

$$\text{Kombinasi} = 3 - 2 - 1$$

Nilai MPN dari tabel MPN untuk tiga tabung = 1,5, maka populasi koliform adalah:

$$\text{Jumlah populasi / (g bk)} = \frac{1,5 \times 10^5}{\text{b.k. contoh}}$$

2.13.3 Ulasan

Pada saat penyiapan media cair dengan tabung Durham diusahakan tidak ada udara yang terperangkap dalam tabung Durham, caranya dengan menutup mulut tabung dengan ibu jari lalu balikan tabung sampai gelembung udara dalam media dan yang terperangkap dalam tabung Durham naik ke atas dan larut, kembalikan tabung ke posisi semula dengan perlahan. Ketika selesai autoklaf, alat jangan langsung dibuka tapi biarkan

sampai suhu turun menjadi 75°C. Pembukaan autoklaf saat suhu tinggi menimbulkan gelembung udara di dalam tabung Durham.

Daftar Pustaka

- Alonso, J.L., A. Soriano, O. Carbajo, I. Amoros, & H. Garelick. 1999. Comparison and recovery of *Escherechia coli* and thermotolerant coliform in water with a chromogenic mediu incubated at 41 and 44,5°C. *Appl. Microbiol. Environ* 65(8): 3746-3749.
- Fardiaz, S. 1989. Analisis Mikrobiologi Pangan. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi, Institut Pertanian Bogor.
- Knowles, R. 1982. Free-living dinitrogen-fixing bacteria. p 1071-1091. *In* A.L. Page, R.H. Miller, & D.R. Keeney (Eds.) *Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties*. American Society of Agronomy, Inc.
- Lynch, J.M. & N.J. Poole. 1979. Water pollution and its prevention. p 226-245. *In* *Microbial Ecology: A Conceptual Approach*. Blackwell scientific Publication. Oxford.
- Raymundo, A.K., A.F. Zamora, & I. F. Dalmacio. 1991. *Manual on Microbiological Techniques*. Technology and Livehood Resources Centre.

Lampiran 1. Tabel nilai MPN (*most probable number*) untuk tiga seri tabung

Jumlah tabung positif				MPN	Jumlah tabung positif			
Seri A	Seri B	Seri C	Seri A		Seri B	Seri C	MPN	
0	0	0	<0,03	2	0	0	0,091	
0	0	1	0,03	2	0	1	0,14	
0	0	2	0,06	2	0	2	0,20	
0	0	3	0,09	2	0	3	0,26	
0	1	0	0,03	2	1	0	0,15	
0	1	1	0,061	2	1	1	0,20	
0	1	2	0,092	2	1	2	0,27	
0	1	3	0,12	2	1	3	0,34	
0	2	0	0,062	2	2	0	0,21	
0	2	1	0,093	2	2	1	0,28	
0	2	2	0,12	2	2	2	0,35	
0	2	3	0,16	2	2	3	0,42	
0	2	0	0,094	2	2	0	0,29	
0	2	1	0,13	2	2	1	0,36	
0	2	2	0,16	2	2	2	0,44	
0	2	3	0,19	2	2	3	0,53	
1	0	0	0,036	3	0	0	0,23	
1	0	1	0,072	3	0	1	0,39	
1	0	2	0,11	3	0	2	0,64	
1	0	3	0,15	3	0	3	0,95	
1	1	0	0,19	3	1	0	0,43	
1	1	1	0,11	3	1	1	0,75	
1	1	2	0,15	3	1	2	1,20	
1	1	3	0,20	3	1	3	1,60	
1	2	0	0,24	3	2	0	0,93	
1	2	1	0,16	3	2	1	1,50	
1	2	2	0,20	3	2	2	2,10	
1	2	3	0,24	3	2	3	2,90	
1	3	0	0,16	3	3	0	2,40	
1	3	1	0,20	3	3	1	4,60	
1	3	2	0,24	3	3	2	11,0	
1	3	3	0,29	3	3	3	>24,00	

PROTOZOA

Rohani Cinta Badia Ginting, Ea Kosman Anwar, & Rosmimik

Tanah kaya dengan berbagai macam fauna baik ukuran maupun cara hidupnya. Protozoa merupakan salah satu kelompok fauna bersel tunggal yang ukurannya sangat beragam dari beberapa mikron sampai 4-5 mm dan hidup di berbagai lingkungan. Kebanyakan dari spesies protozoa terutama yang hidup dalam tanah merupakan organisme mikroskopik yang hanya dapat diteliti dengan menggunakan mikroskop dan dengan pembesaran yang tinggi. Protozoa terdiri atas empat kelompok besar yaitu flagellata, amuba, ciliata, dan sporozoa (Colome *et al.*, 1978) yang masing-masing jumlahnya sekitar 10^3 g^{-1} tanah. Pembagian kelompok ini berdasarkan alat gerak, pembelahan sel, dan tahap siklus hidup (Tabel 1). Panjang flagellata berkisar 5-20 μm , amuba $>50 \mu\text{m}$, sporozoa 45-60 μm , dan ciliata $>100 \mu\text{m}$ (Lousier & Bamforth, 1990).

Dalam interaksinya dengan mikroorganisme, peran utama protozoa adalah menyobek, menginokulasi, dan mengubah serasah tanaman secara kimia. Proses dan lubang penggalian protozoa meningkatkan volume pori dan aerasi tanah serta mencampur partikel-partikel tanah.

Banyak jenis protozoa merupakan predator bakteri, fungi, alga, kapang atau protozoa lainnya. Protozoa membutuhkan 10^3 - 10^5 bakteri untuk setiap bagian sel dan metabolisme harian (Anderson, 1988). Karena itu protozoa banyak digunakan dalam proses penjernihan buangan limbah pabrik kertas. Dengan memanfaatkan protozoa, selain menekan biaya juga mengurangi dampak pencemaran perairan di pembuangan akhir bila dibandingkan dengan penggunaan bahan kimia.

Protozoa meningkatkan mineralisasi dan penyerapan N tanaman melalui rantai makanan. Diperkirakan masukan C tahunan oleh aktivitas protozoa berkisar dari 10-22%. Rata-rata 70% respirasi binatang berasal dari protozoa. Hal ini terjadi karena protozoa berukuran sangat kecil sehingga butuh makanan lebih banyak untuk memenuhi kebutuhannya.

Protozoa dapat beradaptasi lebih cepat terhadap perubahan lingkungan dibandingkan dengan eukariotik lainnya karena membran eksternal yang lunak secara langsung berhubungan dengan lingkungan dan laju pertumbuhannya lebih cepat. Pada kondisi lingkungan yang cocok, waktu generasi protozoa tanah berkisar beberapa jam sampai beberapa hari (Anderson, 1988; Lousier & Bamforth, 1990). Pada kondisi lingkungan yang tidak cocok, protozoa aktif berubah menjadi kista, yaitu suatu tahap dorman dimana protozoa tersebut tidak aktif dan tidak bergerak.

Tabel 1. Karakteristik kelompok utama protozoa

Kelompok taksonomi	Alat gerak	Reproduksi asexual	Reproduksi seksual	Genus yang penting
Filum: <i>Ciliophora</i> Sub-filum: <i>Ciliata</i> (<i>ciliates</i>)	Silia	Pembelahan transversi	Konjugasi	<i>Balantidium</i> <i>Paramecium</i> <i>Vorticella</i>
Filum: <i>Sarcomastigophora</i> (berdaging, berflagela) Sub-filum: <i>Sarcodina</i> (amuba)	Pseudopodia	Pembelahan biner	Fusi gamet	<i>Entamoeba</i> <i>Amoeba</i> <i>Naegleria</i>
Filum: <i>Mastigophora</i> (flagelata)	Flagela	Pembelahan biner	Tidak terlihat	<i>Giardia</i> <i>Trypanosoma</i> <i>Trichomonas</i>
Filum: <i>Apicomplexa</i> Kelas: Sporozoa (sporozoon)	Biasanya tidak bergerak	Skizogoni (pembelahan ganda)	Fusi gamet	<i>Plasmodium</i> <i>Toxoplasma</i> <i>Eimeria</i> <i>Cryptosporidium</i>

Sumber: Colomé *et al.* (1978)

2.14.1 Isolasi

Prinsip

Protozoa dapat diisolasi dengan metode cawan Petri. Contoh tanah basah dalam cawan Petri merupakan suatu sistem ekologi tertutup yang memungkinkan suksesi spesies. Pengamatan dilakukan pada saat protozoa muncul yaitu sekitar 20-30 hari setelah inkubasi dan waktu inkubasi disesuaikan dengan jenis protozoa. Dengan menggunakan metode ini, pertumbuhan beberapa amuba dapat terhambat karena kondisi air yang terlalu basah atau kompetisi dengan protozoa lain. Penggunaan cawan agar yang mengandung bakteri memungkinkan amuba berkembang biak dengan baik, tetapi pertumbuhan ciliata terhambat karena ciliata membutuhkan lapisan air yang lebih tebal di atas permukaan agar.

Alat dan bahan

- Cawan Petri steril diameter 10-15 cm
- Timbangan
- Akuades

Prosedur

Untuk mengisolasi protozoa secara umum dapat dilakukan dengan metode cawan Petri, sedangkan untuk jenis protozoa yang lebih spesifik dilakukan dengan waktu inkubasi yang berbeda. Untuk mengisolasi amuba, selain metode cawan Petri dapat juga digunakan metode cawan agar, sementara metode cawan agar dapat dilakukan dengan cawan gores atau cawan sumur (*well*). Berikut metode cawan Petri untuk mengisolasi protozoa secara umum (Bamforth, 1995).

- Masukkan serasah atau contoh tanah ke dalam cawan Petri sebanyak 10-50 cm dengan tebal minimal 1 cm. Basahi dengan akuades sebanyak 5-20 ml tapi jaga jangan sampai meluap lalu inkubasi pada suhu ruang.
- Inkubasi cawan Petri. Waktu inkubasi tergantung dari jenis protozoa yang diinginkan yakni:
 - 2 – 3 hari untuk mendapatkan flagellata, colpodid, beberapa ciliata lainnya
 - 5 – 6 hari untuk mendapatkan amuba, ciliata kecil, hypotrichs
 - 8 – 10 hari untuk mendapatkan hypotrichs dan amuba
 - 15 - 20 hari terutama untuk mendapatkan amuba
 - 30 hari terutama untuk mendapatkan amuba

2.14.2 Enumerasi Kelimpahan Protozoa dengan MPN (Metode Darbyshire *et al.* (1974) yang dimodifikasi)

Prinsip

Jumlah populasi protozoa pada MPN (*most probable number*) dihitung dari ada atau tidaknya protozoa dalam biakan yang diperoleh dari serial pengenceran tanah yang selanjutnya dibandingkan dengan tabel MPN (Fisher & Yates, 1963). Metode MPN dapat dilakukan dengan metode pengenceran kelipatan dua Singh (1955), Stout (1962), atau metode Darbyshire *et al.* (1974). Metode ini tidak dapat membedakan antara protozoa yang aktif dengan protozoa yang mengkista (Bamforth, 1995).

Metode MPN dapat membedakan flagellata, amuba, dan ciliata. Pada pengenceran yang rendah tetesan harus dipindahkan dari cincin untuk mendapatkan protozoa, tetapi proses pengamatannya dapat dikaburkan oleh partikel-partikel tanah. Pada kondisi biakan tidak optimal, protozoa

bersaing dan saling memangsa satu dengan yang lain. Protozoa yang dorman (terutama amuba) dapat mengkista selama masa inkubasi, sehingga mengaburkan interpretasi antara protozoa yang mengkista dan yang aktif. Bamforth (1995) menggunakan teknik HCl 2% pada sub contoh untuk menghancurkan bentuk yang aktif dan menginkubasi bentuk mengkista yang hidup. Namun demikian, asam juga dapat menghancurkan kista dan menstimulasi beberapa protozoa untuk mengkista yang tidak akan ada dalam contoh yang tidak diberi perlakuan.

Alat

- Cawan Petri steril
- Cawan mikrotiter 96 lubang
- Pipet

Bahan

- Akuades
- Ekstrak tanah
 - Rebus 300 g tanah dalam 1.000 ml akuades selama 10 menit lalu disaring dan disterilisasi dengan autoklaf. Encerkan ekstrak tanah dengan akuades dengan perbandingan 1:5, kemudian sesuaikan pH ekstrak tanah dengan HCl atau NaOH.
- Biakan *Escherichia coli*, *Aerobacter aerogenes*, atau bakteri tanah yang cocok

Prosedur

- Siapkan suspensi tanah dengan perbandingan 1:5 (b/v), gunakan ekstrak tanah sebagai pengencer. Selanjutnya buat serial pengenceran kelipatan dua yaitu 1:10, 1:20, 1:40, dan seterusnya sebanyak 12 tingkat pengenceran.
- Pipet 0,05 ml dari masing-masing pengenceran ke dalam delapan lubang dari 96 lubang pada cawan mikrotiter.
- Inkubasi pada suhu ruang dan lakukan pengamatan dengan interval pengamatan 4 hari. Setelah 1 minggu, tambahkan suspensi bakteri ke dalam lubang-lubang agar kista protozoa (terutama amuba) muncul.
- Hitung jumlah lubang yang negatif dan cocokkan dengan tabel MPN (Fisher & Yates, 1963).

Perhitungan

$$\begin{aligned}x &= X/n \\y &= s - x \\ \log \lambda &= x \log a - K\end{aligned}$$

Keterangan:

- x = *mean* tingkat positif
- X = jumlah total lubang positif
- n = ulangan (jumlah lubang) pada tiap pengenceran
- y = *mean* tingkat negatif
- s = banyaknya tingkat pengenceran
- λ = jumlah populasi per lubang pada konsentrasi tertinggi
- a = faktor pengenceran
- K = konstanta, nilainya dilihat pada tabel berdasarkan nilai x atau y

Contoh: Hasil pengamatan nematoda dengan ulangan 8 lubang per tingkat pengenceran, sebagai berikut:

No.	Tingkat pengenceran	Jumlah lubang positif
1	1 : 10	8
2	1 : 20	8
3	1 : 40	8
4	1 : 80	7
5	1 : 160	7
6	1 : 320	6
7	1 : 640	3
8	1 : 1280	1
9	1 : 2560	0
10	1 : 5120	0
11	1 : 10240	0
12	1 : 20480	0
Total		48

Maka hasil perhitungan adalah sebagai berikut:

$$\begin{aligned}x &= 48/8 = 6 \\y &= 12 - 6 = 6 \\ \log \lambda &= 6 \log 2 - 0,397 = 1,409; \lambda = 25,66\end{aligned}$$

Jumlah populasi protozoa adalah 25.660 per g tanah.

2.14.3 Enumerasi Kelimpahan Protozoa Secara Langsung dari Larutan Tanah

Prinsip

Individu dan spesies dihitung secara langsung dalam suspensi tanah. Ada beberapa metode menghitung protozoa, secara umum dan spesifik jenis protozoa. Sel protozoa secara umum dipisahkan dari partikel tanah dengan sentrifus gradien kerapatan, pewarnaan dengan epifluoresen, dan dikonsentrasikan dengan filter untuk pengamatan secara langsung di bawah mikroskop. Penghitungan secara langsung, khususnya amuba dan ciliata hidup, dilakukan dengan mengkombinasikan sedikit contoh tanah yang dicampur dengan sedikit ekstrak tanah (untuk mengurangi tekanan osmotik) sehingga memungkinkan pengamatan tetes demi tetes contoh tanah untuk mengestimasi jumlah populasi yang aktif. Spesimen hidup dan mati dibedakan dengan pewarnaan.

Alat

- Pipet mikro dan kaca objek
- Inkubator goyang
- Sentrifus dan tabung
- Filter membran warna hitam diameter 25 mm dengan pori ukuran $0,8 \mu\text{m}$
- Pengaduk/stirer magnetik

Bahan

- Bufer Tris 50 mM, pH 7,5
- Iodonitrotetrazolium (INT) 0,4% (w/v)
- Glutaraldehida 25% (v/v)
- Kolom percoll: 5 ml masing-masing percoll, 0,1 ml bufer fosfat
- Diamidinofenil indole (DAPI) $5 \mu\text{g ml}^{-1}$
- Larutan akridin oranye $33 \mu\text{g ml}^{-1}$

Prosedur

- Penghitungan populasi protozoa secara umum adalah dengan metode sentrifusi.
- Larutkan 5 g tanah yang sudah disaring dengan 50 ml bufer Tris lalu goyang menggunakan inkubator goyang selama 10 menit.

- Diamkan selama 1 menit dan kemudian pindahkan 1 ml ke dalam tabung kecil yang berada 5 cm di bawah meniskus dalam tabung. Inkubasi dengan 0,1 ml INT 4% selama 4 jam pada suhu 25°C.
- Tetapkan dengan 0,1 ml glutaraldehid 25% dan kemudian masukkan ke dalam 5 ml kolom fosfat perkol dalam tabung sentrifus polikarbonat steril 15 ml. Biarkan selama 30 menit, lalu sentrifus pada kecepatan 500 rpm selama 2 jam.
- Tuang supernatan dan warnai dengan 1 ml DAPI. Saring dengan filter hitam diameter 25 mm dengan pori 0,8 µm menggunakan penghisap -7 kPa. Warnai dengan larutan akridin oranye.
- Letakkan filter pada kaca objek dan amati protozoa menggunakan mikroskop epifluorescens dan minyak imersi.

Perhitungan

27) Kelimpahan atau jumlah populasi.

Jumlah populasi dihitung per g berat kering atau per meter persegi tanah. Oleh karena itu, kandungan air dan atau kerapatan dari lapisan tanah harus diuji terlebih dahulu dengan metode standar.

$$I. g^{-1} bk = (I_{bb} \cdot 100) / (bb. \% bk)$$

$$I. m^{-2} = (I_{bb} \cdot B. D. 10^4 \cdot 100) / (bb. \% bk)$$

Keterangan:

I	= kelimpahan (jumlah) populasi
I_{bb}	= jumlah populasi dalam tanah basah
Bb	= berat tanah basah (g)
B	= <i>bulk density</i> ($g\ cm^{-3}$)
D	= kedalaman lapisan contoh tanah yang dianalisis (cm)
10^4	= ketetapan <i>bulk density</i> sampai $1\ m^2$ ($1\ m^2 = 10^4\ cm^2$)
$100/\%bk$	= ketetapan untuk berat kering tanah

28) Biomassa

Paling sedikit 10 individu tiap spesies diukur. Volume rata-rata yang diperoleh dapat dihitung setara dengan berat per berat tanah basah karena berat spesifik mikrofauna kira-kira $1\ g\ cm^{-3}$.

$$\text{BM g}^{-1} \text{ bk} = \sum_{i=1}^s I_{ibk} \cdot Bb_i$$

$$\text{BM. m}^{-2} = \sum_{i=1}^s I_i \cdot W_i \cdot 0,15$$

Keterangan:

BM	= biomassa kering
s	= jumlah total spesies
I_{ibk}	= jumlah individu spesies ke i per g berat kering tanah
W_i	= bobot massa per spesies ke i (ng)
0,15	= faktor konversi dari bobot basah ke bobot kering massa
Bk	= berat kering tanah
I_i	= jumlah spesies ke i per m^2

Pada lampiran 2 disajikan contoh beberapa Protozoa yang diambil dari Alexander (1977).

Daftar Pustaka

- Alexander, M. 1977. Introduction to Soil Microbiology. 2nd Ed. John Wiley and Sons. New York. 467 p.
- Anderson, J.M. 1988. Spatiotemporal effects of invertebrates on soil processes. Biol. Fertil. Soils 6: 216-227.
- Bamforth, S.S. 1995. Isolation and Counting of Protozoa. In K. Alef and P. Nannipieri (Eds.), Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry. Acad. Press. New York.
- Colome, J.S., A.M. Kubinski, R.J. Cano, & D.V. Grady. 1978. Laboratory Exercises in Microbiology. West Publ. Co. US.
- Darbyshire, J.F., R.E. Wheatly, & M.P. Greaves. 1974. A rapid micromethod for estimating bacterial and protozoan populations in soil. Revue. Ecol. Biol. Sol. 11: 465-475.
- Fisher, R.A. & F. Yates. 1963. Statistical Tables in Biological, Agricultural, and Medical Research. Oliver and Boyd, Edinburgh.
- Lousier, J.D., and S.S. Bamforth. 1990. Soil Protozoa. In D.L. Dindal (Ed.) Soil Biology Guide. A Wiley-Intersci. Publ. New York.
- Singh, B.N. 1955. Culturing soil protozoa and estimating their numbers in soil. p. 403-411. In Kevan (Ed.) Soil Zoology, Butter worths, London.
- Stout, J.D. 1962. An estimation of microfaunal populations in soils and forest litter. J. Soil Sci. 13: 314-320.

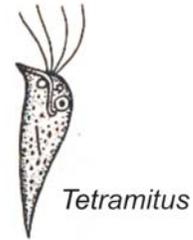
Lampiran 1. Tabel jumlah populasi organisme yang diestimasi dari metode pengenceran (Fisher & Yates, 1963)

x	Tingkat pengenceran							
	4	5	6	7	8	9	10	≥ 11
0,4	,757	,773	,781	,785	,787	,788	,789	,789
0,6	,622	,640	,649	,653	,655	,656	,657	,657
0,8	,537	,556	,556	,571	,573	,574	,575	,575
1,0	,479	,500	,511	,516	,518	,520	,520	,521
1,2	,437	,461	,472	,478	,480	,482	,482	,483
1,4	,406	,432	,444	,450	,453	,455	,456	,456
1,6	,381	,411	,424	,431	,435	,436	,437	,438
1,8	,361	,394	,410	,417	,421	,423	,424	,425
2,0	,344	,382	,399	,408	,412	,414	,415	,416
2,5		,358	,382	,394	,399	,402	,403	,405
3,0			,370	,386	,394	,398	,400	,402
3,5				,379	,390	,396	,399	,401
4,0					,386	,394	,397	,401
4,5						,390	,396	,401
5,0							,394	,401
								,401*
y								
7,0								,399
6,0								,397
5,0							,394	,394
4,5						,390	,390	,390
4,0					,386	,386	,386	,386
3,5				,379	,379	,379	,379	,379
3,0			,370	,370	,370	,370	,370	,370
2,5		,358	,356	,356	,356	,356	,356	,356
2,0	,344	,334	,334	,334	,334	,334	,334	,334
1,8	,327	,323	,323	,323	,323	,323	,323	,323
1,6	,311	,309	,309	,309	,309	,309	,309	,309
1,4	,293	,292	,292	,292	,292	,292	,292	,292
1,2	,271	,271	,271	,271	,271	,271	,271	,271
1,0	,245	,245	,245	,245	,245	,245	,245	,245
0,8	,212	,212	,212	,212	,212	,212	,212	,212
0,6	,167	,167	,167	,167	,167	,167	,167	,167
0,4	,101	,101	,101	,101	,101	,101	,101	,101

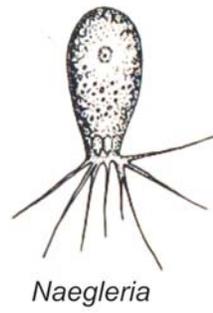
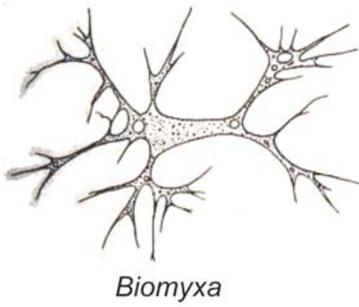
Keterangan: Bila nilai x dan y di luar kisaran nilai x dan y di atas, maka nilai K 0,401

Lampiran 2. Contoh beberapa Protozoa (Sumber: Alexander, 1977).

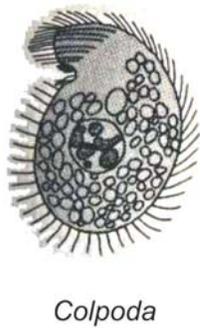
MASTIGOPHORA



SARCODINA



CILIOPHORA



3

ESTIMASI BIOMASSA DAN AKTIVITAS MIKROBA

Biomassa mikroba merupakan salah satu komponen penting dalam bahan organik yang mengatur transformasi dan penyimpanan unsur hara. Secara umum kandungannya berkisar antara 1-3% dari total C-organik dan menyumbang sampai 5% dari total N tanah.

Istilah aktivitas mikroba di dalam bab ini mengacu pada semua reaksi biokimia yang dilakukan mikroba dalam tanah. Beberapa reaksi metabolisme seperti respirasi dan panas yang ditimbulkan merupakan hasil dari aktivitas semua jenis mikroba tanah (termasuk fauna), sedangkan beberapa reaksi seperti yang terkait dengan aktivitas nitrifikasi hanya dilakukan oleh mikroba tertentu yang jumlahnya terbatas. Hasil pengukuran aktivitas metabolisme mikroba di laboratorium dari contoh tanah yang bebas dari flora dan fauna diasumsikan semuanya berasal dari aktivitas mikroba, sedangkan hasil dari pengukuran di lapangan pada tanah alami merupakan gambaran aktivitas dari semua organisme yang mendiami tanah tersebut.

Ada dua macam cara pengukuran aktivitas mikroba dalam contoh tanah, yang beberapa disajikan dalam bab ini, yaitu aktivitas potensial dan aktual. Penambahan substrat seperti glukosa pada contoh yang akan diukur dikategorikan sebagai aktivitas potensial mikroba, sedangkan pada contoh tanpa penambahan substrat merupakan aktivitas aktual mikroba. Pembagian kedua kategori ini sebenarnya hanya untuk membedakan kondisi fisiologis sel-sel aktif mikroba dalam contoh tanah dan bukan merupakan pembagian yang sepenuhnya tepat. Pada pengukuran aktivitas yang benar-benar aktual sudah tentu harus dilakukan di lapangan pada kondisi tanah alami tak terganggu (*undisturb soil*), sedangkan aktivitas potensial justru bisa dilakukan pada contoh tanah di laboratorium dimana suhu dan kelembapan tanah sudah diatur optimal meskipun tidak ada penambahan substrat. Dengan penjelasan ini diharapkan pengguna buku ini menjadi jelas.

Penempatan aktivitas dehidrogenase pada bab ini menunjukkan kesetaraannya dengan prosedur estimasi aktivitas mikroba lainnya seperti aktivitas respirasi karena aktivitas dehidrogenase merupakan indeks dari total aktivitas oksidatif mikroba dalam tanah.

ESTIMASI C-MIKROBA

Edi Santosa & Sri Widati

Biomassa mikroba didefinisikan sebagai bagian dari bahan organik tanah yang terdiri atas makhluk hidup berukuran $\leq 5 - 10 \mu\text{m}^3$ (Alef & Nannipieri, 1995). Pada umumnya biomassa mikroba dinyatakan dalam mg C kg^{-1} tanah atau $\mu\text{g C mg}^{-1}$ tanah, terutama pada tanah yang mempunyai kadar C-organik 1 – 5%. Kadar C-mikroba tanah relatif kecil dibanding dengan C-tanah secara keseluruhan, tetapi mikroba tanah berperan penting dalam keberlangsungan siklus hara. Para peneliti berusaha untuk mengetahui biomassa mikroba sehubungan dengan peran pentingnya dalam menyimpan nutrisi dan energi (Parkinson & Paul, 1982), salah satu pembentuk struktur dan stabilitas tanah, penanda ekologis, dan tempat berkumpulnya (*pool*) hara sebagai cadangan nutrisi (Alef & Nannipieri, 1995).

Pendugaan biomassa mikroba biasanya menggunakan perlakuan biomassa sebagai komponen tunggal, walaupun diketahui bahwa terdapat keragaman populasi berbagai jenis mikroba dengan berbagai perbedaan karakter biokimia tanah. Beberapa metode telah digunakan untuk mengestimasi biomassa mikroba tanah. Untuk menghindari kesalahan perlu ditetapkan bahwa pendugaan biomassa tanah terdiri atas dua aspek (Alef & Nannipieri 1995), yaitu:

1. Kriteria indikator biomassa mikroba: indikator kuantitatif biomassa mikroba hanya diperuntukkan bagi sel-sel mikroba yang hidup dan secara cepat dapat terurai, terlepas ke dalam lingkungan tanah. Kadar senyawa yang terlepas ke lingkungan tanah bersifat konstan dan secara kuantitatif dapat diekstraksi dari tanah. Metode yang dapat dipercaya untuk estimasi indikator ini harus tersedia.
2. Tersedia cara-cara yang memungkinkan untuk mengkalibrasi metode yang digunakan dan perhitungan data ke dalam biomassa.

Aspek-aspek ini saling tergantung sebab teknik estimasi indikator biomassa tanah yang sangat sensitif dan handal akan tidak berguna jika terdapat kelemahan dan cacat bagi metode kalibrasi yang digunakan.

Dalam bab ini disajikan beberapa metode estimasi biomassa mikroba yang telah digunakan oleh para peneliti berdasarkan atas prinsip yang berbeda-beda.

3.1.1 Metode Fumigasi dan Ekstraksi (Vance *et al.*, 1987)

Prinsip

Fumigasi dengan kloroform membunuh dan melarutkan sel mikroba dengan lepasnya sitoplasma ke dalam lingkungan tanah. Bahan-bahan sel dapat diekstraksi dari tanah. Alef & Nannipieri (1995) mengemukakan bahwa C-organik, total N dan $\text{NH}_4\text{-N}$, ninhydrin-reaktif N, C-karbohidrat, C-fenol reaktif dapat diekstraksi dengan 0,5 M K_2SO_4 .

Alat

- Inkubator
- Neraca analitik ketelitian 3 desimal
- Desikator hampa udara (Gambar 1)
- Pompa listrik
- Penggoyang (*Shaker*)
- Alat pendingin
- Kertas saring Whatman No. 42
- Labu ukur 100 ml
- Dispenser 10 ml
- Pipet ukuran 5 ml
- Spektrofotometer



Gambar 1. Desikator (a) dengan pompa penghisap udara (b)

Bahan

- Kloroform (CHCl_3) bebas alkohol
- Kapur soda (p.a.)

- 0,5 M K_2SO_4
 - Larutkan 87,135 g K_2SO_4 dengan akuades sampai volume 100 ml
- Asam sulfat pekat
- Kalium dikromat 1N
 - Larutkan 98,1 g $K_2Cr_2O_7$ dengan 600 ml akuades dalam gelas piala, tambah 100 ml asam sulfat pekat, panaskan hingga larut sempurna, dinginkan, dan tambah akuades sampai volume menjadi 1.000 ml.
- Larutan standar 5.000 ppm C
 - Larutkan 12,51 g glukosa (p.a.) di dalam labu ukur 1.000 ml dengan akuades sampai volume 1.000 ml

Prosedur

- Bagi contoh tanah yang masih lembap (50 g berat kering), menjadi 2 (tiap contoh 25 g berat kering).
- Masukkan contoh tanah yang tidak difumigasi (sebagai kontrol) ke dalam botol ukuran 250 ml dan segera ekstraksi dengan 100 ml 0.5 M K_2SO_4 dengan rasio pengeksrak: berat kering tanah = 4 : 1 (v/w).
- Goyang dengan penggoyang selama 30 menit pada 200 rpm dan saring dengan kertas saring Whatman No. 42.
- Masukkan contoh tanah yang akan difumigasi ke dalam botol ukuran 50 ml.
- Letakkan botol ukuran 50 ml yang berisi contoh tanah basah bersama beker gelas yang berisi 25 ml kloroform bebas alkohol dan botol kapur soda di dalam desikator yang dialasi kertas tisu basah.
- Keluarkan udara dari dalam desikator dengan pompa listrik sampai kloroform mendidih selama 2 menit.
- Inkubasi desikator di tempat gelap selama 24 jam pada suhu 25° C.
- Setelah fumigasi, keluarkan kloroform dan pindahkan tanah ke dalam botol ukuran 250 ml dan segera ekstraksi dengan 100 ml 0,5 M K_2SO_4 dengan rasio pengeksrak : berat kering tanah = 4 : 1 (v/w).
- Goyang dengan penggoyang selama 30 menit pada 200 rpm, saring dengan kertas saring Whatman No. 42.
- Tambahkan 10 ml $K_2Cr_2O_7$ 1 N pada filtrat hasil ekstraksi, kocok, dan tambah 10 ml asam sulfat pekat, kocok. Diamkan selama 30 menit.
- Ukur absorbansi larutan tersebut dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 561 nm.
- Sebagai pembanding, buat larutan standar 0 dan 250 ppm C, dengan memipet 0 dan 5 ml larutan standar 5.000 ppm C ke dalam labu ukur 100 ml (Sulaeman *et al.*, 2005).

Catatan: jika pembacaan contoh melebihi standar tertinggi, penetapan diulangi dengan menimbang contoh lebih sedikit, faktor dalam

perhitungan diubah sesuai berat contoh yang ditimbang. Semua filtrat jika tidak bisa langsung dikerjakan lebih lanjut disimpan pada suhu -5°C .

Perhitungan

$$\begin{aligned}\text{Kadar C-organik (mg kg}^{-1}\text{ tanah)} &= \text{ppm kurva} \times \text{ml ekstrak } 1.000 \text{ ml}^{-1} \\ &\quad \times 100 \text{ mg contoh}^{-1} \times \text{fk} \\ &= \text{ppm kurva} \times 0,25 \times 100 \cdot 2500^{-1} \times \text{fk} \\ &= \text{ppm kurva} \times 0,1 \times \text{fk}\end{aligned}$$

Keterangan:

- pmm kurva = kadar contoh dari kurva hubungan antara kadar deret standar dengan pembacaannya setelah dikoreksi blanko
- fk = faktor koreksi kadar air tanah

$$\text{C-biomassa (}\mu\text{g g}^{-1}\text{ tanah)} = \frac{\text{S} - \text{C}}{0,35}$$

Keterangan:

- S = nilai rata-rata kadar C-organik contoh (dengan kloroform)
- C = nilai rata-rata kadar C-organik kontrol (tanpa kloroform)
- 0,35 = faktor k_{EC} (konversi aliran C ke C-mikroba)

Ulasan

Bobot contoh tanah yang dapat dipakai antara 200 mg – 200 g dengan kelembapan 30 %, pada tanah kering sebagian mikroba tanah tidak terpengaruh/mati oleh fumigasi kloroform. Aktivitas enzim maupun autolisis pada kelembapan < 30 % akan menurun. Kadar air tanah dapat berfluktuasi, biomassa C-mikroba tanah pada kadar air 40 – 50 % hampir sama dengan tanah jenuh air, tetapi jangan diinkubasi dalam suasana anaerob.

Penetapan biomassa juga dapat dilakukan pada tanah lumpur atau tanah sawah, tetapi pada tanah yang padat (dipadatkan) sehingga tidak dapat dipecah, pengukuran biomassa tidak dapat dilakukan dengan metode fumigasi dan ekstraksi.

Selama inkubasi dan fumigasi, kapur soda dapat mengikat CO_2 sehingga membuat tingkat CO_2 tetap rendah, hal ini dapat mempengaruhi hasil pengukuran C-organik. Hasil pengukuran C-organik juga dipengaruhi oleh waktu fumigasi dan suhu saat inkubasi. Waktu fumigasi yang lebih

pendek dan suhu yang lebih rendah akan menghasilkan pengukuran C-organik yang lebih rendah.

Sel-sel akar muda tanaman juga dipengaruhi oleh fumigasi kloroform, sehingga bahan sel akar-muda juga akan terekstraksi oleh K_2SO_4 . Oleh karena itu pada contoh tanah yang mengandung banyak akar muda, sebelum diekstraksi akar tersebut harus dibuang lebih dahulu.

Metode fumigasi dan ekstraksi dapat digunakan pada tanah yang baru saja diberi pembaik tanah zat organik seperti jerami atau glukosa. Pada tanah yang mempunyai kadar bahan organik > 20 % menggunakan rasio tanah : pengekstrak = 1 : 4 dan pada tanah (serasah) berkadar 94% rasio tersebut menjadi 1: 20.

3.1.2 Metode Fumigasi dan Ekstraksi setelah Pra-Ekstraksi (Mueller *et al.*, 1992)

Alat

- Lihat 3.1.1.
- Sentrifus

Bahan

- Lihat 3.1.1.
- 0,05 M K_2SO_4
 - Larutkan 8,714 g K_2SO_4 dengan akuades sampai 100 ml

Prosedur

- Bagi dua contoh tanah yang masih lembap (50 g berat kering), tiap contoh 25 g berat kering.
- Masukkan ke dalam gelas botol ukuran 250 ml, pra-ekstraksi dengan 100 ml 0,05 M K_2SO_4 , dan goyang di penggoyang pada 200 rpm selama 20 menit.
- Saring dengan saringan 2 mm, akar tanaman yang tidak tersaring dibersihkan/dicuci tanahnya dengan mengalirkan 75 ml 0,05 M K_2SO_4 .
- Sentrifus suspensi tanah pada 500 rpm selama 15 menit.
- Tetesi 3 tetes kloroform pada supernatan contoh tanah yang difumigasi dan letakkan botol kapur soda di dalam desikator yang dialasi kertas tisu basah.
- Keluarkan udara dari dalam desikator dengan pompa listrik sampai kloroform mendidih selama 2 menit.
- Inkubasi desikator di tempat gelap selama 24 jam pada suhu 25°C.

- Setelah fumigasi, keluarkan kloroform, pindahkan tanah ke dalam botol ukuran 250 ml dan segera ekstraksi dengan 100 ml 0,5 M K_2SO_4 dengan rasio pengestrak : berat kering tanah = 4 : 1 (v/w), goyang dengan shaker selama 30 menit pada 200 rpm.
- Saring dengan kertas saring Whatman No. 42. Filtrat yang diperoleh selanjutnya dikerjakan seperti pada prosedur 3.1.1.

Perhitungan

Lihat 3.1.1.

Ulasan

Prosedur dengan pra-ekstraksi, penyaringan dan sentrifugase dilakukan jika tanah banyak mengandung akar tanaman. Metode ini lebih akurat dan disarankan terutama untuk pengukuran C-biomassa yang berfluktuasi sepanjang tahun. Tidak bisa dilakukan pada tanah liat dan tanah yang kering.

3.1.3 Metode Oksidasi Bikromat (Vance *et al.*, 1987)

Prinsip

Adanya asam kuat akan mengoksidasi bahan organik, Cr^{6+} direduksi menjadi Cr^{3+} . Jumlah dikromat ($K_2Cr_2O_7$) yang tersisa dapat diketahui dengan titrasi dengan larutan $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$.

Alat

- Inkubator
- Desikator hampa udara
- Pompa listrik
- Penggoyang (*shaker*)
- Alat pendingin
- Kertas saring Whatman No. 42
- Kondenser Lebig
- Labu gelas ukuran 250 ml
- Buret

Bahan

- Kloroform ($CHCl_3$) bebas alkohol

- Kapur soda (p.a.)
- K_2SO_4 0.5 M
 - Larutkan 87,135 g K_2SO_4 dengan akuades sampai 100 ml.
- $K_2Cr_2O_7$ 66,7 mM
 - Larutkan 19,6125 g $K_2Cr_2O_7$ (p.a.) dengan akuades sampai 1.000 ml.
- H_3PO_4 konsentrat (85% p.a.)
- H_2SO_4 konsentrat (98% p.a.)
- Ferro ammonium sulfat $[(NH_4)_2Fe(SO_4)_2 \cdot 6H_2O]$ (p.a.) 40 mM
- Larutan kompleks 1.10-fenantrolin-ferro sulfat 25 mM
- Larutan campuran H_2SO_4/H_3PO_4
 - Campur 2 bagian H_2SO_4 konsentrat dengan 1 bagian H_3PO_4 konsentrat (v/v)
- Larutan titrasi
 - Larutkan 15,69 g $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$ ke dalam 500 ml akuades, tambah 20 ml H_2SO_4 konsentrat dan tambah akuades sampai 1.000 ml.

Prosedur

- Bagi contoh tanah yang masih lembap (50 g berat kering) menjadi dua (tiap contoh 25 g berat kering).
- Tambahkan 2 ml 66,7 mM (0,4 N) $K_2Cr_2O_7$ dan 15 ml campuran H_2SO_4/H_3PO_4 pada 8 ml ekstraksi tanah yang telah disaring di dalam labu gelas ukuran 250 ml, kocok selama 30 menit, dinginkan, dan larutkan dengan 20 – 25 ml akuades lewat kondenser sebagai pembilas.
- Ukur dikromat yang tertinggal dengan titrasi 40 mM larutan ferro ammonium sulfat menggunakan 25 mM larutan kompleks 1.10-fenantrolin-ferro sulfat sebagai indikator.

Perhitungan

$$C (\mu\text{g ml}^{-1}) = (H - S) : N \times M \times D : A \times E \times 1.000$$

Keterangan:

- S = larutan titrasi yang digunakan
- H = larutan titrasi yang digunakan blanko panas
- N = larutan titrasi yang digunakan blanko dingin
- M = normalitas (N)
- D = volume larutan $K_2Cr_2O_7$
- A = aliquot ekstrak
- E = 3 (konversi Cr^{6+} menjadi Cr^{3+})

$$C (\mu\text{g g}^{-1} \text{ tanah}) = C (\mu\text{g ml}^{-1}) \times (K : BK + W)$$

Keterangan:

- K = jumlah ekstraktan
- BK = berat kering tanah (g)
- W = kadar air tanah (% berat kering : 100)

Biomassa C-mikroba = $E_N : K_{EN}$

Keterangan:

- E_N = (C-organik terekstrak dari tanah yang difumigasi - C-organik terekstrak dari tanah yang tidak difumigasi)
- K_{EN} = 0,38 (nilai dikalibrasi ini telah dihitung dengan mengkorelasikan hasil dari inkubasi fumigasi dan ekstraksi fumigasi, Vance *et al.*, 1987)

Ulasan

Metode ini berdasarkan atas asumsi: 1) tingkat oksidasi rata-rata ekstrak C-organik tanah adalah ± 0 dan 2) dikromat hanya dipakai oleh C-organik terekstrak.

Biomassa C-mikroba tanah yang diukur dengan ekstraksi fumigasi berkorelasi nyata dengan biomassa mikroba yang diperoleh dari inkubasi fumigasi dan kadar adenosin trifosfat.

3.1.4 Metode Oksidasi Persulfat Ultra Violet (Wu *et al.*, 1990)

Prinsip

Adanya $K_2S_2O_8$, C-organik terekstrak dioksidasi oleh sinar ultra violet (UV) menjadi CO_2 yang bisa diukur dengan *infrared* (IR) atau spektrofotometer.

Alat

- Inkubator
- Desikator hampa udara
- Pompa listrik
- Penggoyang (*shaker*)
- Alat pendingin
- Kertas saring Whatman No. 42
- *Infrared*: dapat mengukur C secara otomatis

Bahan

- Kloroform (CHCl₃) bebas alkohol
- Kapur soda (p.a.)
- K₂SO₄ 0,5 M:
 - Larutkan 87,135 g K₂SO₄ dengan akuades sampai 100 ml.
- H₃PO₄ konsentrat (85% p.a.)
- K₂S₂O₈ (p.a.)
 - Larutkan 12 g K₂S₂O₈ dengan 900 ml akuades, asamkan dengan H₃PO₄ konsentrat sampai pH 2, dan tambah akuades sampai 1.000 ml.
- Natrium hexametafosfat [(NaPO₄)₆]_n
 - Larutkan 15 g natrium hexafosfat dengan 900 ml akuades, asamkan dengan H₃PO₄ konsentrat sampai pH 2 dan tambah akuades sampai 1.000 ml.

Prosedur

- Bagi contoh tanah yang masih lembap (50 g berat kering) menjadi dua (tiap contoh 25 g berat kering).
- Masukkan contoh tanah yang tidak difumigasi (sebagai kontrol) ke dalam botol ukuran 250 ml dan segera ekstraksi dengan 100 ml 0,5 M K₂SO₄ dengan rasio pengekstrak : berat kering tanah = 4 : 1 (v/w), goyang dengan penggoyang selama 30 menit pada 200 rpm, dan saring dengan kertas saring Whatman No. 42.
- Letakkan contoh tanah yang difumigasi (menggunakan 50 ml botol yang berisi tanah basah), beker gelas yang berisi 25 ml kloroform bebas alkohol, dan botol kapur soda di dalam desikator yang dialasi kertas tisu basah.
- Keluarkan udara dari dalam desikator dengan pompa listrik sampai kloroform mendidih selama 2 menit.
- Inkubasi desikator di tempat gelap selama 24 jam pada suhu 25°C.
- Keluarkan kloroform dan pindahkan tanah ke dalam botol ukuran 250 ml dan segera ekstraksi dengan 100 ml 0,5 M K₂SO₄ dengan rasio pengekstrak: berat kering tanah = 4 : 1 (v/w), goyang dengan penggoyang selama 30 menit pada 200 rpm, dan saring dengan kertas saring Whatman No. 42.
- Campur 5 ml ekstrak tanah dengan 5 ml larutan natrium hexafosfat. Jika ada pengendapan CaSO₄ dalam ekstrak tanah akan terlarut.
- Tempatkan K₂S₂O₈ dalam cawan, UV secara otomatis akan mengoksidasi menjadi CO₂.

Perhitungan

C-organik terekstrak:

$$C (\mu\text{g g}^{-1} \text{ tanah}) = [(S \times D_s) - (B \times D_b)] \times (K : BK + W)$$

Keterangan:

- S = C-tanah dalam $\mu\text{g ml}^{-1}$
- B = C-blanko dalam $\mu\text{g ml}^{-1}$
- D_s = larutan contoh dengan natrium hexametafosfat
- D_b = larutan blanko dengan natrium hexametafosfat
- BK = berat kering contoh tanah dalam g
- W = kadar air tanah (% berat kering : 100).

Biomassa C-mikroba = $E_C : K_{EC}$

Keterangan:

- E_C = (C-organik terekstrak dari tanah yang difumigasi - C-organik terekstrak dari tanah yang tidak difumigasi)
- K_{EC} = 0,45 (nilai dikalibrasi ini telah dihitung dengan mengkorelasikan hasil dari inkubasi fumigasi dan ekstraksi fumigasi, Wu *et al.*, 1990)

Ulasan

Contoh tanah yang banyak mengandung zat organik terlarut (misal kompos) sebaiknya dilarutkan dengan H_2SO_4 . Metode ini memberikan hasil 19% lebih besar dibanding dengan metode oksidasi dikromat.

Tidak dimungkinkan mengukur C-organik dengan $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ pada tanah yang mengandung klorida dengan konsentrasi tinggi. Dalam hal ini juga tidak dimungkinkan untuk menggunakan metode oksidasi persulfat UV sebab klorida mengabsorpsi sebagian besar energi dalam kisaran UV.

3.1.5 Metode Pengukuran Efisiensi Mikroba (Wagner & Wolf, 1998)

Prinsip

Tanah yang diberi senyawa C-organik akan meningkatkan aktivitas mikroba tanah sehingga terjadi peningkatan produksi CO_2 , jumlah CO_2 yang diproduksi bisa diukur. Dengan membandingkan (pengurangan) produksi CO_2 dari contoh tanah yang diberi senyawa C-organik dengan produksi CO_2 dari contoh tanah yang tidak diberi senyawa C-organik dapat dihitung biomassa C-mikroba.

Alat

- Stoples kedap udara
- Botol plastik
- Labu Erlenmeyer
- Beker gelas 500 ml

- Peralatan titrasi

Bahan

- Serbuk jerami
- Larutan barium klorida (BaCl_2) 3,0 M
- Larutan KOH 0,2 M
- Larutan HCl 0,2 N
- Indikator fenolptalin dan metil orange
- Larutan barium klorida

Prosedur

- Masukkan 100 g contoh tanah ke dalam beker gelas ukuran 500 ml, campur dengan 500 mg serbuk jerami (45% C), siram akuades sampai 60% kapasitas lapang, dan inkubasi selama 14 hari pada suhu kamar. Hal yang sama dilakukan juga untuk contoh tanah yang tidak diberi jerami.
- Ukur hasil CO_2 seperti pengukuran CO_2 pada 3.2., kemudian hitung dekomposisinya dan efisiensi mikroba sebagai berikut:

Perhitungan

$$\text{Efisiensi mikroba (E dengan satuan \%)} = \frac{J - K}{C} \times 100 \%$$

Keterangan:

- J = CO_2 hasil pengukuran dari contoh tanah yang diberi jerami
- K = CO_2 hasil pengukuran dari contoh tanah yang tidak diberi jerami
- C = Penambahan C-organik jerami = $500 \times 45 \%$

$$\text{Efisiensi mikroba (E)} = \frac{\text{mg C-biomassa}}{\text{mg C-biomassa} + \text{mg C-CO}_2}$$

$$\text{C-mikroba (mg)} = \frac{E}{1 - E} (\text{mg C-CO}_2)$$

Keterangan:

- $\text{mg C-CO}_2 = E \times 500 \times 45\%$

Ulasan

Dari pemakaian metode ini dapat diketahui perubahan bentuk dan besarnya transformasi C-jerami. Sebagian C-jerami ditransformasi menjadi CO₂ sebesar E, bagian sel mikroba sebesar C-mikroba, dan bagian dari bahan organik tanah sebesar [C-jerami – C-CO₂ – C-mikroba]

3.1.6 Metode Fumigasi Inkubasi (Kuhnert & Finkernagel, 1995)

Prinsip

Fumigasi dengan uap kloroform akan membunuh organisme, organisme tanah yang telah mati akan segera mengalami proses mineralisasi. Kemudian tanah diinokulasi kembali dengan contoh tanah yang tidak difumigasi, selanjutnya diinkubasi selama 10 hari untuk memberi kesempatan terjadinya proses mineralisasi biomassa yang baru mati. Kloroform menyebabkan peningkatan produksi CO₂ karena terjadi peningkatan peruraian biomassa yang mati tersebut. Gejala ini bisa digunakan untuk pengukuran biomassa tanah.

Alat

- Kolom gelas dengan saluran penyaringan
- Botol bertutup ukuran 1.000 ml
- Tabung plastik sentrifus
- Kertas saring
- Butiran *anti-bumping*

Bahan

- Alumunium oksida
- Kloroform bebas alkohol
 - Saring 70 ml kloroform melewati kolom gelas dengan 50 ml alumunium oksida, saring kembali 50 ml hasil penyaringan. Kloroform bebas alkohol dapat disimpan di tempat gelap selama 14 hari.
- Larutan barium klorida 1 M
 - Larutkan 20,8 g barium klorida dengan akuades dan encerkan sampai volume 100 ml dalam gelas ukur.
- Larutan asam hidroklorida (0,1 M titrisol)

- Larutan natrium hidroksida (0,1 M titrisol)
- Larutan indikator: Masukkan 0,1 g fenolptalin ke dalam 100 ml gelas ukur dan tambah etanol (60% v/v) sampai volume menjadi 100 ml.

Prosedur

- Timbang 150 – 200 g tanah dan masukkan ke dalam 4 botol gelas kecil.
- Masukkan 2 botol gelas kecil yang berisi contoh tanah tersebut bersama beker gelas yang berisi 5 ml kloroform bebas alkohol dan butiran *anti-bumping* ke dalam desikator yang dialasi kertas tisu basah.
- Keluarkan udara dari dalam desikator sampai kloroform mendidih, tutup desikator, inkubasi pada tempat gelap pada suhu kamar selama 24 jam.
- Keluarkan kloroform.
- Perlakukan 2 botol gelas kecil lainnya dengan cara yang sama tetapi tanpa kloroform.
- Pindah tanah yang tidak difumigasi, beri tanah yang difumigasi sebesar 1 %.
- Timbang 20 – 40 g tanah, masukkan ke dalam 8 tabung sentrifugase (4 contoh, 4 kontrol), ~~segera tutup botol berisi 30 ml natrium hidroksida~~ dan inkubasi selama 10 hari pada ruang gelap bersuhu 25°C.
- Sentrifus setiap 3 hari sekali dengan botol baru yang berisi larutan natrium hidroksida. Pada saat yang sama amati kelembapan tanah yang hilang selama inkubasi dan tambah akuades sebanyak air yang hilang.
- Tambah 30 ml larutan natrium hidroksida pada 4 botol blanko sebagai kontrol tetapi tanpa tanah.
- Ukur produksi CO₂ seperti pada 3.2.

$$D = \frac{(B - C) 0,6 \times 100 \times 100}{\text{bt. \% dm}}$$

Perhitungan

$$X = \frac{(B - S) 0,6 \times 100 \times 100}{\text{bt. \% dm}}$$

Keterangan:

- B = volume rata-rata HCl (ml) yang dikonsumsi oleh blanko.

$$\text{BM} = \frac{X - D}{0,45}$$

- S = volume rata-rata HCl (ml) yang dikonsumsi contoh tanah yang difumigasi.
- C = volume rata-rata HCl (ml) yang dikonsumsi contoh tanah yang tidak difumigasi
- bt = berat contoh tanah.
- $100\%^{-1}dm$ = faktor berat kering tanah.
- X, D = rata-rata CO_2 dari contoh tanah dan kontrol ($mg\ CO_2-C\ 100\ g^{-1}dm\ 10\ hari^{-1}$).
- BM = C- biomassa ($mg\ 100g^{-1}dm$).
- 0,6 = faktor konversi (1ml 0,1 M HCl berhubungan dengan 0,6 mg CO_2-C).
- 0,45 = faktor k_c , bagian dari C-biomassa yang mengalami mineralisasi menjadi CO_2 selama inkubasi setelah fumigasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Alef, K. & P. Nannipieri. 1995. Microbial biomass. p. 375-381. *In* K. Alef & P. Nannipieri (Eds.). *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press. Harcourt Brace & Company Pub. London.
- Joergensen, R. 1995. The fumigation extraction method. p. 382-387. *In* K. Alef & P. Nannipieri (Eds.). *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press. Harcourt Brace & Company Pub. London.
- Kuhnert, R. & Finkernagel. 1995. Biomassa-C by fumigation-incubation technique. p. 52-56. *In* F. Schinner, R. Ohlinger, E. Kandeler, & R. Margesin (Eds.) *Methods in Soil Biology*. Springer
- Mueller, T., R.G. Joergensen, & B. Meyer. 1992. Estimation of soil microbial biomass C in the presence of fresh roots by fumigation extraction. *Soil Biol Biochem* 24: 179 – 181.
- Parkinson, D. & E.A. Paul. 1982. Microbial biomass. p. 821-830. *In* A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Keeney (Eds.) *Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties*. 2nd ed. Am. Soc. of Agronomy Inc., Soil Sci. Soc. of Am. Inc. USA.
- Sulaeman, Suparto, & Eviati. 2005. *Petunjuk Teknis Analisis Kimia Tanah, Tanaman, Air, dan Pupuk*. Balai Penelitian Tanah. Badan Litbang Pertanian. Deptan.
- Vance, E.D., P.C. Brookes, & D.S. Jenkinson. 1987. An extraction for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biol Biochem* 19: 703 – 707.

- Wagner, H.G. & D.C. Wolf 1998. Carbon transformation and soil organic matter formation. p. 218-257. *In* D.M. Sylvia, J.J. Fuhrmann, P.G. Hartel, & D.A. Zuberer (*Eds.*) Principles and Applications of Soil Microbiology. Prentice Hall New Jersey.
- Wu, J., R.G. Joergensen, B. Pommerening, R. Chausod, & P.C. Brooks. 1990. Measurement of soil microbial biomass C - an automated procedure. *Soil Biol Biochem* 22: 1167 – 1169.

3.2

RESPIRASI TANAH

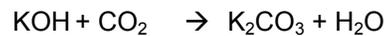
Sri Widati

Respirasi tanah merupakan salah satu indikator aktivitas mikroba di dalam tanah. Pada proses respirasi terjadi penggunaan O_2 dan pembebasan CO_2 , sehingga tingkat respirasi dapat ditentukan dengan mengukur O_2 yang digunakan oleh mikroba tanah (Alexander, 1971; Anas, 1989). Pengukuran respirasi dapat dilakukan pada tanah tidak terganggu (*undisturbed soil sample*) di lapangan maupun dari contoh tanah yang diambil (*disturbed soil sample*).

Pengukuran respirasi di lapangan dilakukan dengan memompa udara tanah atau dengan menutup permukaan tanah dengan bejana yang volumenya diketahui. Selain itu, bisa juga dengan membenamkan tabung untuk mengambil contoh udara di dalam tanah. Pengukuran di laboratorium meliputi penetapan CO_2 yang dihasilkan dari sejumlah contoh tanah yang kemudian diinkubasi dalam jangka waktu tertentu.

Tingkat respirasi tanah ditetapkan dari tingkat evolusi CO_2 . Evolusi CO_2 tanah dihasilkan dari dekomposisi bahan organik. Dengan demikian, tingkat respirasi adalah indikator tingkat dekomposisi bahan organik yang terjadi pada selang waktu tertentu.

Penetapan CO_2 yang berlangsung dengan KOH sebagai penangkap CO_2 , adalah sebagai berikut:



3.2.1 Prinsip

Metode ini didasarkan pada pengukuran CO_2 di dalam tanah pada periode waktu tertentu. Larutan NaOH atau KOH yang digunakan berfungsi sebagai penangkap CO_2 yang kemudian dititrasi dengan HCl. Jumlah HCl yang diperlukan untuk titrasi setara dengan jumlah CO_2 yang dihasilkan.

3.2.2 Pengukuran CO_2 dalam Botol Tertutup

Alat

- Buret
- Stoples plastik kedap udara
- Botol plastik
- Stirer
- Labu Erlenmeyer
- Corong
- Beker gelas

Bahan

- KOH 0,2 N
- BaCl₂ 3 N
- HCl 0,2 N
- Indikator fenoptalin dan metil orange 0,1% (1 g/100 ml alkohol 96%).

Prosedur

- Masukkan 100 g contoh tanah pada kapasitas lapang ke dalam stoples, dan 1 botol plastik terbuka berisi 10 ml 0,2 N KOH (untuk mengikat gas CO₂ yang dilepaskan dari respirasi mikroba dalam contoh tanah), lalu stoples ditutup rapat (kedap udara) selama inkubasi 7 hari. Cara yang sama dilakukan untuk kontrol, yaitu stoples yang tidak diisi contoh tanah. Setelah 7 hari, ambil botol plastik yang berisi KOH dan CO₂ yang sudah terikat, lalu tambahkan 2 tetes indikator fenoptalin dan titrasi dengan 0,2 N HCl sampai warna larutan berubah dari merah muda (*pink*) menjadi bening.
- Selanjutnya tetesi KOH dengan 2 tetes metil orange sehingga larutan berubah menjadi kuning. Titrasi kembali dengan HCl 0,2 N sampai warna kuning berubah menjadi oranye.
- Kadar CO₂ pada masing-masing perlakuan diperoleh setelah dikurangi kadar CO₂ pada stoples tanpa tanah (blanko). Kadar air tanah ditentukan setelah pengukuran CO₂ dan hasil dinyatakan dalam berat kering oven 105⁰ C.

Perhitungan

$$(a - b) \times t \times 2,4 \times 100$$

$$r = \frac{\quad}{n}$$

Keterangan:

- r = jumlah CO₂ yang dihasilkan
- a = ml HCl untuk stoples dengan contoh tanah
- b = ml HCl untuk stoples tanpa contoh tanah (blanko)
- t = normalitas HCl (lihat perhitungan t di bawah)
- n = jumlah hari inkubasi
- 100 = 100 g contoh tanah
- 2,4 = dari perhitungan sbb :

$$1 \text{ ml HCl } 0,2 \text{ N} = 1 \times 0,2 = 0,2 \text{ me HCl}$$

$$0,2 \text{ me HCl setara } 0,2 \text{ me CO}_2$$

$$0,2 \times 44 \text{ mg CO}_2 = 8,8 \text{ mg CO}_2 \text{ (berat molekul CO}_2 = 44)$$

$$C / \text{CO}_2 = (12 / 44) \times 8,8 \text{ mg} = 2,4 \text{ mg CO}_2\text{-C}$$

Penentuan normalitas :

- Masukkan 16,67 ml HCl 37% (12 N) ke dalam labu ukur 1 l, kemudian encerkan dengan akuades sampai volume 1.000 ml.
- Masukkan 9,535 g boraks (Na₂B₄O₇.H₂O BM = 381,42) ke dalam labu ukur 250 ml dan encerkan dengan akuades sampai volume 250 ml.
- Masukkan 10 ml boraks dan 2 tetes indikator metil orange ke dalam labu Erlenmeyer, lalu titrasi dengan HCl.

Perhitungan :

$$t = \frac{a \text{ mg}}{381,42 / 2}$$

$$t = \text{normalitas HCl}$$

Catatan: Karena HCl yang distandarisasi 0,2 N maka larutan yang dipakai boraks 0,2 N

3.2.3 Pengukuran CO₂ di lapang (Alef, 1995)

Alat

- Logam silinder atau ring PVC (tinggi 30 cm, diameter 25 cm)
- Botol gelas bertutup (tinggi 7 cm, diameter 6,5 cm)
- Tripod terbuat dari logam atau plastik atau ring PVC

Bahan

- Larutan NaOH 1 N
- BaCl₂ 3 N
- HCl 1 N
- Indikator fenoptalin
 - Larutkan 1 g fenoptalin dengan 80 ml alkohol 95%, kemudian tambahkan alkohol 95% sampai volume 100 ml.
- Indikator metil orange
 - Larutkan 1 g metil orange dengan 80 ml alkohol 95%, kemudian tambahkan alkohol 95% sampai volume 100 ml.

Prosedur

- Pipet 20 ml larutan NaOH ke dalam botol gelas dan tempatkan di atas tripod di permukaan tanah. Dengan segera tempatkan ring PVC menutupi larutan NaOH dan tekan sisinya sampai kedalaman 2 cm dari permukaan tanah.
- Rangkaikan peralatan dan usahakan terlindung dari sinar matahari langsung (gunakan aluminium foil).
- Setelah inkubasi selama 24 jam atau lebih, ambil NaOH pada botol gelas dan bawa ke laboratorium untuk titrasi dengan HCl.
- Masukkan 100 g contoh tanah pada kapasitas lapang ke dalam stoples, dan 1 botol plastik terbuka berisi 10 ml 0,2 N KOH (untuk mengikat gas CO₂ yang dilepaskan dari respirasi mikroba dalam contoh tanah), lalu stoples ditutup rapat (kedap udara) selama inkubasi 7 hari. Cara yang sama dilakukan untuk kontrol, yaitu stoples tidak diisi contoh tanah.
- Setelah 7 hari, ambil botol plastik yang berisi KOH dan CO₂ yang sudah terikat, lalu tambahkan 2 tetes indikator fenoptalin dan titrasi dengan 0,2 N HCl sampai warna larutan berubah dari merah jambu menjadi bening.
- Tetesi KOH tersebut dengan 2 tetes metil orange hingga larutan berubah menjadi kuning. Selanjutnya, titrasi kembali dengan HCl 0,2 N sampai warna kuning berubah menjadi oranye.

Perhitungan:

Evaluasi jumlah CO₂ yang dihasilkan dengan persamaan sebagai berikut:

$$C \text{ atau } \text{CO}_2 \text{ (m}^{-2} \text{ jam}^{-1}) = (B - V) NE$$

B = HCl yang diperlukan untuk titrasi NaOH pada kontrol.

V = HCl yang diperlukan untuk titrasi larutan NaOH pada contoh

N = Normalitas HCl yang digunakan (=1N)

E = Berat equivalent (22 untuk CO₂ dan 6 untuk C)

Data dihitung sebagai mg CO₂ m⁻² jam⁻¹

3.2.4 Ulasan

Pelepasan CO₂ sangat tergantung pada sifat fisik dan kimia tanah yang diteliti. Suhu dan kandungan air tanah mempengaruhi kecepatan produksi CO₂. Kadar CO₂ yang diukur pada dasarnya merupakan hasil dari respirasi mikroba, binatang, akar tanaman, dan produksi CO₂ abiotik. Dalam pengukuran, perlu diusahakan agar struktur tanah tidak terganggu.

Daftar Pustaka

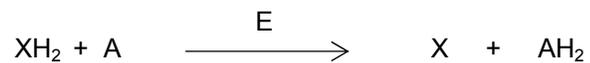
- Alef, K. 1995. Estimation of soil respiration. p 464-467. *In* K. Alef & P. Nannipieri (*Eds.*) *Methods in Applied soil microbiology and Biochemistry*. Academic Press. London.
- Alexander, M. 1971. *Introduction to Soil Microbiology*. John Wiley and Sons. New York.
- Anas, I. 1989. *Petunjuk Laboratorium Biologi Tanah dan Praktek*. Pusat Antar Universitas Bioteknologi. Institut Pertanian Bogor. Bogor.

AKTIVITAS DEHIDROGENASE

Erny Yuniarti & Rasti Saraswati

Aktivitas dehidrogenase merupakan salah satu indikator metabolisme oksidatif mikroba yang berlangsung secara intraselular pada sel-sel hidup (viabel). Di dalam tanah, dehidrogenase menjadi bagian integral dari sel-sel utuh dan tidak berakumulasi secara ekstraselular. Aktivitas dehidrogenase menunjukkan aktivitas rata-rata populasi mikroba aktif.

Pada lintasan katabolisme, reaksi biologis berlangsung oksidatif dan eksergonik (menghasilkan energi). Berbagai dehidrogenase spesifik mengkatalisis reaksi dehidrogenasi, yaitu memotong hidrogen dari substrat bahan organik. Keseluruhan proses dehidrogenasi dipresentasikan sebagai berikut:



dimana XH_2 adalah senyawa organik (donor hidrogen dan elektron), A adalah penerima hidrogen dan elektron, E adalah dehidrogenase, X adalah senyawa hasil oksidasi dan AH_2 adalah pereduksi.

Enzim reaksi dehidrogenasi (E, dehidrogenase) adalah suatu flavoprotein (protein yang mengandung gugus flavin) yaitu dehidrogenase yang berikatan dengan koenzim NAD^+ atau NADP^+ dan dehidrogenase yang berikatan dengan gugus flavin (suksinat dehidrogenase dan acyl-CoA dehidrogenase). Ion H^+ dan elektron yang lepas ditransfer ke salah satu penerima (A) pyridin nukleotida, NAD^+ atau NADP^+ (tergantung kekuatan potensial oksidasi-reduksi substrat). Koenzim FAD (*flavin adenine dinukleotide*) berperan sebagai penerima hidrogen apabila pereduksi terlalu lemah untuk NAD karena potensial oksidasi-reduksinya lebih positif dari NAD/NADH₂. Melalui koenzim NAD atau NADP, hidrogen mengalir ke rantai respirasi yang bergandengan dengan fosforilasi oksidatif, yaitu reaksi pembentukan energi ATP (Adenosine-5'- triphosphate).

Reaksi oksidasi berasosiasi dengan pelepasan energi bebas yang beberapa ditangkap oleh sel melalui fosforilasi substrat dan disimpan dalam bentuk ATP. Komponen utama rantai respirasi adalah protein yang memiliki gugus prostetik dengan potensial oksidasi-reduksi berada di antara NAD (flavoprotein dan protein Fe-S) atau FAD (suksinat dehidrogenase) dan oksigen molekular sebagai penerima elektron terakhir.

Dalam membran sitoplasma bakteri, protein komponen rantai respirasi tersusun sedemikian rupa sehingga kekuatan pereduksi NADH₂

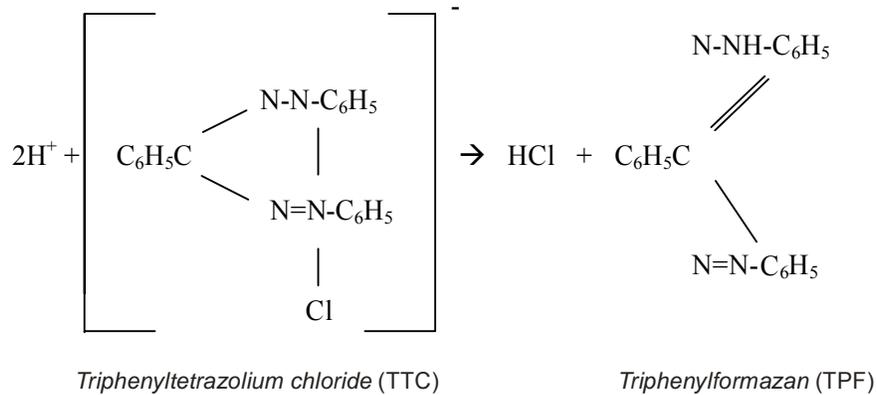
Substrat	Larutan pengekstrak formazan	Panjang gelombang (nm)
INT	Etanol:dimethylformamida (1:1)	490 (Camina <i>et al.</i> , 1998)
		464 (von Mersi & Schinner, 1991)
TTC	Etanol	484 (Ghaly <i>et al.</i> , 1989)
		485 (Casida, 1964)
	Metanol	485 (Tabatabai, 1994)
		546 (Alef, 1995)
		485 (Frieder <i>et al.</i> , 1994)

Metode TTC yang diuraikan dalam tulisan ini telah dilakukan di laboratorium penulis. Metode tersebut merupakan modifikasi metode Casida (1964) dan Thalman 1968 yang telah dimodifikasi (Ohliger, 1995) yaitu menggunakan konsentrasi substrat TTC 3%, waktu inkubasi 37°C selama 24 jam, bufer tris-HCl dengan pH tergantung contoh tanah, dan larutan ekstraksi methanol. Penggunaan TTC 3% dan waktu inkubasi 37°C selama 24 jam dipilih karena yang umum dilakukan serta penggunaan bufer tris-HCl dipilih karena penggunaannya lebih luas untuk contoh tanah dengan berbagai nilai pH sedangkan CaCO₃ hanya dikhususkan untuk tanah-tanah masam. Keuntungan menggunakan larutan ekstraksi methanol karena tidak merusak bahan kuvet dan hasilnya sama baiknya dengan aseton.

3.3.1 Aktivitas Dehidrogenase dengan Substrat TTC (modifikasi metode Casida, 1964; Ohliger, 1995)

Prinsip

Metode ini berdasarkan estimasi laju reduksi *triphenyltetrazolium chloride* (TTC) menjadi *triphenylformazan* (TPF) di dalam tanah setelah inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. TPF yang dihasilkan diekstrak dengan metanol, kemudian diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 485 nm. Gambar 1 menyajikan reaksi reduksi garam tetrazolium TTC membentuk formazan:



Gambar 1. Reduksi TTC (tidak berwarna) menjadi formazan (berwarna merah)

Alat

- Labu takar 100 ml dan 1.000 ml
- Tabung reaksi berulir
- Vortex
- Pipet mikro 1.000 μL dan pipet serologis 5 ml, 10 ml
- Spektrofotometer dan kuvet

Bahan

- Bufer Tris-HCl (0,1 M)
 - Larutkan 12,11 g *tris(hydroxymethyl)aminomethane* dengan 700 ml akuades dalam labu takar 1.000 ml dan sesuaikan pH larutan dengan HCl pekat menjadi:
 - pH 7,8 untuk tanah asam (pH < 6)
 - pH 7,6 untuk tanah netral (pH 6-7)
 - pH 7,4 untuk tanah-tanah yang kayak akan karbonat (pH > 7)
 Lengkapi volume larutan menjadi 1.000 ml dengan akuades.
- Larutan substrat TTC 3%
 - Larutkan 3 g TTC dengan bufer Tris-HCl (pH bergantung pH contoh tanah) lalu lengkapi volumenya menjadi 100 ml. Simpan larutan dalam keadaan gelap pada suhu 4°C hingga 1 minggu.
- Pengekstrak TPF
- Metanol
- Larutan stok standar (500 μg TPF ml^{-1})
 - Larutkan 50 mg TPF dengan metanol dalam labu takar 100 ml, lalu lengkapi volumenya menjadi 100 ml dengan metanol.

Prosedur

- Timbang masing-masing 5 g tanah lembap dan masukan ke dalam 4 tabung reaksi bertutup ulir (diameter 2 cm dan volume minimal 30 ml), lalu tambahkan 5 ml larutan TTC ke tiga tabung reaksi. Tutup tabung dengan tutupnya. Tabung keempat (kontrol) hanya mengandung 5 ml bufer Tris-HCl (tanpa TTC).
- Aduk campuran reaksi dengan vortek (jangan sampai memercik), lalu inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.
- Setelah inkubasi, tambahkan 20 ml metanol ke dalam masing-masing tabung, lalu semua tabung dikocok pada suhu ruang selama 2 jam dalam keadaan gelap dengan mesin pengocok. Suspensi tanah kemudian difilter atau disentrifus 10.000 rpm 5 menit. Endapan yang tersisa dalam tabung ditambah kembali dengan 20 ml metanol, lalu dikocok dan difilter atau disentrifus 10.000 rpm 5 menit.
- Supernatan yang jernih, campuran ekstraksi pertama dan kedua diukur nilai absorbansinya pada 485 nm (warna merah). Warna merah TPF stabil dalam 1 jam.

Kurva kalibrasi

- Pipet 0; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 dan 4,0 larutan standar TPF dalam labu takar (50 ml), tambahkan 8,3 ml bufer Tris-HCl (tergantung pH tanah) dan lengkapi volume dengan menambahkan metanol sehingga konsentrasi akhir menjadi: 0; 2,5; 5; 10; 15; 20; 25; dan 35 µg TPF ml⁻¹. Ukur absorbansi semua larutan dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 485 nm. Kurva standar adalah hubungan antara nilai absorbansi (Y) dengan konsentrasi TPF (X).

Perhitungan

- Tentukan µg TPF dalam filtrat dengan cara mengkonversikan nilai absorbansi contoh dan kontrol menjadi konsentrasi TPF dengan melihat pada persamaan kurva kalibrasi.
- Koreksi nilai kontrol, yaitu mengurangi konsentrasi TPF contoh dengan konsentrasi TPF kontrol.
- Kalkulasikan aktivitas dehidrogenase dengan rumus sebagai berikut:

Aktivitas dehidrogenase,

$$\text{TPF } (\mu\text{g})/\text{BK (g)} = \frac{\text{TPF } (\mu\text{g})/\text{ml} \times 45}{\text{BK} \times 5}$$

BK = berat kering 1 g tanah lembap

5 = berat tanah yang digunakan (g)

45 = volume larutan yang ditambahkan ke dalam contoh tanah (ml)

3.3.2 Metode Aktivitas Dehidrogenase Dengan Substrat INT (Von Mersi & Schinner, 1991)

Prinsip

Metode ini berdasarkan inkubasi tanah dengan substrat INT pada suhu 40°C selama 2 jam. INTF yang tereduksi diekstrak dengan dimetilformamida dan etanol, lalu diukur secara fotometri pada 464 nm.

Alat

- Tabung reaksi bertutup ulir
- Labu takar 100 ml dan 250 ml
- Pipet 5 ml dan 10 ml
- Inkubator
- Mesin pengocok (*shaker*)

Bahan

- HCl encer (3 M)
 - Campur 100 ml HCl pekat (37%) dengan 300 ml akuades.
- Bufer Tris (1 M, pH 7)
 - Timbang 30,28 g *tris(hydroxymethyl)aminomethane* dalam labu takar 250 ml, lalu larutkan dengan 200 ml akuades dan sesuaikan pH menjadi 7 dengan HCl. Selanjutnya, volume dijadikan 250 ml dengan menambah akuades.
- Larutan substrat
 - Campur 500 mg INT dengan 2 ml N,N-dimethylformamide dalam labu takar 100 ml, lalu kocok dengan kuat. Buat volumenya menjadi 100 ml dengan menambah akuades. Pelarutan dilakukan dalam *ultrasonic bath*. Siapkan reagen tersebut setiap akan analisis, dan simpan pada kondisi gelap sampai digunakan.
- Larutan ekstraksi
 - Campur 100 ml N,N-dimethylformamide dengan 100 ml etanol 96% (v/v).
- Larutan stok standar (100 µg INT ml⁻¹)
 - Timbang 10 mg *iodonitrotetrazolium formazan* (INTF) dalam labu takar 100 ml, larutkan dengan 80 ml larutan ekstraksi, kemudian lengkapi volumenya dengan larutan ekstraksi.

Kurva kalibrasi

- Pipet 0 (blanko), 1, 2, dan 5 ml larutan stok standar INTF ke dalam 4 tabung reaksi, lalu tambahkan 13,5 ml larutan ekstraksi. Standar kalibrasi sesuai dengan 0, 100, 200, dan 500 µg INTF.

Prosedur

- Timbang masing-masing 1 g tanah lembap ke dalam 3 tabung reaksi, lalu tambahkan 1,5 ml bufer Tris dan 2 ml larutan substrat. Tutup tabung reaksi, kocok sebentar, lalu inkubasi selama 2 jam pada suhu 40°C pada kondisi gelap.
- Siapkan kontrol dengan tanah yang diautoklaf (20 menit; 121°C; 0,1 MPa) dan perlakukan seperti terhadap contoh tanah.
- Setelah inkubasi, tambahkan 10 ml larutan ekstraksi pada masing-masing tabung. Untuk ekstraksi INTF yang terbentuk simpan tabung selama 1 jam pada suhu ruang pada keadaan gelap, lalu kocok dengan kuat setiap 20 menit.
- Segera setelah penyaringan, ukur kandungan INTF contoh, kontrol dan standar kalibrasi secara fotometri pada 464 nm terhadap blanko reagen.

Perhitungan

Aktivitas dehidrogenase diekspresikan sebagai µg INTF per gram berat kering dan waktu inkubasi.

$$\text{Aktivitas dehidrogenase (INTF } \mu\text{g.g}^{-1} \text{ bk } 2\text{h}^{-1}) = (S1 - S0) / \text{bk}$$

S1 = INTF contoh (µg)
S0 = INTF kontrol (µg)
Bk = berat kering 1 g tanah

3.3.3 Ulasan

Beberapa catatan berikut penting untuk diperhatikan dalam analisis dehidrogenase, yaitu:

- Umumnya garam tetrazolium TTC , TPF, dan INTF sensitif cahaya sehingga untuk seluruh prosedur harus dilakukan dalam ruangan dengan lampu difusi.
- Metode reduksi TTC yang telah diuraikan membutuhkan standarisasi ketat tentang kondisi reaksi untuk mendapatkan hasil yang dapat dibandingkan. Bahkan hubungan antara berat tanah dan diameter tabung reaksi adalah penting karena perbedaan aerasi.

- Aktivitas dehidrogenase dengan TTC pada tanah-tanah anaerobik tidak disarankan sebagai ukuran untuk aktivitas biologi tanah karena komponen abiotik seperti senyawa-Fe(II) atau sulfida dapat mereduksi TTC.
- Nilai pH contoh dan suhu inkubasi sebaiknya tidak lebih dari pH 9 dan suhu 60°C untuk menjamin reduksi TTC hanya aktivitas dehidrogenase. Persentase tertinggi reduksi secara kimia ditunjukkan pada pH 12 dan suhu inkubasi 40°C. Pada pH 13 tidak ada aktivitas reduksi TTC secara kimia.
- Pengukuran intensitas warna TPF pada contoh limbah yang mengandung Cu dapat menghasilkan kesalahan baca karena terbentuk kompleks Cu formazan yang mengurangi warna merah.
- Ukuran perbandingan O₂ yang dipakai dan CO₂ yang dikeluarkan memperlihatkan bahwa hanya 2-3% hidrogen yang dihasilkan termasuk dalam reduksi TTC. Hal ini disebabkan sbb:
 - TTC menghambat turnover hidrogen oleh mikroba karena toksisitasnya.
 - Hidrogen total tidak ditransfer ke TTC. TTC dihambat secara kompetitif sebagai penerima hidrogen dan reduksi terjadi hanya setelah penerima hidrogen lain habis.
 - Suatu sel hanya mengambil TTC dalam jumlah terbatas, yang pada akhirnya membatasi reduksi TTC (TPF terakumulasi dalam sel dan dapat menyebabkan sel meledak).
 - Oksigen ikut campur dalam reduksi TTC sehingga determinasi aktivitas dehidrogenase dengan TTC sebagai aseptor elektron memiliki reproduktibilitas yang rendah.
- Karena hanya reduksi biotik INT yang terukur maka kemungkinan reduksi INT secara kimia (non-mikrobal) oleh kation seperti Fe²⁺, konsentrasi garam dan kekuatan ion yang tinggi harus dikoreksi dengan kontrol yaitu tanah yang diautoklaf. Sebagai alternatif koreksi, inkubasi tanah lembap dengan bufer, tambahkan substrat segera setelah inkubasi dan sebelum filtrasi. Aktivitas dehidrogenase yang ditentukan dengan cara ini termasuk reduksi INT secara biotik dan abiotik.
- Metode INT yang digambarkan di sini distandarisasi untuk tanah-tanah pertanian. Untuk menganalisis contoh tanah hutan dan padang rumput, direkomendasikan untuk melakukan uji pendahuluan untuk menentukan berat tanah yang cocok dan konsentrasi substrat yang optimum.
- Jika nilai absorbansi terlalu tinggi, larutan berwarna dapat diencerkan dengan larutan ekstraksi. Jika diperlukan, waktu inkubasi dapat dikurangi dari 2 jam menjadi 1 jam.
- Secara teknis kelemahan penggunaan larutan ekstraksi aseton adalah tidak dapat menggunakan kuvet sekali pakai (*disposable*) untuk pengukuran absorbansi karena bahan kuvet dapat larut dengan aseton.

Daftar Pustaka

- Alef, K. 1995. Dehydrogenase activity. p 228-231. *In* K. Alef & P. Nannipieri (Eds.) *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press. London.
- Camiña, F., C. Trasar-Cepeda, F. Gil-Sotres, & C. Leirós. 1998. Measurement of dehydrogenase activity in acid soils rich inorganic matter. *Soil Biol Biochem* 30:1005–1011.
- Casida, L.E. Jr., D.A. Klein, & T. Santoro. 1964. Soil dehydrogenase activity. *Soil Science* 98:371-376.
- Friedel, J.K., K. Molter, & W.R. Fischer. 1994. Comparison and improvement of methods for determining soil dehydrogenase activity by using triphenyl tetrazolium chloride and idonitrotetrazolium chloride. *Biol. Fertil. Soils* 18:291-296.
- Ghaly, A.E., R. Kok, & J.M. Ingrahm. 1989. Growth rate determination of heterogeneous microbial population in swinemanure. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 22: 59-78.
- Gottschalk, G. 1979. *Bacterial Metabolism*. Springer-Verlag. New York Heidelberg Berlin.
- Ohlinger, R. 1995. Enzymes involved in intracellular metabolism. p. 235-245. *In* Schinner F., R. Ohlinger, E. Kandeller, & R. Margesin (Eds.) *Methods Soil Biology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Tabatabai, 1994. Soil enzymes. p 820-823. *In* R.W. Weaver, S. Angle, P. Bottomley, D. Bezdicek, S. Smith, A. Tabatabai, & A. Wollum (Eds.) *Methods of Soil Analysis (Microbiological and Biochemical Properties)*. SSSA. Wisconsin, USA.
- Von Mersi, W & F. Schinner. 1991. An improved and accurate method for determining the dehydrogenase activity of soils with idonitrotetrazolium chloride. *Biol. Fertil.* 11(3): 216-220.

3.4

NITRIFIKASI

Edi Husen

Nitrifikasi merupakan salah satu aktivitas biologi tanah yang penting dalam siklus nitrogen dan dikenal sebagai tahap kedua yang sangat menentukan dalam proses mineralisasi nitrogen dari bahan organik. Secara definisi nitrifikasi adalah peristiwa oksidasi amonia menjadi nitrit dan nitrat atau disebut juga produksi nitrat oleh mikroba melalui oksidasi senyawa nitrogen tereduksi. Keberadaan populasi bakteri nitrifikasi di dalam tanah sering dipakai sebagai indikator penting dalam menilai kualitas atau kesehatan tanah karena jumlah jenisnya yang terbatas (Roper & Ophel-Keller, 1997).

Proses oksidasi amonium menjadi nitrat berlangsung dalam dua tahap dimana nitrogen (pada amonium) berperan sebagai sumber energi bagi bakteri nitrifikasi. Tahap pertama adalah oksidasi amonia oleh bakteri autotrofik. Pada tahap ini terjadi konversi amonium (amonia pada tingkat enzim) menjadi nitrit oleh bakteri pengoksidasi amonia dari genus "Nitroso" (contoh: *Nitrosococcus*). Pada tahap kedua, nitrit dioksidasi menjadi nitrat oleh bakteri pengoksidasi nitrit dari genus "Nitro" (contoh: *Nitrococcus*). Bakteri pengoksidasi amonia yang paling sering dipelajari karena terkait dengan aktivitas enzim dan biokimia oksidasi amonia adalah *Nitrosomonas*. Namun secara umum bakteri pengoksidasi amonia yang paling banyak dijumpai di dalam tanah adalah *Nitrosolobus* dan pada tanah-tanah masam adalah *Nitrospira* (Myrold, 1997).

Reaksi keseluruhan konversi amonia menjadi nitrit adalah:



Reaksi keseluruhan nitrit menjadi nitrat adalah:



Konversi amonia menjadi nitrit merupakan tahap penentu dalam keseluruhan proses nitrifikasi, sehingga pengukuran laju nitrifikasi suatu tanah diestimasi dari nitrit yang dihasilkan. Ada dua metode pengukuran nitrifikasi berdasarkan lamanya masa inkubasi, yaitu: (i) masa inkubasi singkat (*short-term incubation*) yakni dalam hitungan jam atau hari, dan (ii) masa inkubasi panjang (*long-term incubation*). Pengukuran nitrifikasi dengan masa inkubasi panjang memiliki kelemahan karena terjadi perubahan komposisi mikroflora selama masa inkubasi sehingga metode ini tidak disarankan (Alef, 1995).

Pengukuran nitrifikasi dengan masa inkubasi singkat menyediakan dua sisi informasi tentang aktivitas dan populasi bakteri nitrifikasi. Pada satu sisi, laju oksidasi amonia mencerminkan potensi secara keseluruhan laju nitrifikasi tanah dengan tingkat pengelolaan tertentu dimana ketersediaan NH_4^+ menjadi faktor pembatas laju keseluruhan proses nitrifikasi. Pada sisi lain, aktivitas nitrifikasi merupakan suatu fungsi dari ukuran populasi bakteri nitrifikasi yang dapat menjadi cerminan tentang seberapa besar aktivitas nitrifikasi terkait dengan satu sel bakteri (Schmidt & Belser, 1994).

Dalam tulisan ini diuraikan metode pengukuran nitrifikasi masa inkubasi singkat. Metode dan prosedur analisis yang diuraikan dipilih dan diekstrak dari metode yang dikembangkan oleh Berg & Rosswall (1985) dan Schmidt & Belser (1994).

3.4.1 Pengukuran Nitrifikasi Masa Inkubasi Singkat (Berg & Rosswall, 1985)

Prinsip

Pengukuran laju nitrifikasi dengan metode ini didasarkan atas penetapan nitrit (NO_2^-) setelah contoh tanah diinkubasi dengan larutan natrium klorat (NaClO_3), dengan atau tanpa ammonium sulfat, selama 5 atau 24 jam pada suhu 25°C . Penambahan klorat bertujuan untuk memblokir oksidasi lanjutan dari nitrit yang terbentuk. Dengan demikian, laju NO_2^- yang terbentuk setara dengan laju oksidasi NH_4^+ , sehingga hanya kandungan NO_2^- saja yang perlu diukur.

Bahan dan Alat

- Tabung Erlenmeyer (ukuran 100 ml)
- Kertas saring
- Inkubator dengan pengatur suhu 25°C
- Spektrofotometer

Bahan kimia dan larutan

- Larutan natrium klorat I (1,5 M NaClO_3)
 - Larutkan 15,97 g NaClO_3 dalam 70 ml akuades, kemudian tambahkan akuades sampai volume mencapai 100 ml.
- Larutan natrium klorat II (75 mM NaClO_3)
 - Encerkan 10 ml larutan natrium klorat I dengan akuades sampai volume larutan mencapai 200 ml
- Larutan amonium sulfat (1 mM)

- Larutkan 0,13214 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dalam 800 ml akuades, kemudian tambahkan akuades sampai volume mencapai 1.000 ml
- Larutan KCl
 - Larutkan 149,12 g KCl dalam 700 ml akuades, kemudian tambahkan akuades sampai volume mencapai 1.000 ml
- Bufer (0,19 M; pH 8,5)
 - Larutkan 10 g NH_4Cl dalam akuades, atur pH sampai 8,5 dengan NH_4OH , kemudian encerkan dengan menambahkan akuades sampai volume mencapai 1.000 ml
- Reagen untuk penetapan nitrit
 - Larutkan 2 g *sulphanilamide* dan 0,1 g *naphthyl-diethylene-diammonium chloride* dalam 150 ml akuades, lalu tambahkan 20 ml asam fosforik pekat. Setelah dingin, encerkan larutan dengan akuades sampai volume mencapai 200 ml.
- Larutan stok nitrit ($1.000 \mu\text{g N ml}^{-1}$)
 - Larutkan 4,9257 g natrium nitrit dalam 700 ml akuades, kemudian tambahkan akuades sampai volume mencapai 1.000 ml. Simpan pada suhu 4°C .
- Larutan standar nitrit ($10 \mu\text{g N ml}^{-1}$)
 - Encerkan 5 ml larutan stok nitrit dengan akuades sampai volume mencapai 500 ml.

Prosedur

29) Estimasi nitrifikasi tanpa penambahan amonium

- Masukkan 5 g tanah ke dalam masing-masing tabung Erlenmeyer (100 ml), kemudian tambahkan 2,5 ml larutan natrium klorat II. Tutup tabung dengan tutup karet berlubang (*Cap-o-test*) dan inkubasi 2 tabung selama 24 jam pada suhu 25°C . Tabung ketiga sebagai kontrol disimpan pada suhu -20°C .
- Setelah masa inkubasi, tambahkan 5 ml akuades, kemudian 10 ml larutan KCl. Setelah tercampur rata, segera saring untuk mendapatkan supernatan.
- Pipet 5 ml supernatan ke dalam tabung reaksi, kemudian tambahkan 3 ml bufer dan 2 ml reagen untuk penetapan nitrit. Goyang-goyang tabung agar tercampur rata, kemudian diamkan selama 15 menit pada suhu kamar.
- Ukur intensitas warna dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 520 nm (Intensitas warna sebaiknya diukur dalam kurun waktu 4 jam).

30) Estimasi nitrifikasi dengan penambahan amonium

- Masukkan 5 g tanah ke dalam masing-masing tabung Erlenmeyer, kemudian tambahkan 0,1 ml larutan natrium klorat I dan 20 ml larutan amonium sulfat, tutup tabung dengan tutup karet berlubang

(*Cap-o-test*) dan inkubasi 2 tabung selama 5 jam pada suhu 25°C. Tabung ketiga sebagai kontrol segera disimpan pada suhu -20°C.

- Setelah masa inkubasi, tambahkan 5 ml larutan KCl, setelah itu dicampur merata dan segera saring untuk mendapatkan supernatan.
- Pipet 5 ml supernatan ke dalam tabung reaksi, tambahkan 3 ml bufer, 2 ml reagen untuk penetapan nitrit, goyang-goyang tabung agar tercampur rata, kemudian diamkan selama 15 menit pada suhu kamar.
- Ukur intensitas warna pada 520 nm.

Kalibrasi Plot

- Pipet masing-masing 0, 2, 4, 6, 8, dan 10 ml larutan standar nitrit ke dalam tabung Erlenmeyer (100 ml), kemudian tambahkan masing-masing 40 ml larutan KCl 2M untuk estimasi nitrifikasi tanpa penambahan amonium, atau 20 ml larutan KCl 2M untuk estimasi nitrifikasi dengan penambahan amonium. Selanjutnya encerkan larutan dengan akuades sampai mencapai volume 100 ml. Ukur intensitas warna seperti yang dijelaskan di atas.

Perhitungan

Hasil perhitungan tiap contoh dikoreksi dengan hasil pengukuran kontrol. Jumlah nitrit yang terbentuk dihitung sebagai berikut:

$$\text{NO}_2\text{-N } (\mu\text{g g}^{-1} \text{ bk})/t = \frac{\text{NO}_2\text{-N } (\mu\text{g g}^{-1} \text{ bk}) \text{ supernatan} \times V}{5 \times \text{bk}}$$

Keterangan:

- bk = berat kering 1 g contoh tanah lembap (berat tanah kering ditetapkan berdasarkan berat kering oven 105°C selama 3 jam);
- 5 = berat contoh tanah yang digunakan;
- t = lama waktu inkubasi dalam (jam);
- V = total volume larutan yang ditambahkan ke dalam contoh (12,5 ml untuk estimasi nitrifikasi tanpa penambahan amonium atau 25,1 ml untuk estimasi nitrifikasi dengan penambahan amonium).

3.4.2 Ulasan

Metode pengukuran nitrifikasi dengan masa inkubasi singkat dikembangkan untuk tanah-tanah dengan pH > 5 (misalnya tanah-tanah

pertanian), sehingga metode ini tidak sesuai untuk tanah-tanah dengan pH < 5 dimana laju nitrifikasi sangat rendah.

Klorat (NaClO_3) dapat diadsorpsi oleh koloid mineral (anorganik) dan organik, sehingga untuk tanah-tanah dengan kadar C organik > 3,5% jumlah klorat yang digunakan harus lebih tinggi. Selain itu, apabila kadar nitrit dalam contoh tanah melebihi kadar standar nitrit yang digunakan, contoh perlu diencerkan dengan akuades.

Hasil pengukuran nitrifikasi masa inkubasi singkat dapat digunakan untuk estimasi aktivitas potensial populasi bakteri nitrifikasi dalam tanah. Estimasi ini didasarkan atas perbandingan parameter kinetik dan biomassa pada contoh tanah yang diukur dan aktivitas bakteri yang ditetapkan pada kultur murni. Di dalam kultur murni, bakteri nitrifikasi mengoksidasi substrat berdasarkan kinetik Michaelis-Menten yang juga setara (diikuti) di dalam tanah dengan persamaan:

$$dS/dt = [k_oSX/(K_m + S)]$$

dimana $dS dt^{-1}$ adalah laju oksidasi substrat, S adalah konsentrasi substrat, t adalah waktu, X adalah kepadatan sel bakteri nitrifikasi, K_m adalah konstanta Michaelis-Menten, dan k_o adalah aktivitas maksimum per sel ($k_oX = V_{max}$, velositas maksimum ekspresi Michaelis-Menten standar). Dalam kondisi $S \gg K_m$, maka X dapat diestimasi dengan hanya mengetahui data k_o dan $dS dt^{-1}$ dengan persamaan:

$$X = (dS dt^{-1})/k_o$$

Laju oksidasi substrat $dS dt^{-1}$ ditetapkan seperti metode yang telah diuraikan. Nilai k_o dapat diperoleh dari kultur murni berbagai bakteri nitrifikasi (Belser & Schmidt, 1980) yang nilainya berkisar dari 0,001 sampai 0,023 piko mol per sel, antara lain untuk genus *Nitrosomonas*, *Nitrosospira*, *Nitrosolobus*, dan *Nitrobacter*.

Daftar Pustaka

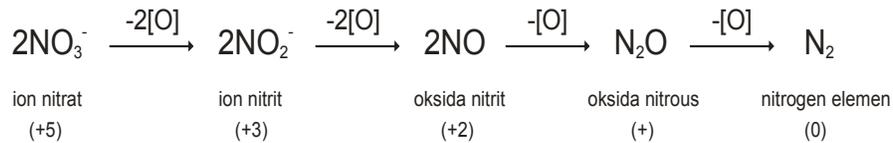
- Alef, K. 1995. Nitrogen mineralization in soils. p 234-257. In K. Alef & P. Nannipieri (Eds.) *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press. London.
- Belser, L.W. & E.L. Schmidt. 1980. Growth and oxidation of ammonia by three genera of ammonium oxidizers. *FEMS Microbiol. Lett.* 7:213-216.

- Berg, P. & T. Rosswall. 1985. Ammonium oxidizer numbers, potential and actual oxidation rates in two Swedish arable soils. *Biol Fert Soils* 1:131-140.
- Myrold, D.D. 1997. Transformation of nitrogen, p 259-294. *In* D.M. Silvia, J.J. Fuhrmann, P.G. Hartel, & D.A Zuberer (*Eds.*) *Principles and Applications of Soil Microbiology*. Prentice Hall. New Jersey.
- Roper, M.M & K.M. Ophel-Keller. 1997. Soil microflora as bioindicators of soil health. p 157-177. *In* C. Pankhurst & B.M. Doube (*Eds.*) *Biological Indicators of Soil Health*. CAB International. New York.
- Schmidt, E.L & L.W. Belser. 1994. Autothrophic nitrifying bacteria. p 159-177. *In* R.W. Weaver, S. Angle, P. Bottomley, D. Bezdicek, S. Smith, A. Tabatabai, & A. Wollum (*Eds.*) *Methods of Soil Analysis (Microbiological and Biochemical Properties)*. SSSA. Wisconsin, USA.

DENITRIFIKASI

R.D.M. Simanungkalit

Pada kondisi oksigen terbatas dalam tanah, berbagai bakteri aerobik menggunakan nitrat sebagai akseptor hidrogen alternatif. Nitrat bervalensi lima direduksi lewat nitrit bervalensi tiga menjadi oksigen nitrous bervalensi dua dan satu dan akhirnya menjadi molekul dinitrogen bervalensi nol, seperti digambarkan sebagai berikut.



Pada kondisi alami produk utama adalah molekul dinitrogen, sedangkan oksida nitrous hanya dilepaskan dalam jumlah kecil (Tiedje, 1982).

Kehilangan melalui denitrifikasi dapat ditetapkan melalui tiga metode. Metode pertama adalah metode neraca N^{15} dengan menaksir senyawa berlabel N^{15} yang tidak dapat diperoleh (*non-recovery*). Pada metode ini hanya evolusi gas yang berlabel N^{15} , yang berasal dari pupuk yang ditetapkan (Chichester & Smith, 1978). Metode kedua untuk penetapan kehilangan N melalui denitrifikasi adalah berdasarkan pengukuran $^{15}\text{N}_2$ *in situ* dan produksi $^{15}\text{N}_2\text{O}$ (Rolston *et al.*, 1978). Metode yang ketiga berdasarkan penghambatan reduksi N_2O menjadi N_2 oleh bakteri dengan memberikan asetilen (C_2H_2) dan menetapkan denitrifikasi semua N-nitrat tanpa memperhatikan asalnya. Teknik penghambatan asetilen dapat dipakai untuk penelitian laboratorium maupun untuk penelitian lapangan (Ryden *et al.*, 1979a; Nieder *et al.*, 1989). Dalam bab ini hanya metode ketiga yang dikemukakan.

3.5.1 Laju Denitrifikasi Aktual dan Potensial berdasarkan Teknik Penghambatan Asetilen (berdasarkan modifikasi oleh Bauernfeind 1995 dari metode Ryden *et al.*, 1979)

Prinsip

Contoh tanah basah dari lapangan diinkubasi pada kondisi aerob atau anaerob, diberi asetilen sampai 48 jam (untuk laju denitrifikasi aktual) atau 200 jam (untuk laju denitrifikasi potensial) pada suhu 25°C. Oksida nitrous yang dihasilkan diukur secara kuantitatif dengan analisis kromatografi dari atmosfer inkubasi.

Bahan dan alat (selain alat laboratorium dasar)

- Kromatograf gas (GC), yang dilengkapi dengan suatu TCD (*thermal conductivity detector*) untuk pengukuran denitrifikasi potensial atau suatu ECD (*electron capture detector*) untuk pengukuran denitrifikasi aktual atau potensial
 - Kolom metal : ukuran : 3 m x 4 mm x 2 mm
 - filling : Poropak Q, 80 – 100 mesh
 - Detektor : TCD atau ECD
 - Gas pembawa untuk TCD : helium 5,0; laju alir 45 ml.menit⁻¹
 - Gas pembawa untuk ECD : nitrogen 5,0, laju alir 45 ml.menit⁻¹
 - Make up gas untuk ECD : nitrogen 5,0, laju alir 8 ml.menit⁻¹
 - Suhu injektor : 100°C.
 - Suhu oven : 40°C, isotermik.
 - Suhu TCD : suhu detektor : 80°C.
 - Suhu filamen : 180°C.
 - Suhu ECD : Suhu basis detektor 289°C.
 - Suhu detektor : 300°C.
 - Waktu retensi : N₂O ; 2,25 menit ; asetilen: 3,30 menit.+
- Kantong gas (Plastigas, Linde)
- Suntikan (1 dan 10 ml, kedap udara)
- Labu Erlenmeyer yang kedap udara (dengan sumbat skrup dan septum silikon)

Bahan kimia dan reagen

- Helium 5,0
- Oksida nitrous 5,0 atau campuran gas kalibrasi terukur (misal: 10 – 100 ppmv N₂O dalam N₂ atau He. Sesuai dengan gas pembawa)
- Asetilen (*solvent-free*)

Prosedur

- Timbang 30 g tanah lapangan lembap di dalam labu Erlenmeyer 100 ml, dan tutup rapat dengan sumbat berskrup dan septum silikon.
- Untuk pengukuran denitrifikasi pada kondisi aktual, buang 10% atmosfer inkubasi dan isi kembali dengan asetilen menggunakan suntikan 10 ml. Tergantung pada aktivitasnya, inkubasikan labu selama 24-48 jam pada suhu 25^oC. Waktu inkubasi jangan melebihi 48 jam.
- Untuk pengukuran denitrifikasi potensial, ganti udara dalam labu inkubasi dengan helium atau nitrogen 5,0 (sesuai dengan gas pembawa GC). Penghilangan udara dapat dilakukan dengan jalan menghembuskan atau evakuasi dengan eksikator, dan mengisi kembali dengan gas pembawa. Buang 10% atmosfer inkubasi dan gantikan dengan asetilen. Waktu inkubasi dapat lebih lama daripada pengukuran laju denitrifikasi aktual, biasanya sampai 200 jam dengan suhu inkubasi 25^oC.
- Untuk menetapkan pengaruh bahan kimia terhadap denitrifikasi, aktifitas dapat ditingkatkan dengan penambahan nitrat (200 µg N.g⁻¹ dm) dan glukosa (180 µg C. g⁻¹ dm)
- Setelah inkubasi, ambil contoh dari ruang atas tabung inkubasi dengan menggunakan suntikan 1 ml, dan injeksikan ke dalam GC untuk analisis.
- Untuk menetapkan volume udara dalam tabung yang berisi tanah sesudah analisis, buka setiap tabung, lalu timbang, kemudian isi dengan akuades, lalu timbang kembali. Perbedaan berat dalam g sama dengan volume udara dalam ml.
- Untuk kuantifikasi, gas campuran atau gas murni dapat dipakai. Bila sudah diperoleh garis linear, maka kalibrasi satu titik mungkin dilakukan. Injeksikan sejumlah gas tertentu (misalnya 50 µl gas murni untuk TCD, atau 1-10 µl gas murni untuk ECD) beberapa kali.
- Bila campuran gas kalibrasi (rasio campuran diketahui) digunakan untuk kalibrasi, µl N₂O harus dihitung dari volume yang diinjeksikan. Bila gas murni yang dipakai untuk kalibrasi, µl N₂O yang diinjeksikan diketahui, dan volume N₂O (µl) yang diinjeksikan harus dikonversikan menjadi µg (lihat Rumus 1 di bawah).
- Untuk membuat kurva kalibrasi, letakkan µg N₂O yang diinjeksikan pada kondisi standar {20^oC (293^oK) dan 760 T (101 300 Pa)}, yang dihitung dengan Rumus 1, terhadap daerah puncak terukur. Dengan cara ini, memungkinkan untuk membandingkan contoh-contoh pada level standar. Hitung µg N₂O contoh dari kurva kalibrasi, dan konversikan menjadi µg N₂O-N.g⁻¹ dm.h⁻¹ (lihat Rumus 2 di bawah).

$$P.V_N.10^{-9}.mw. 10^6$$

$$\mu\text{g N}_2\text{O yang diinjeksikan (standar) = } \dots\dots\dots \text{ (Rumus 1)}$$

--

$$\frac{X.V.0,6363.100}{IV.t.SW.\% dm} \quad (\text{Rumus 2})$$

- P = tekanan atmosfer standar (101 300 Pa)
- V_N = volume N₂O-standar (μl) yang diinjeksi
- 10^{-9} = faktor konversi volume (1 μl = 10^{-9} m³)
- mw = berat molekul N₂O
- 10^6 = faktor konversi (1 g = 10^6 μg)
- R = konstanta gas (8,31 J.mol⁻¹.K⁻¹)
- T = suhu standar (293 K)
- X = μg N₂O volume sampel yang diinjeksikan
- V = volume total labu inkubasi – volume tanah (ml)
- 0,6363 = faktor untuk mengubah N₂O menjadi N₂O-N
- IV = volume contoh yang diinjeksikan (ml)
- T = waktu inkubasi (jam)
- SW = berat awal tanah
- $100.\%^{-1} dm$ = faktor untuk bahan kering tanah oven 105⁰C

Catatan

- ECD sebagai pengganti TCD haruslah dipakai untuk menentukan denitrifikasi pada kondisi aktual. TCD kurang sensitif untuk mendeteksi N₂O yang dihasilkan di udara atau pada kondisi aerobik dalam jumlah yang kecil.
- Untuk menentukan denitrifikasi aktual pada kondisi sealami mungkin, silinder pengambilan contoh tanah dapat digunakan (Gambar 1)
- Untuk perhitungan neraca yang tepat, dimana seluruh denitrifikasi harus diukur, jumlah gas yang terlarut dalam air tanah harus diperhitungkan dengan menggunakan koefisien absorpsi Bunsen (Wilhelm *et al.*, 1977).
- Untuk reduksi nitrat menjadi oksida nitrous lebih sedikit elektron yang terpakai daripada reduksi nitrat menjadi nitrogen molekul. Oleh karena itu, aktivitas yang sedikit dipercepat dapat diukur. Ini bukanlah suatu sumber kesalahan yang signifikan.
- Metode ini dapat juga dipakai untuk pengukuran lapangan dengan adaptasi khusus (Ryden *et al.*, 1979b)
- Dengan bentuk eksperimen yang sama, pengukuran gas-gas lain, seperti CO₂, N₂ atau O₂ dimungkinkan. Dalam kasus ini, laju respirasi dapat

diamati secara serempak dengan denitrifikasi. Untuk pengukuran N_2 atau O_2 diperlukan kolom saringan ukuran molekul.

- Berat awal tanah dapat ditambah, bila denitrifikasi berada pada pada batas deteksi.
- Oksigen dan asetilen dapat mengganggu detektor bila dipakai dalam jumlah yang besar.

3.5.2 Penetapan *in situ* Denitrifikasi Total dengan Teknik Penghambatan Asetilen (berdasarkan Ottow *et al.*, 1995)

Prinsip

Kehilangan melalui denitrifikasi total ($N_2 + N_2O-N$) dapat dihitung di lapang yang tidak terganggu (*undisturbed*) dengan memakai teknik penghambatan asetilen (TPA). TPA didasarkan pada penghambatan total aktifitas reduktase N_2O dari bakteri denitrifikasi oleh asetilen ($HC \equiv CH$). Reduktase N_2O memiliki afinitas yang tinggi terhadap C_2H_2 , karena C_2H_2 memiliki struktur yang sama dengan N_2O ($N \equiv N-O$). Prasyarat TPA adalah adanya konsentrasi asetilen sekurang-kurangnya 0,2 - 1% (v/v) dalam atmosfer tanah. Pada taraf ini pelepasan N_2O yang ditampung pada permukaan tanah dengan rongga terbuka dapat dipakai sebagai ukuran denitrifikasi total per satuan luas tanah. Eksperimen laboratorium dasar telah menunjukkan bahwa jumlah N_2O-N yang dihasilkan dengan adanya C_2H_2 , sama dengan jumlah $N_2O-N + N_2$ yang dilepaskan tanpa adanya asetilen.

Bahan dan alat (selain peralatan dasar laboratorium)

- Kotak terbuat dari PVC (50x10x15 cm atau sesuai dengan yang diinginkan) dilengkapi dengan rangka baja dan penutup terbuat dari plexiglas yang dapat dipindah, demikian juga lubang masuk dan keluar udara yang terbuat dari PVC dengan garis tengah 10 mm (Gambar 1).
- Kolom gelas (atau polietilen) untuk menangkap CO_2 dan H_2O (berisi granul $CaCl_2$ NaOH)
- Tabung gelas (lurus, panjang 20 cm, garis tengah 2 cm; atau berbentuk U, panjang 50 cm, garis tengah 2 mm) untuk menangkap N_2O pada pelet saringan molekul (0,5 mm).
- Sumbat karet
- Pipa gelas (garis tengah 0,5 mm)
- Pipa karet (garis tengah 0,5 mm)
- Pengukur aliran ($0-70 \text{ l.min}^{-1}$) dengan katup jarum
- Pompa vakum

- Pipa PVC (panjang 1 m, garis tengah 6 mm untuk memasukkan C₂H₂ ke dalam tanah
- Pipa polietilen (garis tengah 6 dan 10 mm)
- Bor tanah listrik (10 mm x 60 cm)
- Labu Erlenmeyer (1.000 ml) dengan percabangan samping dan sumbat karet
- Kelem tabung, kran bercabang dua, septum karet yang cocok ke dalam selang labu Erlenmeyer (Gambar 2)
- Botol gelas dengan saluran keluar dan sumbat yang pas
- Suntikan (1 dan 10 ml) yang dilengkapi pengunci
- Selang PVC atau baja (panjang 1 m, garis tengah 6-10 mm dengan lubang masuk pengambilan sampel udara
- Selang mikro PVC (garis tengah 0,5 mm)
- Katup septum (garis tengah 8-12 mm)
- Jarum bersisi ganda
- Tabung vakum (5 ml)
- Sumber listrik di tempat eksperimen (stop kontak atau generator lapang)

- Gaskromatograf (GC)
 - Tergantung pada konsentrasi N₂O, gunakan GC yang dilengkapi dengan ECD dan/atau TCD. Untuk ECD, kisaran deteksi adalah 0,1 – 400 ng N₂O-N, sedang untuk TCD kira-kira 0,1 – 50 µg N₂O-N.

Kolom metal : panjang 2 m

Filling : Porapak Q, 60 – 80 mesh

Gas pembawa untuk ECD : N₂ (ECD bermutu) atau campuran Ar/CH₄
= 95/5, laju alir: 30 ml.menit⁻¹

Gas susulan (make up) untuk ECD: N₂ atau Ar/CH₄ = 95/5, laju alir: 40
ml.menit⁻¹

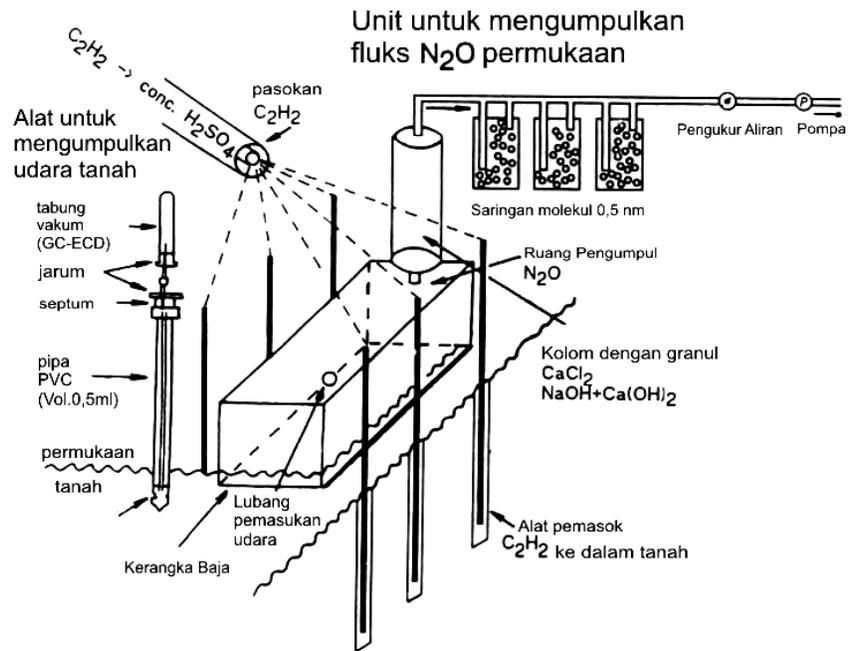
Gas pembawa untuk TCD : He, laju alir: 30 ml menit⁻¹

Suhu oven : 40⁰C

Suhu injektor : 60⁰C

Suhu ECD : 300⁰C

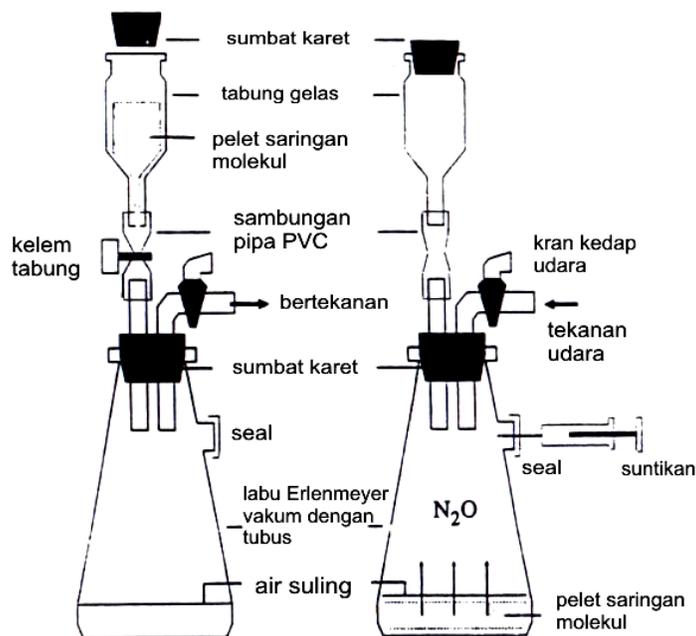
Suhu TCD : 150⁰C



Gambar 1. Alat untuk penetapan jumlah total kehilangan karena denitrifikasi dengan TPA (Ottow *et al.*, 1995)

Bahan kimia dan reagen

- Asetilen (mutu: teknis)
- N₂ (mutu ECD)
- He (kemurnian 99,996% v/v)
- Gas kalibrasi
 - N₂O dilarutkan dalam N₂ (100 ppmv, 99,995 v/v)
 - CO₂, O₂ dan N₂O (99,995 v/v)
- Saringan molekuler (0,5 nm, pellet 2mm)
- CaCl₂ granul
- NaOH dan CaCl₂ (dalam bentuk granul yang tersedia secara komersial)
- H₂SO₄ pekat (96-98%)



Gambar 2. Alat untuk melepaskan N_2O yang diadsorbsi dengan saringan molekul (pellet 0,5- nm) yang telah dikumpulkan di lapang (Ottow *et al.*, 1995)

Prosedur

- Untuk memperoleh pengukuran yang andal, pilihlah tempat percobaan secara hati-hati dan ambillah contoh tanah sehomogen mungkin. Dengan hati-hati, tekan kotak Plexiglas (untuk menghindari panas yang berlebihan) sehingga fotosintetis dan respirasi tanah dapat berlangsung normal sampai kedalaman tanah 5 cm (sekurang-kurangnya 4 ulangan). Pada lahan pertanian antara baris dipakai kotak yang kecil tapi panjang, sedangkan pada padang rumput dianjurkan pakai kotak empat persegi panjang.
- Buat 6 lubang (dalam 60 cm, garis tengah 10 mm) di sekitar kotak dengan bor
- Sehari sebelum menetapkan jumlah N_2O yang keluar dari permukaan tanah, isi setiap kotak dengan 40 L asetilen melalui keenam lubang sampai tidak bertekanan (4 jam)
- Tiga jam sebelum pengumpulan N_2O , tambahkan 10 L asetilen (2 jam) melalui selang PVC ke dalam tanah. Periksa distribusi dan konsentrasi asetilen dalam udara tanah melalui selang pengambilan gas yang dimasukkan dengan hati-hati dalam lubang yang sudah dibor sebelumnya. Konsentrasi asetilen 0,2-1% (v/v) harus ada dalam udara

tanah. Konsentrasi ini diperoleh dengan mudah bahkan pada tegangan air yang relatif tinggi sampai kira-kira kapasitas lapang (6 kPa).

- Lewatkan asetilen melalui tabung yang berisi asam sulfat pekat (untuk menghilangkan kontaminasi aseton) sebelum dimasukkan ke dalam tanah. Selama periode ekuilibrasi (2 jam), pindahkan penutup kotak untuk menghindari akumulasi gas asetilen dan peningkatan suhu dalam kotak
- Selama periode pengambilan sampel N_2O aktual, tutup penutup gelas, masukkan aliran udara 20 l.menit^{-1} secara terus menerus ke dalam kotak dengan menggunakan pompa vakum, katup jarum dan alat pengukur aliran (Gambar 1). Sedot N_2O yang keluar dari tanah melalui filter CO_2 dan H_2O (yang berisi $CaCl_2$ dan $NaOH$), dan kumpulkan dalam tiga penampung (panjang 19 cm, garis tengah 2,5 cm) yang berisi pelet saringan molekul ukuran 0,5 nm.
- Bawa N_2O yang diabsorpsi pada saringan 0,5 nm setelah 4-8 jam ke laboratorium. Secara serempak, ambil sampel N_2O dari udara sekitar saringan molekul yang lain.
- Untuk mencegah mikroorganisme beradaptasi terhadap substrat asetilen, ganti tempat pengambilan setiap 4 hari.
- Lepaskan oksida nitrogen yang diabsorpsi pada saringan molekul 0,5 nm dari pelet ke dalam labu Erlenmeyer (kira-kira 1.000 ml) yang berisi 150 ml akuades (Gambar 2). Setelah 2 jam, gantikan vakum dengan udara, dan tentukan konsentrasi N_2O pada setiap labu dengan kromatografi gas.

Penghitungan hasil

- Sesudah konsentrasi N_2O di udara sekitar dikurangi, hitung fluks N_2O permukaan dalam $g \text{ } N_2O\text{-N.ha}^{-1} \text{ hari}^{-1}$ (lihat 3.5.1). Laju denitrifikasi aktual dan potensial dengan TPA,
- Sebelum memulai pengukuran dengan TPA, tentukan dulu konsentrasi nitrat aktual dalam tanah, karena tanah dapat menjadi *sink* bukan *source* N_2O bila konsentrasi nitrat rendah berdasarkan jumlah bahan organik yang mudah dirombak.

Catatan

31) Manfaat utama TPA adalah:

- dapat digunakan pada ekosistem alami dan juga ekosistem yang sudah terganggu (misalnya sudah pernah dipupuk)
- relatif sederhana, peralatan tidak mahal
- pengukuran N_2O sensitif dengan kromatografi gas (ECD)
- pemakaian ruang yang sama untuk menetapkan jumlah pelepasan $N_2O\text{-N}$ alami pada tempat yang sama tanpa mendirus asetilen

32) Keterbatasan TPA

- heterogenitas tanah (terutama pada sebaran bahan organiknya) dan juga variabilitas temporal dan spasial proses denitrifikasi pada keadaan lapangan.
- variabilitas hasil tinggi pada tanah (liat) dengan pergerakan (*tortuosity*) yang tinggi dan/atau kandungan air yang tinggi yang mungkin membatasi difusi pelepasan C_2H_2 dan N_2O yang rata.
- penghambatan total nitrifikasi terjadi walaupun konsentrasi C_2H_2 rendah.
- penggunaan asetilen sebagai sumber karbon untuk denitrifikasi dapat terjadi bila jumlah karbon tanah (Ct) lebih rendah dari 1%.
- hasil kurang baik pada tanah-tanah yang konsentrasi nitrat awalnya rendah, tetapi kandungan bahan organiknya yang mudah dirombak relatif tinggi. Pada kondisi seperti itu, N_2O yang dihasilkan direduksi lagi menjadi N_2 walaupun pada konsentrasi C_2H_2 yang tinggi. Oleh karena itu, pengamatan nitrat selama pengukuran lapangan perlu.

Daftar Pustaka

- Bauernfeind, G. 1995. Actual and potential denitrification rates by acetylene-inhibition technique. p. 151-155. *In* F. Schinner, R. Öhlinger, E. Kandeler, & R. Margesin (Eds.) *Methods in Soil Biology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Chichester, F.W. & S.J. Smith. 1978. Disposition of ^{15}N labeled fertilizer nitrate applied during corn culture in field lysimeters. *J. Environ, Qual.* 7: 227 – 232.
- Nieder, R., G. Scholl Mayer, & J. Richter. 1989. Denitrification in the rooting zone of cropped soils with regard to methodology and climate: a review. *Biol. Fertil. Soils* : 8: 219 – 226.
- Ottow, J.C.G., G. Benckiser, & H.J. Lorch. 1995. *In situ* quantification of total denitrification losses by acetylene-inhibition technique. p. 155-161. *In* F. Schinner, R. Öhlinger, E. Kandeler, & R. Margesin (Eds.) *Methods in Soil Biology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Rolston, D.E., D.L. Hoffman, & D.W. Toy. 1979. Field measurement of denitrification: I. Flux of N_2 and N_2O . *Soil Sci. Soc. Am. J.* 42:863-869.
- Ryden, J.C., L.J. Lund, and D.D. Focht. 1979a. Direct measurement of denitrification loss from soils. I. Laboratory evaluation of acetylene inhibition of nitrous oxide reduction. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 43: 104-110.
- Ryden, J.C., L.J. Lund, and D.D. Focht. 1979b. Direct measurement of denitrification loss from soils. II. Development and application of field methods. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 43: 110 – 118.

Tiedje, J.M. 1982. Denitrification. p. 1011-1026. *In* A.L. Page, R.H. Miller, & D.R. Keeney. (Eds.) *Methods of Soil Analysis. Part 2.* Am. Soc. Agron, Soil Sci. Soc. Am. Madison, Wisconsin.

Wilhelm, E., R. Battino, & R.J. Wilcock. 1977. Low pressure solubility of gases in liquid water. *Chem. Rev.* 77: 219–262.

4

AKTIVITAS ENZIM

Aktivitas enzim di dalam tanah dipengaruhi oleh faktor-faktor biotik dan abiotik. Salah satu permasalahan yang sering dihadapi dalam analisis aktivitas enzim adalah pemisahan antara aktivitas enzim ekstraseluler yang teradsorpsi dalam mineral liat atau dalam koloid humus dan enzim yang terdapat dalam organisme hidup yang terdapat dalam contoh tanah (enzim intraseluler). Idealnya, pengukuran suatu aktivitas enzim pada contoh tanah dilakukan sebelum terjadi perubahan sifat fisik dan kimia pada enzim tersebut. Oleh sebab itu, dalam analisis sering digunakan beberapa senyawa antiseptik sebagai agen penghambat seperti toluena dan etanol untuk mengurangi pertumbuhan mikroba selama pengukuran aktivitas enzim berlangsung, khususnya pada pengukuran enzim dengan masa inkubasi yang panjang.

Kehati-hatian dalam interpretasi data hasil analisis juga merupakan hal penting yang perlu diperhatikan. Hal ini karena pengukuran aktivitas enzim dalam contoh tanah merepresentasikan kondisi potensial maksimum dan bukan aktivitas aktual enzim karena pengukuran dilakukan pada kondisi yang diatur optimum (suhu, pH, dan substrat yang ditambahkan) untuk menghasilkan laju aktivitas tertinggi.

Dalam bab ini diuraikan teknik analisis untuk beberapa enzim penting terutama yang terkait dengan enzim yang bekerja dalam metabolisme bahan organik, yaitu kitinase, ligninase, selulase, fosfatase, dan protease.

4.1

KITINASE

Rohani Cinta Badia Ginting

Kitin merupakan homopolimer β -1.4-N-asetil glukosamin dan tergolong polimer kedua terbanyak di alam setelah selulosa. Kitin berbentuk padat, amorf, tidak berwarna, dan bersifat tidak larut dalam air, asam encer, alkohol, maupun pelarut organik biasa, tetapi dapat larut dalam fluoroalkohol dan asam mineral pekat (Richards, 1951). Kitin merupakan komponen struktural sebagian besar dinding sel fungi (cendawan) patogen (Yanai *et al.*, 1994) dan polisakarida struktural terbesar penyusun utama kerangka luar serangga, udang, kepiting, moluska, annelida, dan dinding sel berbagai spesies fungi dan alga.

Enzim yang menghidrolisis kitin menjadi asetil glukosamin dimediasi oleh dua enzim hidrolase yaitu kitinase (kitin glukano hidrolase) dan kitobiase (kitobiose asetil amidodeoksi glukohidrolase). Kitinase umum terdapat di alam dan dihasilkan oleh bakteri, aktinomiset, fungi, serangga, dan tanaman (Tsujiro *et al.*, 1992). Enzim ini juga disintesis oleh protozoa, saluran pencernaan nematoda, polikhaeta, dan moluska, serta ditemukan dalam lendir pencernaan burung pemakan serangga, lendir pencernaan dan pankreas ikan, amfibia dan reptil pemakan serangga.

Pada tanaman, kitinase dihasilkan dan diakumulasi sebagai respon akibat infeksi fungi atau simbiosis fungi. Kitinase berperan penting dalam pengendalian hayati fungi dan nematoda patogen tanaman dimana patogen tersebut menyerang tanaman dengan cara hidup parasit. Kitinase yang dihasilkan oleh rhizobakteri diyakini mempunyai peran aktif dalam pengendalian fungi patogen tanaman. Veon *et al.* (1990) mendapatkan bahwa ada korelasi nyata antara aktivitas kitinase dan kandungan nitrogen.

Kitinase termasuk enzim ekstraseluler, yaitu enzim yang dihasilkan di dalam sel, kemudian dikeluarkan ke medium tumbuhnya. Langkah pertama untuk menguji aktivitas kitinase dalam tanah adalah dengan mengekstrak N-asetil glukosamin bebas dan mengkuantifikasinya secara fotometrik (Rodriguez-Kabana *et al.*, 1983).

Koloidal kitin adalah kitin yang banyak digunakan sebagai substrat dalam medium fermentasi. Senyawa ini diperoleh dengan menghidrolisis secara parsial kitin dengan larutan HCl 10N (Inbar & Chet, 1991; Chernin *et al.*, 1995; Harman *et al.*, 1993).

Pengukuran aktivitas kitinase dapat dilakukan dengan beberapa cara (Jeaniaux, 1966; Cabib, 1987) yaitu:

- a. Berdasarkan pengurangan substrat.

1. Metode viskosimetri yaitu aktivitas kitinase terhadap kitosan, glikol kitin, atau karboksimetilkitin yang ditunjukkan oleh pengurangan viskositas substrat.
 2. Metode turbidimetri (nephelometri) yaitu mengukur variasi turbiditas suspensi koloidal kitin selama kitinolisis. Unit aktivitas diukur dari persentase pengurangan kerapatan atau turbiditas relatif dari suspensi yang sama antara yang berisi enzim dan akuades. Satu unit aktivitas kitinase dinyatakan sebagai jumlah enzim yang menyebabkan 0,001 OD per menit dalam kondisi yang ditetapkan (Berges & Reynolds, 1958).
- b. Berdasarkan pembentukan produk akhir yaitu N-asetil glukosamin (GlcNAc) (Reissig, 1955). N-asetil glukosamin yang dibebaskan dari kitin ditetapkan secara kolorimetri dengan p-dimetil aminobenzaldehida. Satu unit aktivitas kitinase dinyatakan sebagai mol GlcNAc yang dibebaskan selama 1 jam dalam kondisi yang ditetapkan.
 - c. Pengujian spektrofotometer yaitu menggunakan kromogen 3,4, dinitrophenil tetra-N asetilkitotetraose.
 - d. Pengujian radiomotor.

4.1.1 Pengujian Aktivitas Kitinase (Rodriguez-Kabana *et al.*, 1983; Rössner 1995; Alef & Nannipieri, 1995)

Prinsip

Metode ini didasarkan atas inkubasi contoh tanah yang ditambah suspensi kitin selama 16 jam pada suhu 37⁰C. N-asetil glukosamin yang dibebaskan diekstrak dengan larutan KCl dan konsentrasinya ditetapkan dengan spektrofotometer setelah pewarnaan dengan 4 (dimetilamino) benzaldehida.

Alat

- Tabung sentrifus
- Tabung dialisis selulosa
- Spektrofotometer
- Kain saringan polipropilena (ukuran jaring kira-kira 70 µm)
- Penangas air sampai 100⁰C
- Labu Erlenmeyer (25, 100, 1.000 ml)
- Labu ukur (50 ml)
- Kertas saring
- Inkubator goyang
- Sonikator

Bahan

- Suspensi kitin 5% (b/v)
 - Larutkan 15 g kitin dalam 200 ml HCl pekat dan aduk dengan stirer magnetik selama 3 jam pada suhu ruang. Saring larutan kitin dengan kain saringan polipropilena. Masukkan larutan kitin yang sudah disaring ke dalam tabung dialisis, dan bilas asam selama semalam dengan kucuran air keran. Sentrifugasi larutan kitin yang sudah dibilas dan buang supernatan. Larutkan kembali pelet (kitin) yang diperoleh dalam akuades. Ulang beberapa kali langkah ini sampai diperoleh larutan kitin yang mempunyai nilai pH 5,5–6,0. Selanjutnya timbang pelet (kitin) dan larutkan dalam akuades dengan konsentrasi 5%. Setelah itu sonikasi larutan kitin untuk mendapatkan larutan yang homogen, tambahkan 0,2 g NaN_3 per 1.000 ml. Simpan larutan pada suhu 4°C.
- Bufer fosfat 0,12M, pH 6,0
 - Larutkan 16,13 g KH_2PO_4 ; 0,2 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; dan 0,2 g NaN_3 dalam 700 ml akuades. Sesuaikan pH dengan NaOH atau HCl untuk memperoleh larutan pH 6,0, lalu tambahkan akuades hingga volume 1.000 ml. Simpan larutan pada suhu 4°C.
- Bufer borat 0,8M, pH 9,1
 - Larutkan 4,95 g H_3BO_3 dalam 40 ml 0,8M KOH, kemudian tambahkan 20 ml akuades. Sesuaikan pH larutan dengan KOH 0,8M untuk memperoleh larutan pH 9,1. Selanjutnya tambahkan akuades hingga volume 100 ml. Simpan larutan pada suhu 4°C.
- Larutan kalium klorida (KCl) 2M
 - Larutkan 149,12 g KCl dalam 700 ml akuades, lalu tambahkan akuades hingga volume 1.000 ml. Simpan larutan pada suhu 4°C.
- Larutan stok reagen pewarna DMAB [4-(dimetil amino) benzo aldehida]
 - Larutkan 10 g DMAB dalam campuran 87,5 ml asam asetat pekat dan 12,5 ml HCl pekat. Simpan larutan pada suhu 4°C.
- Larutan kerja reagen pewarna
 - Encerkan larutan stok reagen pewarna DMAB dengan asam asetat pekat dengan perbandingan DMAB: asam asetat pekat = 1:4. Larutan ini disiapkan pada saat akan digunakan.
- Larutan stok standar 45 mM N-asetil glukosamin (GlcNAc)
 - Larutkan 0,5 g GlcNAc dalam 30 ml akuades, lalu tambahkan akuades hingga volume 50 ml. Larutan ini juga disiapkan pada saat akan digunakan.

Prosedur

- Masukkan 1 g contoh tanah ke dalam labu Erlenmeyer volume 25 ml dan tambahkan 5 ml bufer fosfat.
- Setelah ditambahkan 5 ml larutan substrat kitin, tutup labu dengan penutup karet dan inkubasi selama 16 jam pada suhu 37°C.
- Pada perlakuan kontrol, tambahkan larutan substrat kitin dengan cepat pada akhir masa inkubasi.
- Siapkan perlakuan kontrol tanpa substrat kitin, dan tambahkan larutan substrat kitin dengan cepat pada akhir masa inkubasi.
- Setelah inkubasi, tambahkan 10 ml KCl dan goyang dengan inkubator pada kecepatan 100-150 rpm selama 30 menit pada suhu ruang.
- Setelah disaring, campurkan 0,5 ml filtrat supernatan dengan 1,5 ml akuades dan 0,4 ml bufer borat dan selanjutnya goyang biar tercampur rata.
- Inkubasi larutan dalam air mendidih selama 3 menit dengan penangas air untuk menghentikan aktivitas enzim.
- Dinginkan larutan sampai suhu ruang, kemudian tambahkan 5 ml larutan DMAB encer, kocok agar tercampur rata dan diinkubasi pada suhu 35°C selama 30 menit.
- Ukur segera kerapatan optis larutan dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 585 nm dalam waktu tidak lebih dari 20 menit.
- Semua pengukuran harus dilakukan dengan pengulangan paling sedikit dua ulangan untuk mendapatkan hasil yang maksimum.

Kurva kalibrasi

- Masukkan masing-masing sebanyak 0; 0,5; 1; 1,5; 2, dan 2,5 ml larutan stok standar N-asetil glukosamine ke dalam labu ukur volume 50 ml.
- Tambahkan 12,5 ml bufer fosfat dan 25 ml larutan KCl kemudian tambahkan akuades hingga volume 50 ml.
- Ambil masing-masing larutan 0,5 ml dan masukkan ke tabung gelas. Lakukan penentuan N-asetil glukosamin seperti yang diuraikan di atas. Konsentrasi N-asetil glukosamin dalam kurva kalibrasi adalah 0, 50, 100, 150, 200, dan 250 µg ml⁻¹.
- Selanjutnya tentukan kerapatan optis masing-masing konsentrasi N-asetil glukosamin seperti langkah-langkah tersebut untuk mendapatkan kurva kalibrasi.

Perhitungan

Aktivitas kitinase diekspresikan oleh banyaknya (µg) N-asetil glukosamin yang terbentuk per g tanah kering per waktu inkubasi. N-asetil glukosamin dalam contoh tanah dan kontrol dihitung dari kurva kalibrasi, dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{N-asetil glukosamin } (\mu\text{g g (bk)}^{-1} \text{ 16 jam}^{-1}) = \frac{C \times V}{bk}$$

Keterangan:

- C = konsentrasi N-asetil glukosamin yang diukur dalam μg per ml.
v = volume akhir larutan yang ditambahkan ke dalam tanah (20 ml).
bkt = berat kering 1 g tanah.

Ulasan

- Waktu inkubasi antara 4 dan 24 jam menghasilkan reaksi linier (Rosnner, 1995).
- Hasil N-asetil glukosamin meningkat bila KCl digunakan sebagai bahan pengekstrak.
- Metode penentuan N-asetil glukosamin secara kolorimetri yang diuraikan di atas merupakan modifikasi metode Reissig *et al.* (1955). Modifikasi oleh Rodriguez-Kabana *et al.* (1983) mencakup beberapa tahap, yaitu penyiapan substrat, penggunaan natrium asidina (NaN_3) sebagai pengganti toluena, nilai pH buffer, konsentrasi substrat, ekstraksi N-asetilglukosamin dengan KCl, dan reaksi pewarnaan.
- Rossner (1991) menggunakan NaN_3 sebagai pengganti toluena untuk menghambat aktivitas mikroba.

4.1.2 Pengujian Aktivitas Kitinase (Monreal & Reese, 1968)

Prinsip

Metode ini digunakan untuk pengujian aktivitas enzim pada isolat (biakan) murni baik terhadap bakteri, fungi ataupun aktinomiset. Sebelum diuji mikroba terlebih dahulu diremajakan dalam media padat selanjutnya ditumbuhkan dalam media cair yang mengandung koloidal kitin sehingga menghasilkan enzim kitinase. Untuk pengujian rutin, 1,5% koloidal kitin digunakan untuk bakteri dan 2% koloidal kitin untuk fungi. Media tumbuh, suhu inkubasi dan lamanya masa inkubasi disesuaikan dengan kebutuhan mikroba. Enzim kasar kitinase dipisahkan dari sel dengan cara sentrifugasi pada suhu dingin (4°C) untuk menghindari denaturasi protein. Sel akan mengendap dan enzim akan terlarut dalam supernatan. Enzim kasar dimurnikan dari senyawa lainnya dengan cara pemekatan medium pertumbuhan yang dapat dilakukan dengan beberapa cara yaitu ultrafiltrasi, liofilisasi, dan pengendapan protein dengan amonium sulfat, aseton, etanol atau polietilen glikol (PEG) (Scopes, 1944). Pengendapan protein dengan amonium sulfat adalah cara yang paling banyak digunakan karena amonium sulfat mudah didapatkan, harganya relatif murah, bersifat menstabilkan enzim serta dapat mencegah aktivitas enzim proteolitik. Aktivitas enzim kitinase

dihitung berdasarkan N-asetil glukosamin yang terbentuk dari hidrolisis kitin dimana N-asetil glukosamin digunakan sebagai kurva standar.

Alat

- Inkubator goyang
- Pipet mikro dan tip
- Spektrofotometer
- Sentrifus dan tabung
- Penangas air
- Cawan Petri
- Kromatografi filtrasi gel sepharose 6B

Bahan

- Media PDA
 - Campurkan 200 ml ekstrak kentang (yang diperoleh dari hasil rebusan 200 g kentang yang dipotong-potong kecil dalam 500 ml akuades pada suhu 100°C selama 1 jam), 20 g dekstrosa, 15 g agar, dan tambahkan akuades hingga volume 1 L. Sterilisasi media dengan autoklaf pada temperatur 121°C selama 15 menit.
- Media malt ekstrak
 - Timbang 20 g malt ekstrak dan 20 g agar kemudian masukkan ke dalam 1 L akuades. Sterilisasi media dengan autoklaf pada temperatur 121°C selama 15 menit.
- Bufer fosfat pH 6,2
 - Buat stok larutan 0,2M NaH₂PO₄ dengan cara melarutkan 27,6 g NaH₂PO₄ dalam 1 L akuades dan stok larutan 0,2M NaH₂PO₄ dengan cara melarutkan 28,4 NaH₂PO₄ dalam 1 L akuades. Selanjutnya campur 81,5 ml stok larutan 0,2M NaH₂PO₄ dengan 19,5 ml stok larutan 0,2M NaH₂PO₄. Sterilisasi dengan autoklaf pada temperatur 121°C selama 15 menit.
- Amonium sulfat 80% (b/v)
 - Timbang 80 g amonium sulfat dan larutkan dalam 100 ml akuades. Sterilisasi dengan autoklaf pada temperatur 121°C selama 15 menit.
- Dinitrosalisilat (DNS)
- Koloidal kitin

Prosedur

- Tumbuhkan fungi *Trichoderma harzianum* pada medium PDA, kemudian potong lapisan miselia 0,4 cm x 0,4 cm dan pindahkan ke 25 ml media malt ekstrak pH 6,2 yang mengandung 2% koloidal kitin. Sebagai kontrol, tumbuhkan fungi pada media malt ekstrak tanpa koloidal kitin.

- Kocok biakan selama 2 jam dan sentrifugasi dengan kecepatan 5.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4⁰C.
- Murnikan supernatan (enzim kasar) yang diperoleh dengan ekstraksi dan kromatografi filtrasi gel. Setelah itu, pisahkan supernatan dan endapkan dengan penambahan amonium sulfat jenuh 80% (b/v) sambil dikocok selama 30 menit.
- Inkubasi campuran selama semalam pada suhu 4⁰C, lalu sentrifugasi dengan kecepatan 5.000 rpm selama 10 menit pada suhu yang sama.
- Pisahkan endapan dan larutkan dalam bufer fosfat pH 6,2.
- Murnikan hasil ekstraksi dengan menggunakan kromatografi filtrasi gel Sepharose 6B dalam bufer fosfat pH 6,2.
- Tambahkan 1 ml larutan enzim ke dalam 1 ml koloidal kitin 1% (v/v) dalam bufer fosfat pH 6,2.
- Inkubasi pada suhu 37⁰C selama 15 menit. Setelah inkubasi, tambahkan 4 ml DNS dan panaskan dalam air mendidih selama 5 menit.
- Dinginkan campuran pada suhu kamar dan ukur segera kerapatan optis larutan dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm dalam waktu tidak lebih dari 20 menit.
- Semua pengukuran harus dilakukan dengan pengulangan paling sedikit dua ulangan untuk mendapatkan hasil yang maksimum.

Kurva kalibrasi

Pembuatan kurva kalibrasi sama dengan metode Rodriguez-Kabana *et al.* (1983) yang dimodifikasi Rössner (1991).

Perhitungan

Satu unit (U) aktivitas kitinase setara dengan 1 mol N-asetilglukosamin yang dihasilkan selama 1 menit. Aktivitas kitinase dihitung berdasarkan N-asetilglukosamin yang terbentuk dari hidrolisis kitin seperti pada persamaan berikut:

$$A \text{ unit} = \frac{[\text{N-AGA}] \cdot 1.000 \cdot 2 \cdot T}{\text{BM N - AGA}}$$

Keterangan:

- A = Aktivitas kitinase (unit)
- [N-AGA] = Konsentrasi N-asetilglukosamin
- BM N-AGA = Berat molekul N-asetilglukosamin
- T = waktu inkubasi

DAFTAR PUSTAKA

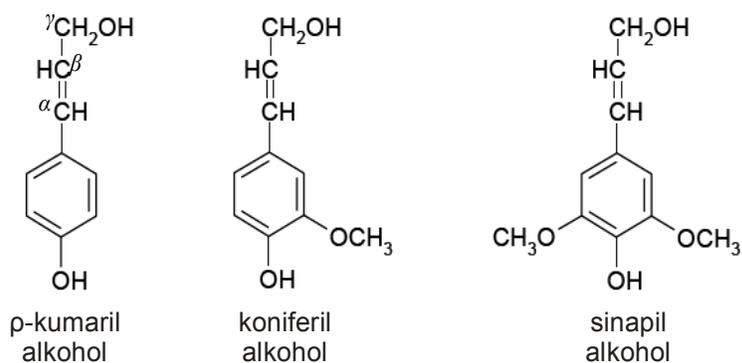
- Alef, K & P. Nannipieri. 1995. Chitinase activity. p. 360-361. *In* K. Alef & P. Nannipieri (Eds.) *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Acad. Press. London.
- Berges, L.R. & D.M. Reynolds. 1958. The chitinase system of a strain of *Streptomyces griseus*. *Biochim. Biophys. Acta* 29: 522-534
- Cabib, E. 1987. The synthesis and degradation of chitin. p 59-101. *In* A. Meister (Ed.) *Advances in Enzymology*. Vol. 59. An Interscience Publ. John Wiley and Sons Inc. N.Y.
- Chernin, L., Z. Ismailo, S. Haran, & I. Chet. 1995. Chitinolytic *Enterobacter agglomerans* antagonistic to fungal plant pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1720-1726.
- Harman, GE., CK. Hayes, M. Lorito, RM Broadway, A. Di Pietro, C. Peterbauer, & A. Tronsmo. 1993. Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*: Purification of chitobiosidase and endochitinase. *Phytopathology* 83: 313-318.
- Inbar, J. and I. Chet. 1991. Evidence that chitinase produced by *Aeromonas caviae* is involved in the biological control of soil borne plant pathogens by this bacterium. *Soil. Biol. Biochem.* 23:973-978.
- Jeaniaux, C. 1966. Chitinases. p. 644-650. *In* E.F. Neufeld & V. Ginburg (Eds.) *Complex Carbohydrates, Methods in Enzymology*. Vol. VII. Acad. Press. N.Y.
- Monreal, J. & E.T. Reese. 1968. The Chitinase of *Serea marcescens*. *Can. J Microbiol.* 15:689-696.
- Reissig, J.L., J.L. Strominger, & L.F. Leloir. 1955. A modified method for estimation of N-asetilamino sugars. *J. Biol. Chem* 217: 959-966.
- Richards, G. 1951. *The Integument of Arthropods. The Chemical Component and Their Properties: The Anatomy and Development and Permeability*. University of Minnesota Press. Minneapolis.
- Rodriguez-Kabana R., G. Godoy, G. Morgan-Jones, & R.A. Shelby. 1983. The determination of soil chitinase activity: conditions for assay and ecological studies. *Plant Soil* 75: 95-106.
- Rössner, H. 1995. Chitinase activity. p. 201-204. *In* F. Schinner, R. Öhlinger, E. Kandeler, & R. Margesin (Eds.) *Methods in Soil Biology*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Scopes, R.K. 1944. *Protein Purification Principles & Practice*. 3rdEd. Springer-Verlag, New York.
- Tsujibo, H., Y. Yoshida, K. Miyamoto, T. Hasegawa, & Y. Inamori. 1992. Purification and properties of two types of chitinase produced by alkalophilic actinomycete. *Bisci. Biotech. Biochem.* 56: 1304-1305.

- Veon, K. Mikiyeshite, Y. Sawado, & Y. Obe. 1990. Assay chitinase and N-acetylglucosamidase activity in forest soils with 4-methylumbelliferyl derivatives. *Z. Pflanzenernähr Bodenkd.* 154: 171-175.
- Yanai, K., N. Kojima, N. Takaya, H. Horiuchi, & A. Ohta. 1994. Isolation and characterization of two chitin synthase genes from *Aspergillus nidulans*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56:1828-1835.

LIGNINASE

Erny Yuniarti & Rasti Saraswati

Lignin merupakan polimer aromatik kompleks yang menyusun 20-30% tanaman kayu dan jaringan vaskuler lainnya. Polimer lignin tersusun atas monomer fenilpropana yang umumnya terdiri atas monomer *p*-kumaril alkohol, koniferil alkohol, dan sinapil alkohol (Gambar 1). Komposisi lignin ini sangat bervariasi antar jenis tanaman (Palonen, 2004). Unit molekul fenilpropana yang menyusun lignin adalah ikatan C-C dan ikatan eter (C-O-C) yang tidak dapat dihidrolisis karena strukturnya tersusun atas monomer senyawa aromatik tidak beraturan, heterogen dan bersifat hidrofobik (dibandingkan dengan hemiselulosa dan selulosa). Sifat inilah yang menyebabkan lignin resisten terhadap aktivitas sebagian besar organisme dan sistem biodegradasinya relatif non spesifik dan ekstraselular.



Gambar 1. Monomer penyusun lignin (Buswell & Odier, 1987)

Ikatan eter merupakan ikatan yang paling banyak pada polimer lignin (dua pertiga) atau lebih dan sisanya adalah ikatan karbon dengan karbon. Gugus fungsional yang mempengaruhi reaktivitas lignin meliputi gugus hidroksi fenol, metoksil, benzil alkohol, dan gugus karbonil. Lignin umumnya ditemukan membentuk kompleks dengan selulosa dan hemiselulosa yang disebut kompleks lignin-polisakarida (Sjostrom, 1995).

Mikroba dari beberapa jenis fungi (cendawan), bakteri, dan aktinomiset menunjukkan aktivitas ligninolitik (perombak lignin), namun fungi kelompok basidiomisetes merupakan perombak lignin paling efisien.

Karakterisasi enzim-enzim ligninolitik telah banyak dilakukan terhadap basidiomisetes terutama fungi busuk putih. Tiga enzim utama yang bertanggung jawab dalam depolimerasi lignin adalah 1) lignin peroksidase (LiP), 2) manganase peroksidase (MnP), dan 3) lakase. Pola ekspresi enzim-enzim tersebut tergantung organisme, beberapa menghasilkan LiP dan MnP sedangkan yang lain MnP dan Lakase (Okhuma *et al.*, 2001) atau paling sedikit satu di antara ketiga enzim tersebut (Dey *et al.*, 1994; Eggert *et al.*, 1996; Tuor *et al.*, 1995; Lankinen, 2004).

Lakase merupakan komponen enzim yang paling umum. Lakase mengkatalisis pelepasan atom hidrogen dari gugus hidroksil pada substrat mono- dan poliaromatik tersubstitusi ortho dan para serta amina aromatik dengan pengurangan satu elektron membentuk radikal bebas yang mampu mengalami depolimerasi, repolimerasi, demetilasi atau pembentukan kuinon. Oksidasi metoksihidrokuinon selama degradasi lignin diikuti oleh autooksidasi metoksisemikuinon membentuk radikal anion superoksida, yang dapat mengalami reaksi lanjut (Guillen *et al.*, 2000) oleh lakase atau reaksi no-enzimatik yang meliputi hidrasi, disproportionasi, dan polimerasi (Thurston, 1994).

MnP, peroksidase yang mengandung heme, mengoksidasi senyawa fenolik menjadi radikal fenoksi melalui oksidasi Mn(II) menjadi Mn(III) dengan H₂O₂ sebagai oksidan. Mn(III) dikelat oleh asam-asam organik (oksalat atau malat). Mn(III) yang terkelat mengoksidasi senyawa fenol lignin menjadi radikal fenoksi dan atau terdegradasi secara spontan (Hofrichter, 2002). Sedangkan LiP, peroksidase yang mengandung heme, berperan dalam oksidasi senyawa aromatik non-fenolik. Radikal kation yang dihasilkan didekomposisi secara kimiawi (Conesa *et al.*, 2002).

Kelompok enzim lain, yang memiliki sifat struktural dan fungsional kombinasi dari LiP dan MnP adalah *versatile peroksidase* (VP). VP mampu mengoksidasi Mn²⁺, senyawa-senyawa fenolik, dan senyawa non-fenolik seperti veratril alkohol, dan enzim-enzim yang terlibat dalam produksi hidrogen peroksida seperti glioksal oksidase dan aril alkohol oksidase (Lankinen, 2004). Enzim ligninolitik dan fungsi reaksi tertera pada Tabel 1.

4.2.1 Prinsip

Laju oksidasi substrat (guaiakol, veratril alkohol, siringaldazina) oleh aktivitas ligninase (lignin peroksidase, mangan peroksidase, dan lakase) dari ekstrak kompos atau supernatan biakan murni terdapat dalam campuran reaksi. Setelah inkubasi pada suhu ruang selama 15 menit, veratraldehid yang terbentuk oleh aktivitas lignin peroksidase, guaiakol yang berkurang oleh aktivitas mangan peroksidase, atau kuinon yang terbentuk oleh aktivitas lakase terukur dengan spektrofotometer pada berturut-turut

pada panjang gelombang 465 nm, 310 nm, dan 525 nm. Adanya lakase dalam supernatan biakan dideterminasi secara kualitatif dan cepat dengan metode *plate assay* menggunakan medium agarose (0,5%) cawan mengandung $14 \mu\text{mol ml}^{-1}$ ABTS 2,2'-azinobis(3-ethyl-benzathiazoline-6-sulfonic acid) dalam 50 mM glisin-HCl (pH 3) sebagai substrat. Uji positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna hijau kebiruan setelah inkubasi selama 1 jam di sekitar sumur (lubang) yang ditetesi supernatan biakan.

Tabel 1. Enzim ligninolitik dan fungsi reaksinya

Enzim dan singkatan	Kofaktor	Substrat, mediator	Reaksi
Lignin peroksidase, LiP	H ₂ O ₂	Veratril alkohol	Cincin aromatik dioksidasi menjadi radikal kation
Manganase peroksidase, MnP	H ₂ O ₂	Mn, asam-asam organik, kelator, thiol, asam-asam lemak tidak jenuh	Mn(II) dioksidasi menjadi Mn(III); Mn(III) yang dikelat mengoksidasi senyawa-senyawa fenolik menjadi radikal fenoksil, reaksi lain dengan keberadaan senyawa tambahan
Versatile peroksidase, VP	H ₂ O ₂	Mn, veratril alkohol, senyawa-senyawa yang sama terhadap LiP dan MnP	Mn(II) dioksidasi menjadi Mn(III), oksidasi senyawa fenolik dan non-fenolik, dan pewarna
Lakase	O ₂	Fenol, mediator yaitu hidroksi-benzotriazol atau ABTS	Fenol dioksidasi menjadi radikal Fenoksil; reaksi lain dengan keberadaan mediator
Glioksal oksidase, GLOX		Glioksal, metil glioksal	Glioksal dioksidasi menjadi asam glioksal; produksi H ₂ O ₂
Aril alkohol oksidase, AAO		Aromatik alkohol (anisil, veratril alkohol)	Aromatik alkohol dioksidasi menjadi aldehid; produksi H ₂ O ₂
Enzim-enzim lain yang memproduksi H ₂ O ₂		Banyak senyawa organik	O ₂ dioksidasi menjadi H ₂ O ₂

Sumber: Lankinen (2004)

4.2.2 Pengukuran Aktivitas Ligninase

Alat

- Spektrofotometer
- Kuvet
- Sentrifus dan ultrasentrifus
- Mikropipet (5 ml, 1 ml, 200 μ l, 20 μ l)
- Ultrafilter Amicon

Bahan

- Media produksi (Glenn & Gold, 1985, modifikasi)
 - Larutkan 0,6 g KH_2PO_4 ; 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,4 g K_2HPO_4 ; 0,1 g NH_4NO_3 ; 0,1 g KCl; 2 g *malt extract*; 10 g serbuk jerami; 10 ml larutan unsur mikro dengan 1.000 ml akuades. Sterilisasi media produksi pada suhu 121°C dan tekanan 0,1 Mpa selama 15 menit.
- Larutan unsur mikro
 - Larutkan 140 mg MnSO_4 , 40 mg $\text{ZnNO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1 g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 60 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ berturut-turut dengan 500 ml akuades dalam labu takar 1.000 ml, lalu cukupkan volume menjadi sampai 1.000 ml.
- Guaiakol 1 mM
 - Ambil 11,85 μ l akuades dari 100 ml akuades dalam botol gelap lalu masukkan ke dalamnya 11,85 μ l guaikol (8,94 M), kocok dengan magnet pengocok.
- Bufer McIlvaine (pH 4,5-6), yang terdiri atas:
 - A: 0,1 M asam sitrat (19,24 g dalam 1.000 ml akuades)
 - B: 0,2 M *dibasic sodium phosphate* (53,65 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dalam 1.000 ml akuades). Sebanyak x ml larutan A dan y ml larutan B dicampur lalu ditera sampai dengan volume 100 ml dengan akuades.

pH	Larutan A (ml)	Larutan B (ml)	Akuades (ml)	Total (ml)
4,5	26,7	23,3	50	100
5,0	24,3	25,7	50	100
5,5	21,0	29,0	50	100
6,0	17,9	32,1	50	100

- H_2O_2 50 μ M

- Ambil 510 µl akuades dari 100 ml akuades dalam botol gelap lalu masukkan ke dalamnya 11,85 µl H₂O₂ (9,79 M), kocok dengan magnet pengocok.
- MnSO₄ 0,2 mM
 - Larutkan 30,204 g MnSO₄ dengan akuades dalam labu takar 1.000 ml, kemudian cukupkan volumenya menjadi 1.000 ml.
- Larutan stok siringaldazina 0,75 mM
 - Larutkan 0,02703 g dengan etanol 100 ml dan simpan dalam botol gelap.
- Bufer natrium tartrat 100 mM pH 3,5
- Veratril alkohol 2 mM
 - Larutkan 30 µl veratril alkohol (*3,4-dimethoxybenzyl alcohol*) 96% dengan 99,97 ml bufer natrium tartarat 100 mM pH 3,5.
- Bufer glisin-HCl 50 mM, pH 3,0
 - Larutkan 3,754 g dengan 950 ml akuades lalu sesuaikan pH larutan dengan menambah HCl pekat tetes demi tetes sampai mencapai pH 3, kemudian cukupkan volumenya menjadi 1.000 ml dengan akuades.
- ABTS 2,2'-azinobis(3-ethylbenzathiazoline-6-sulfonic acid) 14 mM
 - Larutkan 0,768 g ABTS dengan bufer glisin-HCl 50 mM, pH 3
 - lalu cukupkan volumenya menjadi 100 ml dengan bufer yang sama.
- Bufer Sitrat 0,1 M (pH 3,0-4,5)
Larutan terdiri atas:
 - A : 0,1 M asam sitrat (19,24 g dalam 1.000 ml akuades)
 - B : 0,1 M natrium sitrat dihidrat (29,4 g dalam 1.000 ml akuades)
 Sebanyak x ml larutan A dan y ml larutan B dicampur lalu ditera sampai dengan volume 100 ml dengan akuades.

pH	Larutan A (ml)	Larutan B (ml)	Akuades (ml)	Total (ml)
3,0	46,5	3,5	50	100
3,5	37,0	13,0	50	100
4,0	33,0	17,0	50	100
4,5	25,5	24,5	50	100

Prosedur

- 33) Penyiapan enzim ekstrak kasar dari Supernatan biakan murni
- Tumbuhkan fungi dalam medium produksi enzim Glenn & Gold (1985) yang dimodifikasi lalu inkubasi pada suhu ruang selama 5 hari.
 - Sentrifus biakan fungi lalu pekatkan supernatan (mengandung lignin peroksidase) 10 kali dengan ultra filtrasi menggunakan filter yang menahan massa dengan berat molekul 10 kDa (PM-10; Amicon Div., W. R. Grace & Co., Danvers, Mass.).
- 34) Penyiapan enzim ekstrak kasar dari kompos
- Siapkan 2,27 kg kompos yang ditumbuhi miselium fungi lalu press dengan press hidraulik kecil (660 lbs in²) untuk mendapatkan cairan (ekstrak).
 - Filter cairan (ekstrak kompos) dengan beberapa lembar kain katun tipis, kemudian partikel-partikelnya dipisahkan dengan sentrifusi 2 kali selama 20 menit pada 13,000 rpm.
 - Pekatkan filtrat dengan ultrasentrifusi (Amicon; filter menahan massa dengan berat molekul 25 kDa).
 - Dialisis filtrat yang telah dipekatkan terhadap larutan Natrium fosfat 0,01 M (pH 6,8) lalu analisis aktivitas enzim ligninolitik ekstrak kompos.
- 35) Lakase secara kualitatif dengan *plate assay* (Srinivasan *et al.*, 1995)
- Metode ini merupakan determinasi cepat untuk mengetahui adanya lakase dalam supernatan biakan.
 - Tempatkan medium agarose (0,5%) yang mengandung 14 µmol ABTS 2,2'-azinobis(3-ethylbenzathiazoline-6-sulfonic acid) per ml dalam 50 mM dalam bufer glisin-HCl (pH 3) ke cawan Petri steril (100 x 15 mm).
 - Buat 3 lubang (diameter 5mm) pada gel agarose menggunakan ujung lebar pipet Pasteur steril lalu isi lubang pertama dengan 20 µl larutan biakan uji, lubang kedua dengan 20 µl larutan biakan uji yang dipanaskan pada air mendidih selama 5 menit dan digunakan sebagai kontrol negatif. Kemudian isi lubang ketiga dengan 2 µl lakase dari *Pyricularia oryzae* (Sigma Chemical Co) sebagai kontrol positif. Terbentuknya warna hijau kebiruan setelah inkubasi selama 1 jam di sekitar sumur dianggap sebagai uji aktivitas lakase positif.
- 36) Mangan peroksidase (MnP) dengan guaiakol sebagai subtrat (Bonnen *et al.*, 1994)
- Buat campuran reaksi dengan komposisi I dan II sebagai berikut:

Campuran reaksi I	Campuran reaksi II
1 mM guaiakol	1 mM guaiakol
Bufer McIlvaine pH 5,5	Bufer McIlvaine pH 5,5
50 µM H ₂ O ₂	-
0,2 mM MnSO ₄	-
ml larutan enzim	ml larutan enzim
Total volume larutan 5 ml	Total volume larutan 5 ml

- Kocok perlahan campuran reaksi I dan II dengan vortex lalu inkubasi selama 15 menit pada suhu ruang. Untuk kontrol, didihkan masing-masing campuran reaksi selama 60°C selama 5 menit.
- Ukur absorbansi campuran reaksi pada panjang gelombang 465 nm sebelum dan sesudah inkubasi. Satu unit aktivitas MnP = unit aktivitas enzim pada campuran reaksi I (aktivitas total) - unit aktivitas pada campuran reaksi II (aktivitas lakase). Satu unit aktivitas MnP didefinisikan dengan jumlah enzim yang diperlukan untuk oksidasi 1 μmol guaiakol per menit. Jumlah guaiakol yang hilang dihitung dengan rumus sbb:

$$\Delta c = (A_0 - A_t) / k \cdot b$$

Keterangan:

Δc = jumlah guaiakol yang hilang selama pengamatan (mol L^{-1})

A_0 = nilai absorbansi pada awal reaksi

A_t = nilai absorbansi pada t menit

k = molar absorptivitas guaiakol = $12.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

b = tebal larutan (1 cm)

Unit aktivitas MnP = (aktivitas total enzim) – (aktivitas lakase)

$$\text{Aktivitas total enzim} = \frac{\Delta c_1 \times 10^6 \times \text{vol. larutan total} \times 10^3}{\text{menit} \times \text{vol. larutan enzim (ml)}}$$

$$\text{Aktivitas lakase} = \frac{\Delta c_2 \times 10^6 \times \text{vol. larutan total} \times 10^3}{\text{menit} \times \text{vol. larutan enzim (ml)}}$$

Keterangan:

Δc_1 = perubahan absorbansi campuran reaksi I sebelum dan sesudah inkubasi

Δc_2 = perubahan absorbansi campuran reaksi II sebelum dan sesudah inkubasi

37) Lignin peroksidase (LiP) dengan veratril alkohol sebagai substrat.

- Buat campuran reaksi dengan volume total 5 ml terdiri atas:
 - 2 mM veratril alkohol di dalam 100 mM natrium tartrate pH 3,5
 - 0,2 – 0,5 ml larutan enzim
 - 0,05 – 0,1 mM H_2O_2
- Kocok perlahan campuran reaksi dengan vortex lalu diinkubasi selama 15 menit pada suhu ruang.
- Untuk larutan kontrol, didihkan campuran reaksi pada 60°C selama 5 menit.

- Ukur absorbansi campuran reaksi pada panjang gelombang 310 nm sebelum dan sesudah inkubasi. Satu unit aktivitas LiP didefinisikan dengan jumlah enzim yang diperlukan untuk oksidasi 1 μmol veratral alkohol menjadi veratraldehid per menit. Jumlah veratraldehid yang dihasilkan dihitung dengan rumus sbb:

$$\Delta c = (A_t - A_0) / k \cdot b$$

Keterangan:

Δc = jumlah veratraldehid yang terbentuk selama t menit (mol L^{-1})

A_0 = nilai absorbansi pada awal reaksi

A_t = nilai absorbansi pada t menit

k = molar absorptivitas veratraldehid $9.300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

b = tebal larutan (1 cm)

$$\text{Uni aktivitas LiP} = \frac{\Delta c \times 10^6 \times \text{vol. larutan total} \times 10^3}{\text{menit} \times \text{vol. larutan enzim (ml)}}$$

38) Lakase dengan syringaldazina sebagai substrat (Bonnen *et al.*, 1994)

- Buat campuran reaksi dengan volume total 4 ml terdiri atas:
 - 2,5 ml bufer McIlvaine (pH6,0)
 - 1 ml syringaldazina 0,075 mM
 - 0,5 ml larutan enzim
- Kocok perlahan campuran reaksi dengan vortex lalu inkubasi selama 15 menit pada suhu ruang.
- Untuk kontrol, didihkan campuran reaksi pada 60°C selama 5 menit.
- Ukur absorbansi campuran reaksi pada panjang gelombang 525 nm sebelum dan sesudah inkubasi. Satu unit aktivitas lakase didefinisikan dengan jumlah enzim yang diperlukan untuk untuk mengoksidasi 1 μmol syringaldazina menjadi kuinon per menit. Jumlah kuinon yang dihasilkan dihitung dengan rumus sbb:

$$\Delta c = (A_t - A_0) / k \cdot b$$

Keterangan:

Δc = jumlah kuinon yang dibentuk selama t menit ($\mu\text{mol ml}^{-1}$)

A_0 = nilai absorbansi pada awal reaksi

A_t = nilai absorbansi pada t menit

k = molar absorptivitas kuinon = $65.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

b = tebal larutan (1 cm)

$$\text{Unit aktivitas lakase} = \frac{\Delta c \times 10^6 \times \text{vol. larutan total} \times 10^3}{\text{menit} \times \text{vol. larutan enzim (ml)}}$$

4.2.3 Ulasan

Beberapa catatan berikut penting untuk diperhatikan dalam analisis ligninase, yaitu:

- Untuk mendapatkan konsentrasi enzim yang tinggi, supernatan yang mengandung enzim dapat dipekatkan lebih tinggi.
- Panen supernatan enzim sebaiknya dilakukan pada setiap interval waktu tertentu untuk menentukan waktu produksi enzim dengan aktivitas maksimum.
- Sebaiknya uji aktivitas enzim ligninolitik ditentukan pada berbagai bufer dan pH serta suhu untuk mendapatkan kondisi optimum.

DAFTAR PUSTAKA

- Bonnen, A.M., L.H. Anton, & A.B. Orth. 1994. Lignin-degrading enzymes of the commercial button mushroom, *Agricus bisporus*. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 960-965.
- Boominathan, K., S.B. Das, T.A. Randall, & C.A. Redy. 1990. Lignin peroxidase-negatif mutant of the White Rot Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Bacteriology*. 172: 260-265.
- Buswell, J.A. & E.Odier. 1987. Lignin biodegradation. *Rev. Biotechnol.* 6: 1-60.
- Conesa, A., P.J. Punt, & C.A. Van den Hondel. 2002. Fungal peroxidase: molecular aspects and application. *J. Biotechnol.* 93: 143-158.
- Dey, S., T.K. Maiti, & B.C. Bhattacharya. 1994. Production of some extracellular enzymes by lignin peroxidase producing brown rot fungus *Polyporus ostreiformis* and its comparative abilities for lignin degradation and dye decolorization. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 4216-4218.
- Eggert, C.U., U. Temp, & K.E. Eriksson. 1996. Laccase-producing white-rot fungus lacking lignin peroxidase and manganese peroxidase. *ACS Symp.Ser.* 655: 130-150.
- Glenn, J.K. & M.H. Gold. 1985. Purification and characterization of an extracellular Mn(II)-dependent peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete. *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Biochem. Biophys* 242: 329-341.
- Guillen, F., C. Munot, V. Gomes-Toribio, A.T. Martinez, & M.J. Martinez. 2000. Oxygen activation during the oxidation of methoxyhydroquinone by laccase from *Pleurotus eryngii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 170-175.

- Hofrichter, M. 2002. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme Microb. Technol.* 30, 454-466.
- Lankinen, P. 2004. Ligninolytic enzymes of the basidiomycetous fungi *Agaricus bisporus* and *Phlebia radiata* on lignocellulose-containing media. Academic Dissertation in Microbiology. <http://www.u.arizona.edu/~leam/lankinen.pdf>. [10 Desember, 2005].
- Okuhuma, M., Y. Maeda, T. Johjima, & T. Kudo. 2001. Liginin degradation and roles of white rot fungi: Study on an efficient symbiotic system in fungus-growing termites and its application to bioremediation. *RIKEN Review*. 42: 39-42.
- Palonen. 2004. Role of Lignin in the Enzymatic hydrolysis of lignocelullose. <http://www.vtt.fi/inf/pdf>. [25 Oktober, 2005].
- Srinivasan, C, T.M. D'souza, K. Boominathan, & C.A. Reddy. 1995. Demonstration of laccase in white rot Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F1767. *Appl. Environ.Microbiol.* 61(12): 4274-4277.
- Sjostrom, E. 1995. Kimia Kayu: Dasar-dasar dan Penggunaan. Ed. Ke-2. Hardjono Sastrohamidjojo, penerjemah. Yogyakarta: Gajah Mada University Press. Terjemahan dari: Wood Chemistry, Fundamentals and Aplications, second edition.
- Thurson, C.F. 1994. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*. 140: 61-73
- Tuor, U., K. Winterhalter, & A. Fiechter. 1995. Enzyme of white rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. *J. Biotechnol.* 41: 1-17.

SELULASE

Rosmimik

Selulase adalah suatu enzim yang menghidrolisis senyawa selulosa menjadi glukosa. Dalam proses hidrolisis, enzim ini bekerja secara sinergis dengan beberapa enzim selulase lainnya (endo- β -1,4 glukonase, selobiohidrolase, β -glukosidase). Endo- β -1,4 glukonase dikenal dengan nama enzim CMC-ase karena enzim ini sangat aktif memutuskan turunan selulosa dapat larut (selulosa amorf) seperti *carboxyl methyl cellulose* (CMC) dan hidroksietil selulosa (HEC); enzim ini menyerang secara acak, tidak menyerang selobiosa tapi menghidrolisis selodektrin. Selobiohidrolase (ekso) menyerang selodektrin tetapi tidak menyerang selulosa yang sudah disubstitusikan serta tidak dapat menghidrolisis selobiosa. β -glukosidase menghidrolisis selobiosa dan rantai pendek selo-oligosakarida dan menghasilkan glukosa. Selulase lengkap yang digunakan untuk mengukur aktivitas campuran enzim menghidrolisis bahan yang mengandung selulosa dan menghasilkan glukosa sebagai produk akhir. Aktivitas selulase lengkap menggambarkan pengaruh sinergisme antara enzim yang berbeda dan pengaruh hambatan dari produk akhir.

Masing-masing dari tiga enzim ini mempunyai karakteristik berbeda, demikian juga jumlahnya. Perbedaan sumber substrat akan menghasilkan jumlah atau bentuk masing-masing enzim yang berbeda.

Mekanisme hidrolisis selulosa oleh selulase secara enzimatik terbagi dua tahap yaitu tahap aktivasi dan hidrolisis. Endoglukanase (EG=Cx) menyerang bagian amorf serat selulosa, dan membuka jalan bagi kerja enzim selobiohidrolase (CBH=C1). Kedua enzim ini bekerja sama membebaskan selobiosa dari serat selulosa. Baik endoglukanase maupun selobiohidrolase tidak mampu memecahkan selobiosa, sehingga diperlukan enzim lain yaitu β -glukosidase yang menguraikan selobiosa menjadi glukosa. Selulosa alamiah sangat tahan terhadap hidrolisis enzimatik karena adanya struktur kristal dan lapisan lignin yang menyebabkan selulosa tahan terhadap serangan selulase (Mandels *et al.*, 1981).

Selulase dihasilkan oleh cendawan (*fungi*) dan bakteri. Selulase yang dihasilkan oleh cendawan merupakan enzim yang dapat diinduksi. Selobiosa, selulosa, sapharosa dan laktosa merupakan senyawa yang dapat menginduksi selulase (Enari, 1983).

4.3.1 Prinsip

Aktivitas komponen selulase yaitu endoglukanase, selobiohidrolase, dan β -glukosidase didasarkan atas pengukuran glukosa yang dihasilkan dengan metode *dinitrosalicylic acid* (DNS) (Mandels *et al.*, 1976). Metode pengukuran selulase yang diuraikan berikut mengikuti metode Miller (1959).

4.3.2 Produksi Selulase (Mandels & Weber, 1969)

Alat

- Labu Erlenmeyer
- Penangas air goyang
- Neraca analitik

Bahan

- Biakan yang akan di ukur
- Glukosa sebagai sumber substrat 1% (CMC, avisel, jerami, dll.).
- Pereaksi
- Medium Mandels untuk cendawan
 - Larutkan 10 ml $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 14%; 10 ml KH_2PO_4 20%; 10 ml $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3%; 10 ml urea 3%; 1 ml CaCl_2 30%; 1 ml $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5%; 1 ml MnSO_4 1,6%; 1 ml ZnSO_4 1,4%; dan 1 ml CoCl_2 2% dengan 500 akuades lalu tepatkan volumenya menjadi 1 L.
(Catatan: Cara membuat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 14% adalah dengan melarutkan 14 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dalam 100 ml akuades).
- Medium untuk bakteri
 - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2%
 - $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01%
 - Unsur mikro $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 100 ppm; CuSO_4 2,5 ppm; H_3BO_3 1,2 ppm; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 12,3 ppm; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 11,3 ppm; Na_2MoO_4 4,1 ppm; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 361 ppm; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2,5 ppm.
 - A. Larutkan $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dalam 500 ml akuades lalu tambah dengan $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ yang telah dilarutkan dalam akuades.
 - B. Ambil 0,3 ml H_2SO_4 lalu masukan ke dalam 1 L akuades dan tambahkan $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, kemudian aduk sempurna.
 - C. Campurkan larutan B ke dalam larutan A lalu tepatkan volumenya menjadi 14 L.

- D. Larutkan H_3BO_3 dan Na_2MoO_4 masing-masing ke dalam 1 L akuades lalu campurkan keduanya, aduk dan masukan ke dalam larutan C.
- E. Tepatkan larutan D dengan asam sulfat sampai pH 5,7 lalu tepatkan dengan akuades sampai volume akhir 20 L.
- Larutkan 6 ml $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2%, 10 ml $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01%, dan 4 ml unsur mikro dengan 500 ml akuades lalu tepatkan menjadi 1 L.

Prosedur

- Masukkan 40 ml médium ke dalam labu Erlenmeyer 125 ml, dan 5 g subtrat glukosa (1%), kemudian autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.
- Setelah dingin masukan 1 g contoh (padat) atau 1 ose contoh (biakan) yang akan diukur.
- Inkubasi pada inkubator goyang dengan kecepatan 125 rpm selama 5 hari untuk bakteri dan 7 hari untuk cendawan. Panen enzim dan sentrifus dengan kecepatan 10.000 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C . Filtrat yang diperoleh digunakan sebagai sumber enzim yang akan dianalisis.

4.3.3 Pengukuran Aktivitas Endoglukanase (CMCase)

Alat

- Tabung reaksi
- Pipet mikro 1 ml
- Spektrofotometer

Bahan

- Filtrat enzim yang diperoleh dari hasil produksi enzim
- Karboksimetilselulase (CMC) 1%
- Bufer sitrat pH 5,7 untuk cendawan:
 - Campurkan 2 ml asam sitrat 0,1 M (21 g L^{-1}) dengan 45 ml natrium sitrat 0,1 M ($29,41 \text{ g L}^{-1}$).
- Bufer Mcl Ivaine untuk bakteri:
 - Campur 13,8 ml dari 0,1 M asam sitrat ($21 \text{ g C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot 1\text{H}_2\text{O L}^{-1}$) dengan 0,2 M Na_2HPO_4 ($28,4 \text{ g Na}_2\text{HPO}_4$)
- Pereaksi *dinitrosalicylic acid* (DNS)
 - Campurkan 10 g NaOH dengan 182 g natrium kalium tartarat lalu larutkan dalam 600 ml akuades, kocok, setelah larut tambahkan 10 g DNS sedikit-sedikit kemudian tepatkan dengan akuades sampai 1 L dan tambah 2 g fenol dan 0,5 g Na_2SO_3 .
- Standar Glukosa

- Buat standar glukosa pada selang konsentrasi 0,02-0,5 mg ml⁻¹

Prosedur

- Masukkan 1 ml larutan enzim dan 1 ml larutan CMC 1% ke dalam tabung reaksi, kocok dan diinkubasi pada penangas air goyang pada suhu 37°C selama 30 menit. Hentikan reaksi dengan penambahan pereaksi DNS sebanyak 3 ml.
- Ukur glukosa yang terbentuk dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 575 nm. Blanko yang merupakan campuran 1,0 ml bufer dan 3 ml pereaksi DNS digunakan untuk menentukan titik nol absorbansi. Pengukuran gula pereduksi dilakukan juga terhadap filtrat enzim tanpa substrat dan substrat tanpa enzim (kontrol). Pengukuran tersebut dipakai untuk mengoreksi nilai gula pereduksi yang dihasilkan dari hidrolisis substrat oleh enzim yang terdapat pada contoh. Apabila nilai glukosa sampel di luar batas absorbansi standar, lakukan pengenceran filtrat menggunakan bufer.
- Hitung aktivitas enzim CMC-ase. Perhitungan dibuat berdasarkan 1 μmol glukosa = 0,18 mg dan 1 unit aktivitas CMC-ase = 1 μmol glukosa yang dihasilkan per menit. Apabila inkubasi dilakukan selama 30 menit maka 1 mg glukosa yang dihasilkan per ml =

$$\frac{1}{30 \times 0,18} \times \frac{\text{unit}}{\text{menit mg glukosa}} = \frac{0,185 \times \text{unit}}{\text{menit mg glukosa}}$$

$$\text{Satu unit enzim} = \frac{\text{mg glukosa} \times 0,185}{\text{ml}} \times \frac{\text{Unit}}{\text{menit mg glukosa}}$$

4.3.4 Pengukuran Aktivitas Selobiohidrolase (Ekso)

Pereaksi yang digunakan, prosedur, dan cara perhitungan aktivitas sama seperti pengukuran CMC-ase, hanya substrat yang digunakan adalah avicel mikrokristalin 1%.

4.3.5 Pengukuran Aktivitas β-glukosidase

Pereaksi yang digunakan, prosedur dan cara perhitungan aktivitas sama seperti pengukuran CMC-ase, hanya substrat yang digunakan adalah salisin 1% .

4.3.6 Pengukuran Aktivitas Selulase Lengkap (FP-ase)

Alat dan Bahan

- Lihat 4.3.3.

Prosedur

- Masukkan 0,5 ml larutan enzim dan 1 ml larutan bufer dan sepotong kertas saring ke dalam tabung reaksi, kocok dan inkubasi pada penangas air goyang pada suhu 37°C selama 60 menit. Hentikan reaksi dengan penambahan pereaksi DNS sebanyak 3 ml.
- Ukur glukosa yang terbentuk dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 575 nm. Blanko yang merupakan campuran 1,0 ml bufer dan 3 ml pereaksi DNS digunakan untuk menentukan titik nol absorbansi.
- Pengukuran gula pereduksi dilakukan juga terhadap filtrat enzim tanpa substrat dan substrat tanpa enzim (kontrol). Pengukuran tersebut dipakai untuk mengoreksi nilai gula pereduksi yang dihasilkan dari hidrolisis substrat oleh enzim yang terdapat pada contoh. Apabila nilai glukosa sampel di luar batas absorbansi standar, lakukan pengenceran filtrat menggunakan bufer.
- Hitung aktivitas enzim FP ase; 1 mg glukosa yang dihasilkan per ml =

$$\frac{1}{30 \times 0,18} \times \frac{\text{unit}}{\text{menit.mg glukosa}} = \frac{0,185 \times \text{unit}}{\text{menit.mg.glukosa}}$$

Daftar Pustaka

- Enari, T.M. 1983. Microbial cellulases. p. 183-223. *In* W.M. Fogarty (Ed.) Microbial Enzymes and Biotechnology. Appli. Science. London.
- Mandels, M., R. Andreotti, & C. Roche. 1976. Measurement of saccharifying cellulases. *Biotechnol. Bioeng. Symp* 26: 21-23.
- Mandels, M., J.H. Medeiros, R.E. Andrewotti, & F.H. Bisset. 1981. Enzymatic hydrolisis of cellulosa: evaluation of cellulase culture filtrate under use condition. *Biotech. Bioeng.* 23: 2009-2026.
- Mandels, M & J. Weber. 1969. The Productions of cellulases. *In* R.F. Gould (Ed.). Cellulases and their Applications. Advances in Chemistry Series 95. American Chemical Socie Publication. Washington D.C.
- Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31(3): 426-428.

FOSFATASE

Edi Santosa & Rohani Cinta Badia Ginting

Fosfatase termasuk enzim hidrolase yang mengkatalisis pemecahan ikatan hidrogen (Mullen, 1998). Fosfatase memecah gugus fosfat dari senyawa organik seperti asam nukleat, dan mengkatalisis berbagai reaksi pelepasan fosfat dari senyawa fosfat organik ke dalam larutan tanah. Fosfatase dihasilkan di dalam sel hidup, sebagian besar disekresikan dan secara difusi menyebar ke dalam larutan tanah. Oleh karena itu, enzim ini bisa berada dalam keadaan bebas, menempel pada koloid tanah (Lynch, 1983), pada membran sel (Horikoshi, 1991), atau melekat pada dinding sel (Richards 1978) dan bekerja di luar sel sehingga disebut enzim ekstraseluler (Tate III, 1995).

Secara umum fosfatase digunakan untuk sebutan satu kelompok enzim yang mengkatalisis hidrolisis ester fosfat (H_3PO_4) dan anhidrid fosfat (Tabatabai, 1982). Enzim ini meliputi lima kelompok utama, yaitu fosforik monoester hidrolase, fosforik diester hidrolase, trifosforik monoester hidrolase, enzim yang bekerja pada fosforil anhidrid, dan enzim yang bekerja pada senyawa P-N. Alef *et al.* (1995) mengemukakan bahwa fosforik triester hidrolase bekerja pada fosforil anhidrid dan senyawa P-N seperti fosfoamidase.

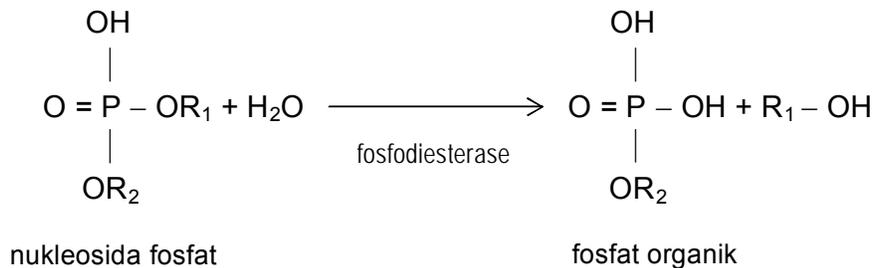
Menurut Tabatabai (1982) fosfomonoesterase terdiri atas fosfatase asam dan basa. Keduanya adalah sebagai orthofosforik monoester fosfohidrolase yang banyak dipelajari. Pengelompokan menjadi fosfatase asam dan basa karena enzim tersebut bekerja pada pH optimum yang berbeda, sebagian bekerja optimum pada pH asam dan sebagian pada pH basa. Sedangkan Alef *et al.* (1995) mengemukakan bahwa fosfomonoesterase terdiri atas enzim yang bekerja optimum pada pH 4–6 (asam), pH 6,5–7 (netral), dan pH 9–10 (basa) dengan suhu optimal 40–60°C tetapi pada pengujian menggunakan suhu 37°C. Karena pentingnya peranan enzim fosfomonotransferase dalam mineralisasi P organik tanah dan nutrisi tanaman, maka sebagian literatur menggabungkan fosfomonotransferase asam dan basa sebagai fosfomonoester tanah tetapi sebagian besar literatur menyebut sebagai fosfatase asam. Pada tanah masam kadar enzim fosfatase asam lebih banyak dibanding fosfatase basa, sebaliknya pada tanah basa fosfatase basa yang lebih banyak.

Berdasarkan jenis substrat, fosfomonoesterase meliputi fitase, nukleotidase, gulafosfatase dan gliserofosfatase. Secara umum reaksi katalisis dari fosfatase asam dan fosfatase basa sebagai berikut:



Enzim fosfomonoesterase menghidrolisis berbagai senyawa fosfomonoester di dalam tanah seperti β -gliserofosfat, β -naftil fosfat, fenilfosfat, dan *p*-nitrofenil fosfat (Tabatabai, 1982).

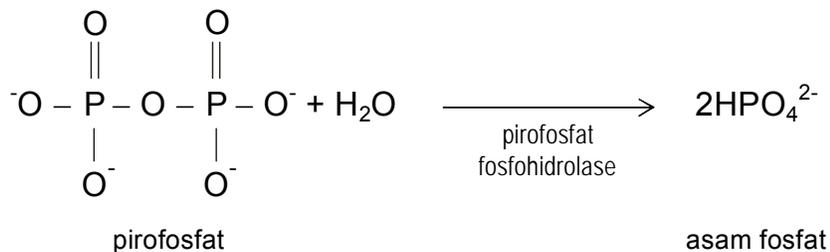
Enzim fosfodiesterase (orthofosforik diester fosfohidrolase) di dalam tanah mengkatalisis reaksi :



R₁ dan R₂ merupakan gugus alkohol, fenol atau kelompok nukleutida

Aktivitas enzim fosfodiesterase telah ditemukan pada tanaman, fauna dan mikroba. Enzim ini diketahui paling baik untuk penguraian asam nukleat dan sangat berperan pada siklus fosfat.

Pirofosfatase anorganik (pirofosfat fosfohidrolase) mengkatalisis hidrolisis pirofosfat menjadi ortofosfat, dengan reaksi:



Seperti fosfatase yang lain, pirofosfat anorganik tersebar luas di alam, terdapat pada bakteri, insekta, jaringan binatang dan tanaman.

4.4.1 Prinsip

Aktivitas fosfatase dapat diukur dengan penambahan *p*-nitrofenil fosfat ke dalam contoh tanah. Enzim fosfatase memutus gugus fosfat dan menghasilkan *p*-nitrofenol yang terekstrak dalam larutan tanah (Atlas & Bartha 1981). Penggunaan kolorimetri pada pengukuran aktivitas fosfomonoesterase didasarkan atas adanya pelepasan *p*-nitrofenol tersebut jika tanah diinkubasi dengan larutan penyangga (pH 6,5 untuk aktivitas fosfatase asam dan pH 11 untuk fosfatase basa), larutan natrium *p*-nitrofenil fosfat, dan toluena. Larutan basa dari fenol mempunyai warna kuning (larutan *p*-nitrofenol asam dan larutan *p*-nitrofenil fosfat yang asam dan basa tidak berwarna). Penggunaan $\text{CaCl}_2\text{-NaOH}$ untuk mengeluarkan *p*-nitrofenol setelah diinkubasi pada pengujian fosfatase asam dan basa bertujuan untuk (i) menghentikan aktivitas fosfatase; (ii) memunculkan warna kuning untuk pengukuran fenol; dan (iii) mendapatkan *p*-nitrofenol tanah secara kuantitatif.

Prinsip pengujian aktivitas fosfodiesterase serupa dengan pengujian fosfatase asam dan basa. *P*-nitrofenol terlarut diekstrak dan diukur dengan kolorimetri. Perbedaannya adalah untuk ekstraksi *P*-nitrofenol pada uji aktivitas fosfodiesterase dipakai larutan penyangga 0,1 M tris(hidroksimetil) aminometan (THAM) pH 12, sedangkan pada uji aktivitas fosfomonoesterase dipakai larutan 0,5 M KOH. Alasannya karena substrat fosfodiesterase yaitu bis *p*-nitrofenil fosfat (BPNP) tidak stabil pada larutan NaOH, lama-lama BPNP terhidrolisis dengan adanya NaOH. Fungsi CaCl_2 adalah untuk mengekstraksi *p*-nitrofenol pada pengujian fosfodiesterase, fungsinya sama dengan fungsi $\text{CaCl}_2\text{-NaOH}$ pada pengujian fosfomonoesterase.

Pengujian aktivitas pirofosfat anorganik didasarkan pada pengukuran ortofosfat yang dilepas pada waktu tanah diinkubasi dengan larutan penyangga pirofosfat (pH 8). Pada umumnya ada 3 masalah dalam pengujian, yaitu:

- (i) ortofosfat yang lepas kemungkinan diserap kembali oleh partikel tanah sehingga tidak terekstraksi,
- (ii) ortofosfat mungkin terus terhidrolisis dari substrat (pirofosfat) setelah ekstraksi bukan karena enzim (misalnya karena pH rendah),
- (iii) keberadaan pirofosfat mengganggu pengukuran ortofosfat.

Penggunaan pereaksi 1 N H₂SO₄ untuk mengekstrak ortofosfat mengembalikan jumlah ortofosfat yang ditambahkan ke tanah. Metode kolometri yang digunakan untuk mengukur ortofosfat yang terlarut oleh adanya pirofosfat merupakan hal yang khusus bagi ortofosfat. Pada metode ini pembentukan aneka warna biru oleh reaksi ortofosfat dengan ion-ion molibdat berlangsung cepat karena adanya pereaksi asam askorbat-asam trikloroasetat dan pembentukan senyawa kompleks ion-ion molibdat oleh pereaksi sitrat-arsenit untuk mencegah kelanjutan pembentukan warna biru dari ortofosfat yang berasal dari hidrolisis substrat pirofosfat.

Penetapan kadar air kering mutlak contoh tanah sebelum dianalisis perlu dilakukan. Nilai kadar air ini dipakai sebagai faktor koreksi.

4.4.2 Aktivitas Fosfomonoesterase

4.4.2.1 Fosfomonoesterase (Tabatabai & Bremner, 1969; Eivazi & Tabatabai, 1977)

Alat

- Labu Erlenmeyer berpenutup ukuran 50 ml.
- Inkubator atau penangas air dengan pengatur suhu.
- Spektrofotometer

Bahan

- Toluena, senyawa kimia bersertifikasi Fisher (Fisher Scientific Co., Chicago)
- Larutan stok *modified universal buffer* (MUB).
 - Larutkan 12,1 g tris(hidroksimetil) aminometan (THAM), 11,6 g asam maleat, 14 g asam sitrat, dan 6,3 g asam borat (H₃BO₃) dalam 488 ml 1M NaOH. Encerkan menjadi 1.000 ml dengan akuades. Simpan pereaksi dalam alat pendingin (refrigerator).
- Larutan modified universal buffer (MUB) pH 6,5 dan 11.
 - Masukkan 200 ml MUB dalam gelas beker ukuran 500 ml yang telah diberi magnet pengaduk dan letakkan gelas beker tersebut di atas stirrer bermagnet. Sesuaikan pH MUB menjadi pH 6,5 dengan titrasi 0,1 M HCl dan encerkan menjadi 1.000 ml dengan akuades.
 - Masukkan 200 ml MUB dalam gelas beker ukuran 500 ml yang telah diberi magnet pengaduk dan letakkan gelas beker tersebut di atas stirrer bermagnet. Sesuaikan pH MUB menjadi pH 11 dengan titrasi 0,1 M NaOH dan encerkan menjadi 1.000 ml dengan akuades.

- Larutan *p*-nitrofenil fosfat (PNP) 0,025 M
 - Larutkan 0,42 g dinatrium *p*-nitrofenil fosfat tetrahidrat (Sigma 104, Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) dalam 40 ml MUB pH 6,5 (untuk penetapan fosfatase asam) atau pH 11 (untuk penetapan fosfatase basa) dan encerkan dengan 50 ml MUB yang mempunyai pH yang sama. Simpan pereaksi ini dalam alat pendingin (refrigerator).
- Kalsium klorida (CaCl₂) 0,5 M
 - Larutkan 73,5 g CaCl₂.H₂O dalam 700 ml akuades dan encerkan menjadi 1.000 ml dengan akuades.
- Natrium hidroksida (NaOH) 0,5 M
 - Larutkan 20 g NaOH dalam 700 ml akuades dan encerkan menjadi 1.000 ml dengan akuades.
- Larutan stok standar *p*-nitrofenol
 - Larutkan 1 g *p*-nitrofenol dalam 70 ml akuades dan encerkan menjadi 1.000 ml dengan akuades. Simpan pereaksi dalam alat pendingin (refrigerator).

Prosedur

- Masukkan 1 g contoh tanah (< 2mm) ke dalam labu Erlenmeyer ukuran 50 ml.
- Tambahkan 0,2 ml toluena, 4 ml MUB (pH 6,5 untuk penetapan fosfatase asam dan pH 11 untuk penetapan fosfatase basa), 1 ml larutan *p*-nitrofenil fosfat pada MUB yang sama kemudian kocok selama beberapa detik.
- Tutup rapat labu Erlenmeyer dan inkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam.
- Setelah inkubasi, tambahkan 1 ml 0,5 M CaCl₂ dan 4 ml 0,5 M NaOH, kemudian kocok selama beberapa detik.
- Saring larutan tanah dengan kertas saring Whatman No. 2v dimana filtrat hasil penyaringan berwarna kuning. Ukur intensitas warnanya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 420 nm.
- Di dalam menentukan kadar *p*-nitrofenol, buat grafik kalibrasi dari deret larutan standar *p*-nitrofenol. Encerkan 1 ml larutan standar *p*-nitrofenol menjadi 100 ml dengan akuades dalam gelas ukur 100 ml. Masukkan 0, 1, 2, 3, 4, dan 5 ml aliquot larutan standar *p*-nitrofenol yang sudah diencerkan ke dalam labu Erlenmeyer ukuran 50 ml, tambahkan akuades sehingga menjadi 5 ml. Kemudian tambahkan 1 ml 0,5 M CaCl₂ dan 4 ml 0,5 M NaOH, kocok selama beberapa detik. Saring suspensi yang dihasilkan dengan kertas saring Whatman No.2v. Selanjutnya ukur intensitas warna kuning dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 420 nm.
- Jika ternyata intensitas warna dari filtrat contoh tanah yang diukur melebihi intensitas warna dari larutan standar 50 µg *p*-nitrofenol, maka encerkan filtrat dengan menambahkan akuades sampai intensitas warna pada kisaran warna larutan standar.

- Setiap analisis contoh tanah, buat perlakuan blanko untuk faktor koreksi bagi intensitas warna yang berasal bukan dari pelepasan *p*-nitrofenol akibat aktivitas fosfatase. Masukkan 0,2 ml toluena dalam labu Erlenmeyer ukuran 50 ml. Tambahkan 4 ml MUB (pH 6,5 untuk penetapan fosfatase asam dan pH 11 untuk penetapan fosfatase basa), 1 ml larutan *p*-nitrofenil fosfat pada MUB yang sama kemudian kocok selama beberapa menit. Tutup rapat labu Erlenmeyer dan inkubasi selama 1 jam. Setelah inkubasi, tambahkan 1 ml 0,5 M CaCl₂ dan 4 ml 0,5 M NaOH, 1 ml larutan PNP kemudian kocok selama beberapa menit. Saring larutan tanah dengan kertas saring Whatman no. 2v. Filtrat hasil penyaringan berwarna kuning, ukur intensitas warnanya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 420 nm. Hasil pengukuran merupakan faktor koreksi.

Perhitungan

Aktivitas fosfomonoesterase ($\mu\text{g } p\text{-nitrofenol g}^{-1} \text{ tanah}$) = $\mu\text{g kurva} \times \text{fk} \times \text{fp}$

Keterangan :

$\mu\text{g kurva}$ = kadar *p*-nitrofenol contoh tanah yang didapat dari kurva hubungan antara kadar deret standar dengan pembacaannya setelah dikoreksi dengan blanko.

fk = faktor koreksi kadar air [100% / (100 – kadar air)%], perhitungan kadar air seperti pada sub bab 2.2.

fp = faktor pengenceran

4.4.2.2 Fosfomonoesterase (Alef *et al.*, 1995)

Alat

- Gelas ukur 50 ml
- Inkubator atau penangas air dengan pengatur suhu
- Penggoyang (*shaker*)
- Kertas saring Whatman No. 2v
- Spektrofotometer

Bahan

- Dinatrium fenil
 - Larutkan 27 g dinatrium fenil dalam 1 L akuades.
- Larutan penyangga borat (pH 10)
 - Larutkan 12,404 g asam borat dalam 700 ml akuades dan sesuaikan pH menjadi pH 10 dengan titrasi NaOH. Encerkan menjadi 1.000 ml dengan akuades.

- Larutan penyangga sitrat (pH 7,0)
 - Larutkan 300 g kalium sitrat dalam 700 ml akuades dan sesuaikan pH menjadi pH 7 dengan titrasi HCl. Encerkan menjadi 1.000 ml dengan akuades.
- Larutan penyangga asetat (pH 5,0)
 - Larutkan 136 g natrium asetat (NaCH_3COOH) dalam 700 ml akuades dan sesuaikan pH menjadi pH 5 dengan titrasi asam asetat. Encerkan menjadi 1.000 ml dengan akuades.
- Larutan 2.6-dibromo-quinon-klorimida
 - Larutkan 200 mg 2.6-dibromo-quinon-klorimida dalam 100 ml etanol.
- Toluena
- Larutan standar $10 \mu\text{g fenol ml}^{-1}$.



Gambar 1. Inkubator atau penangas air dengan pengatur suhu.

Prosedur

- Masukkan 10 g contoh tanah lembab ($< 2\text{mm}$) dalam gelas ukur 100 ml.
- Tambahkan 1,5 ml toluena (5 ml untuk tanah gambut), kocok dan biarkan 15 menit.
- Tambahkan 10 ml larutan dinatrium fenil fosfat, 20 ml larutan penyangga (borat untuk fosfatase basa, sitrat untuk fosfatase netral, dan asetat untuk fosfatase asam), tutup, kocok dan inkubasi pada 37°C selama 3 jam.
- Setelah inkubasi, larutkan suspensi tanah dengan akuades panas (38°C) menjadi 100 ml, kocok dan segera saring. Pada perlakuan blanko tambahkan 10 ml akuades tanpa larutan dinatrium fenil fosfat. Kerjakan semua contoh tanah duplo dengan 1 blanko.
- Untuk pengukuran fenol, pipet 5 ml larutan penyangga dan 1-8 filtrat dalam gelas ukur, goyang dan larutkan dengan akuades menjadi 25 ml.

Tambahkan 1 ml larutan 2.6-dibromo-quinon-klorimida dan inkubasi 20-30 menit pada suhu kamar. Encerkan dengan akuades sampai 100 ml. Ukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm.

- Untuk membuat kurva kalibrasi ($0-200 \mu\text{g fenol ml}^{-1}$), gunakan 0–20 ml larutan standar fenol.

Perhitungan

Sebelum dihitung, hasil pengukuran dikoreksi dengan blanko

$$\text{Fenol } (\mu\text{g g}^{-1} \text{ btk h}^{-1}) = \frac{C \times 100}{\text{Bk} \times t \times 10}$$

Keterangan:

- C = fenol terukur.
- Bk = berat tanah kering.
- t = waktu inkubasi.
- 100 = volume suspensi tanah (ml).
- 10 = berat contoh tanah yang dipakai.

4.4.3 Aktivitas Fosfodiesterase (Tabatabai, 1982)

Alat

(Sama dengan 4.4.2)

Bahan

- Toluena, senyawa kimia bersertifikasi Fisher (Fisher Scientific Co., Chicago)
- Larutan stok penyangga tris(hidroksimetil) aminometan (THAM) 0,05 M, pH 8,0
 - Larutkan 6,1 g THAM dalam 800 ml akuades dan sesuaikan pH 8 dengan titrasi 0,2 N H_2SO_4 . Encerkan menjadi 1.000 ml dengan akuades.
- Larutan bis-*p*-nitrofenil fosfat (BPNP) 0,005 M
 - Larutkan 0,1811 g natrium bis-*p*-nitrofenil fosfat dalam 80 ml buffer THAM pH 8 dan encerkan menjadi 100 ml dengan bufer THAM. Simpan pereaksi dalam alat pendingin (refrigerator).
- Kalsium klorida (CaCl_2) 0,5 M
 - Larutkan 73,5 g $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ dalam 700 ml akuades dan encerkan menjadi 1.000 ml dengan akuades.

- Larutan tris (hidroksimetil) aminometan-natrium hidroksida (THAM-NaOH), 0,1 M, pH 12
 - Larutkan 12,2 g THAM dalam 800 ml akuades dan sesuaikan pH menjadi pH 12 dengan titrasi 0,5 N NaOH. Encerkan menjadi 1.000 ml dengan akuades.
- THAM 0,1 M, pH ~ 10
 - Larutkan 12,2 g THAM dalam 800 ml air dan encerkan menjadi 1.000 ml dengan akuades.
- Larutan stok standar *p*-nitrofenol
 - Larutkan 1 g *p*-nitrofenol dalam 70 ml akuades dan encerkan menjadi 1.000 ml dengan akuades. Simpan larutan stok standar dalam alat pendingin (refrigerator).

Prosedur

- Masukkan 1 g contoh tanah (< 2mm) dalam labu Erlenmeyer ukuran 50 ml. Tambahkan 0,2 ml toluena, 4 ml THAM pH 8 dan 1 ml larutan BPNP kemudian kocok selama beberapa detik.
- Tutup rapat labu Erlenmeyer dan inkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam.
- Setelah inkubasi, buka labu Erlenmeyer dan tambahkan 1 ml 0,5 M CaCl₂ dan 4 ml THAM-NaOH, kemudian kocok selama beberapa detik.
- Saring larutan tanah dengan kertas saring Whatman No. 2v. Filtrat hasil penyaringan berwarna kuning, ukur intensitas warnanya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 420 nm.
- Di dalam menentukan kadar *p*-nitrofenol, buat grafik kalibrasi seperti di atas.
- Jika ternyata intensitas warna dari filtrat contoh tanah melebihi intensitas warna dari larutan standar 50 µg *p*-nitrofenol, maka encerkan filtrat dengan menambahkan 0,1 M THAM, pH ~ 10 sampai intensitas warna pada kisaran warna larutan standar.
- Setiap analisis satu contoh tanah, buat perlakuan blanko untuk faktor koreksi bagi intensitas warna yang berasal bukan dari pelepasan *p*-nitrofenol akibat aktivitas fosfatase. Masukkan 0,2 ml toluena dalam labu Erlenmeyer ukuran 50 ml, tambahkan 4 ml THAM pH 8 dan 1 ml larutan BPNP kemudian kocok selama beberapa menit. Tutup rapat labu Erlenmeyer dan inkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam. Setelah inkubasi, buka labu Erlenmeyer, tambahkan 1 ml 0,5 M CaCl₂, 4 ml THAM-NaOH, 1 ml larutan BPNP kemudian kocok selama beberapa menit. Selanjutnya saring larutan tanah dengan kertas saring Whatman No. 2v. Filtrat hasil penyaringan berwarna kuning, ukur intensitas warnanya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 420 nm. Hasil pengukuran merupakan faktor koreksi blanko.

Perhitungan

Aktivitas fosfodiesterase ($\mu\text{g } p\text{-nitrofenol g}^{-1} \text{ tanah}$) = $\mu\text{g kurva} \times \text{fk} \times \text{fp}$

Keterangan:

$\mu\text{g kurva}$ = kadar p -nitrofenol contoh tanah yang didapat dari kurva hubungan antara kadar deret standar dengan pembacaannya setelah dikoreksi dengan blanko.

fk = faktor koreksi kadar air

fp = faktor pengenceran

4.4.4 Fosfotriesterase (Eivazi & Tabatabai, 1977)

Alat

(Sama dengan 4.4.2)

Bahan

- Toluena (sama seperti di atas)
- Larutan stok *modified universal buffer* (MUB) (sama seperti di atas)
- MUB pH 10
 - Titrasi 200 ml larutan stok MUB agar pH menjadi 10 dengan 0,1 M NaOH dan kemudian encerkan menjadi 1.000 ml dengan air suling.
- Natrium Tris- p -nitrofenilfosfat dalam bentuk padat
- Kalsium klorida (CaCl_2) 0,5 M (seperti uraian sebelumnya)
- Natrium hidroksida (NaOH) 0,5 M (seperti uraian sebelumnya)
- Natrium hidroksida (NaOH) 0,1 M.
 - Larutkan 5 g NaOH dalam 700 ml akuades dan encerkan menjadi 1.000 ml dengan akuades.
- Larutan stok standar p -nitrofenol (seperti uraian sebelumnya)

Prosedur

- Masukkan 23 mg natrium Tris- p -nitrofenil fosfat ke dalam labu Erlenmeyer 50 ml, campurkan dengan 1 g contoh tanah (< 2mm) dan tutup dengan 2 g manik-manik kaca ukuran 100 mesh.
- Kemudian tambahkan 0,25 ml toluena dengan cara meneteskannya di atas permukaan manik-manik kaca dan 5 ml MUB pH 10.0.
- Sumbat labu Erlenmeyer, campur dengan cara menggoyang-goyangkan dan inkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C . Setelah itu, tambahkan 1 ml 0,5 M CaCl_2 dan 4 ml 0,5 M NaOH, campur dan saring

larutan tanah dengan kertas saring Whatman No. 2v. Ukur intensitas warna filtrat pada panjang gelombang 400 nm.

- Untuk perlakuan kontrol, tambahkan substrat (23 mg Tris-p-nitrofenilfosfat) setelah penambahan 0,5 M CaCl_2 dan 0,5 M NaOH dan lakukan dengan cepat sebelum penyaringan suspensi tanah.
- Buat kurva kalibrasi (0-200 μg fenol ml^{-1}) dengan menggunakan 0-20 ml larutan standar fenol.

4.4.5 Pirofosfatase Anorganik (Tabatabai, 1982)

Alat

- Tabung sentrifugasi plastik ukuran 50 ml
- Inkubator atau penangas air dengan pengatur suhu
- Shaker
- Sentrifugasi
- Spektrofotometer

Bahan

- NaOH, 1 N
- Larutan stok *modified universal buffer* (MUB) (sama seperti di atas)
- Larutan pirofosfat 50 mM
 - Larutkan 2,23 g natrium pirofosfat dekahidrat ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) dalam 20 ml larutan stok MUB, sesuaikan pH larutan menjadi pH 8 dengan titrasi 0,1 HCl. Encerkan menjadi 100 ml dengan akuades. Pereaksi ini harus selalu dalam keadaan baru.
- MUB pH 8
 - Sesuaikan pH 200 ml MUB menjadi pH 8 dengan titrasi 0,1 N HCl, encerkan menjadi 1.000 ml dengan akuades.
- Asam sulfat (H_2SO_4) 1N
 - Larutkan 250 ml H_2SO_4 pekat dalam 8 L akuades, encerkan menjadi 9 L dengan akuades.
- Pereaksi asam askorbat (0,1 M)-asam trikloroasetat (0,5M) (pereaksi A)
 - Larutkan 8,8 g asam askorbat dan 41 g asam trikloroasetat dalam 400 ml air, encerkan menjadi 500 ml dengan akuades. Pereaksi ini harus selalu dalam keadaan baru.
- Pereaksi ammonium molibdat tetrahidrat [$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$] (0,015M) (pereaksi B)
 - Larutkan 9,3 g ammonium molibdat dalam 450 ml akuades, encerkan menjadi 500 ml dengan akuades.
- Pereaksi natrium sitrat (0,15 M)-natrium arsenit (0,3 M)-asam asetat (7,5%) (pereaksi C):

- Larutkan 44,1 g natrium sitrat dan 39 g natrium arsenit dalam 800 ml akuades, tambahkan asam asetat glasial (99,9%), ditambah akuades sampai keseluruhan menjadi 1.000 ml.
- Larutan stok standar fosfat ($\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$)
 - Larutkan 0,439 g kalium dihidrogen fosfat (KH_2PO_4) dalam 700 ml akuades, encerkan menjadi 1.000 ml dengan akuades. Larutan ini mengandung $100 \mu\text{g PO}_4^{3-}\text{-P ml}^{-1}$.

Prosedur

- Masukkan 1 g contoh tanah (< 2mm) dalam tabung sentrifugasi plastik ukuran 50 ml, tambahkan 3 ml 50 mM larutan pirofosfat, kemudian kocok selama beberapa detik. Tutup rapat tabung sentrifugasi dan inkubasi pada suhu 37°C selama 5 jam. Setelah inkubasi, buka tabung sentrifugasi dan segera tambahkan 3 ml MUB pH 8 dan 25 ml 1 N H_2SO_4 . Tutup tabung sentrifugasi, letakkan pada shaker, goyang secara horizontal selama 3 menit. Kemudian sentrifugasi selama 30 menit pada 12.000 rpm, segera perlakukan aliquot supernatan untuk analisis $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$.
- Analisis larutan Pi yang dilepas oleh aktivitas pirofosfatase anorganik: ambil 1 ml aliquot cairan supernatant dengan pipet dan masukkan ke dalam gelas ukur 25 ml yang telah diisi 10 ml pereaksi A, segera tambahkan 2 ml pereaksi B dan 5 ml pereaksi C, dan tambah air sampai 25 ml dan kocok selama 15 menit. Ukur intensitas warna biru dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 700 nm.
- Di dalam menentukan kadar $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$, buat grafik kalibrasi dari deret larutan standar yang terdiri atas 0, 5, 10, 15, 20, dan 25 $\mu\text{g PO}_4^{3-}\text{-P}$. Pipet dan masukkan sebanyak 0, 5, 10, 15, 20, dan 25 ml aliquot dari larutan stok $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ dalam gelas ukur 100 ml, encerkan menjadi 100 ml dengan akuades. Selanjutnya Ukur intensitas warna biru dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 700 nm.
- Jika ternyata intensitas warna dari cairan contoh tanah melebihi intensitas warna dari larutan standar $50 \mu\text{g PO}_4^{3-}\text{-P}$, maka encerkan dengan menambahkan akuades sampai intensitas warna pada kisaran warna larutan standar.
- Setiap analisis satu contoh tanah, buat perlakuan blanko untuk faktor koreksi bagi intensitas warna yang berasal bukan dari pelepasan $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ (dari pirofosfat) oleh aktivitas pirofosfatase. Masukkan 3 ml MUB ke tabung sentrifugasi plastik ukuran 50 ml, pH 8, inkubasi selama 5 jam. Setelah inkubasi, tambahkan 3 ml 50 mM pirofosfat, dan segera tambahkan 25 ml 1 N H_2SO_4 , lalu tutup tabung sentrifugasi dan letakkan pada shaker, goyang selama 3 menit. Kemudian sentrifugasi selama 30 menit pada 12.000 rpm. Segera perlakukan aliquot supernatan untuk analisis $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$. Ambil 1 ml aliquot cairan supernatant dengan pipet dan masukkan dalam gelas ukur 25 ml yang telah diisi 10 ml pereaksi A, segera tambahkan 2 ml pereaksi B dan 5 ml pereaksi C, tambahkan air sampai 25 ml dan kocok selama 15 menit. Ukur intensitas warna biru

dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 700 nm. Hasil pengukuran merupakan faktor koreksi blanko.

Perhitungan

$$\text{Aktivitas pirofosfatase } (\mu\text{g PO}_4^{3-}\text{-P g}^{-1} \text{ tanah}) = \mu\text{g kurva} \times \text{fk} \times \text{fp}$$

Keterangan :

$\mu\text{g kurva}$ = kadar $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ contoh tanah yang didapat dari kurva hubungan antara kadar deret standar dengan pembacaannya setelah dikoreksi dengan blanko.

fk = faktor koreksi kadar air

fp = faktor pengenceran

4.4.6 Ulasan

Hasil pengukuran enzim fosfatase dapat digunakan sebagai:

39) Indikator kesuburan tanah.

Kesuburan tanah berhubungan dengan gabungan sifat tanah termasuk sifat biotik dan abiotik. Hasil penelitian fosfatase seperti dilaporkan Tate III (1995) menunjukkan bahwa aktivitas fosfatase berkorelasi positif dengan hasil gandum tetapi berkorelasi negatif dengan hasil bit-gula.

40) Indikator tak langsung biomassa mikroba.

Beberapa publikasi menunjukkan bahwa terdapat hubungan antara tingkat aktivitas enzim tertentu dengan total biomassa mikroba atau respirasi tanah. Beberapa enzim antara lain aktivitas enzim alkali fosfatase berkorelasi dengan respirasi dan biomassa mikroba pada tanah yang ditambah gula tetapi tidak berkorelasi dengan tanah yang tidak ditambah gula.

41) Indikator keberlangsungan siklus biogeokimia.

Enzim fosfatase dipakai untuk perkiraan kemampuan mengkatalisis siklus P dalam tanah.

42) Indikator pengaruh negatif polutan.

Pada umumnya stabilitas ekosistem berhubungan dengan kesehatan komunitas mikroba. Adanya gangguan dari aktivitas mikroba tanah sebagai tanda adanya perubahan tingkat metabolisme enzim. Hal ini dapat dipakai untuk perkiraan gangguan ekosistem. Keadaan ini terlihat jelas pada tanah yang terpolusi logam berat, logam akan menyatu dengan enzim yang bebas melalui penyatuan dengan grup sulfidral sehingga mengakibatkan perubahan struktur protein dan mengurangi atau merusak fungsi enzim.

43) Prakiraan potensi keberhasilan tindakan bioremediasi.

Sebagai komunitas biologis yang telah hidup (pulih) kembali dari kerusakan tanah, berhubungan dengan peningkatan aktivitas enzim. Demikian pula pada senyawa kimia organik tanah yang terkontaminasi, peningkatan aktivitas enzim dalam proses mineralisasi polutan menunjukkan adanya kemampuan populasi alami dalam tanah mengalami perbaikan kembali ke kondisi seperti semula.

DAFTAR PUSTAKA

- Alef, R.M., P. Nannipieri, & C. Trazar-Copeda. 1995. Phosphatase activity. p. 335-344. *In* K. Alef & P. Nannipieri (Eds.) *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press. Harcourt Brace & Co. Pub. London.
- Atlas, R.M. & R. Bartha. 1981. *Microbial ecology. Fundamentals and Applications*. Addison-Wesley Pub. Company. London, Amsterdam, Don Mills, Ontario, Sydney.
- Eivazi, F. & M.A. Tabatabai. 1977. Phosphatases in soils. *Soil Biol. Biochem* 9:167:172.
- Horikoshi, K. 1991. *Microorganisms in Alkaline Environments*. Kodansha, Tokyo.
- Lynch, M.J. 1983. *Soil Biotechnology Microbiological Factors in Crop Productivity*. Blackwell Scientific Pub. Oxford, London, Edinburgh, Boston, Melbourne.
- Mullen, D.M. 1998. Transformation of Other Elements. pp: 369-386. *In* D.M. Silvia, J.J. Fuhrmann, P.G. Hartel, & D.A. Zuberer (Eds.) *Principles and Applications of Soil Microbiology*. Prentice Hall New Jersey.
- Richards, N.B. 1978. *Introduction to the Soil Ecosystem*. Longman. London and New York.
- Tabatabai, M.A. 1982. Soil enzymes. p. 903-947. *In* A.L. Page, R.H. Miller & D.R. Keeney (Eds.) *Method of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties*. 2nd ed. Am. Soc. of Agronomy Inc., Soil Sci. Soc. of Am. Madison, Wisconsin USA.
- Tabatabai, M.A. & J.M. Bremner. 1969. Use of *p*-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biol Biochem* 1: 301-307.
- Tate III, R.L. 1995. *Soil Microbiology*. John Wiley & Sons, Inc. New York-Chichester-Brisbane-Toronto-Singapore.

PROTEASE

Erny Yuniarti

Protease merupakan enzim penting dalam siklus N di lahan basah yang berfungsi dalam transformasi organik nitrogen (protein) di dalam tanah dan limbah bahan organik lainnya menjadi N inorganik (NH_4^+), yang kemudian digunakan oleh tanaman (Kumar *et al.*, 2003). Tahap enzimatik pertama dalam degradasi protein terjadi di luar sel-sel mikroba, karena berat molekul protein yang tinggi. Degradasi protein oleh protease ekstraselular menghasilkan oligopeptida, yang selanjutnya menghasilkan asam amino yang diasimilasi oleh mikroorganisme. Asam amino ditransfer ke dalam sel dengan sistem transfer spesifik dan mengalami deaminasi dengan melepaskan amonium.

Hampir semua mikroba di dalam tanah mampu mendegradasi protein. Berbagai jenis bakteri seperti *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Proteus* serta *Serratia* serta fungi *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* dan *Mucor* mampu menghasilkan protease. Karakterisasi protease umumnya dilakukan terhadap enzim murni yang diisolasi dari mikroba untuk kepentingan industri dan studi mekanisme patogenitas mikroba terhadap tanaman, hewan, dan manusia atau antipatogen terhadap penyakit tanaman. Menurut Ward (1983) terdapat sepuluh kelas enzim protease yang penggolongannya didasarkan atas situs kerja enzim pada molekul protein. Protease di dalam tanah merupakan campuran heterogen enzim ekstraselular dengan spesifitas substrat berbeda.

Di dalam tanah, protease terdapat dalam sel-sel hidup dan aktif, dalam sel-sel mati, sebagai enzim bebas, teradsorpsi pada partikel-partikel organik, inorganik atau mineral organik. Aktivitas protease pada tanah yang optimum pada pH 8 dan temperatur sekitar 55°C . Tanah dengan kandungan liat tinggi dilaporkan memiliki aktivitas protease lebih tinggi dibandingkan dengan tanah yang tidak mengandung liat. Mineral liat dan asam humat melindungi stabilitas aktivitas protease di dalam tanah (Bonmati *et al.*, 1991). Korelasi nyata antara aktivitas protease dengan liat kemungkinan disebabkan adanya kofaktor bagi aktivitas protease seperti ion logam divalen yang merupakan bagian dari protease ekstraselular. Logam Zn^{2+} dan Ca^{2+} diperlukan untuk fungsi dan stabilitas protease (Law, 1980). Protease teradsorpsi pada muatan negatif mineral liat melalui pertukaran kation.

Aktivitas protease dalam menghidrolisis protein menjadi asam amino dan dalam aktivitasnya membutuhkan air. Tanah-tanah yang kering udara

atau yang disimpan pada suhu -8 atau 22° C secara nyata menurunkan aktivitas protease. Di lapangan, aktivitas protease beragam sesuai dengan musim namun tidak berkorelasi dengan perubahan populasi mikroba. Korelasi nyata sering ditemukan pada kondisi laboratorium antara aktivitas protease dengan amonifikasi arginin, respirasi yang diinduksi substrat, output panas, mineralisasi nitrogen, dan ATP (Alef & Nannipieri, 1995). Aktivitas protease menurun seiring peningkatan kedalaman tanah (menurunnya kualitas substrat, populasi mikroba, konsentrasi O₂) dan meningkat setelah perlakuan tanah dengan bahan organik seperti jerami. Aktivitas protease di dalam tanah sebesar 530 µg tyrosine g⁻¹ 2 jam⁻¹ dan di dalam serasah jagung sebesar 75200 µg tyrosine g⁻¹ 2 jam⁻¹. Transpor (aliran dan difusi massa) senyawa organik terlarut menyediakan energi untuk mikroorganisme tanah sehingga aktivitas enzim lebih tinggi di sekitar permukaan serasah (Kandelera *et al.*, 1999).

Protease yang dilepaskan oleh sel-sel mikroba, secara fisik dijerap oleh koloid tanah atau terikat secara kovalen dengan bahan organik tanah. Enzim yang terimobilisasi oleh koloid tanah atau bahan organik ini menunjukkan tingkat resistensi yang tinggi terhadap aktivitas proteolitik. Protease dapat diekstrak dari tanah dan aktivitasnya diestimasi dalam ekstrak kasar.

Metode pengukuran aktivitas protease yang dijelaskan di sini mengikuti metode Alef & Nannipieri (1995) dan Kandeler (1995).

4.5.1 Prinsip

Dengan menggunakan kasein sebagai substrat, sampel tanah diinkubasi selama 2 jam pada suhu 50°C dan pH 8,1. Asam amino yang dibebaskan selama periode inkubasi, diekstrak dan substrat yang tersisa mengendap setelah penambahan asam trikloroasetat. Asam-asam amino aromatik bereaksi dengan reagen *fenol folin-ciocalteu* dalam larutan alkalin membentuk kompleks warna biru yang dapat dideterminasi secara kolorimetri. Semakin tinggi absorbansi yang terukur semakin tinggi aktivitas protease yang terdapat dalam contoh.

4.7.2 Pengukuran Aktivitas Protease

Alat

- Spektrofotometer
- Penangas dengan mesin pengocok (*shaking water bath*) dan pengatur suhu
- Labu ukur 100 ml dan 1.000 ml

- Sentrifus dan tabung sentrifus (25 ml)
- Kertas saring
- Tabung reaksi bertutup ulir

Bahan

- Bufer tris (0,05 M, pH 8.1)
 - Larutkan 6,06 g *tris(hydroxymethyl)aminomethane* dalam 800 ml akuades. Sesuaikan pH menjadi 8,1 dengan HCl 1M, kemudian encerkan volume menjadi 1.000 ml dengan akuades dalam labu takar. Simpan larutan pada suhu 4°C.
- Substrat natrium kaseinat (2% w/v)
 - Suspensikan 10 g natrium kaseinat dengan akuades hangat (50°C), lalu buat volumenya menjadi 500 ml (gunakan stirrer). Jika hanya tersedia kasein, larutkan 10 g dalam bufer Tris, sesuaikan pH nya menjadi 8,1 dengan larutan NaOH, lalu jadikan volumenya menjadi 500 ml dengan bufer Tris (50 mM, pH 8,1).
- Larutan asam trikloroasetat (TCA) 0,92 M
 - Larutkan 30 g CCl_3COOH (TCA) dengan akuades dalam labu ukur 200 ml dan cukupkan volumenya dengan akuades menjadi 200 ml.
- Reagen A
 - larutkan 50 g Na_2CO_3 (bebas H_2O) dengan akuades, cukupkan volume larutan sampai 1.000 ml dengan akuades. Simpan pada suhu 4°C dan tidak lebih dari 3 minggu.
- Reagen B
 - Larutkan 5 g *copper(II) sulfate pentahydrat* ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) dengan akuades, lalu cukupkan volume larutan dengan akuades sampai 1.000 ml. Simpan larutan pada 4°C sampai 3 minggu.
- Reagen C
 - Larutkan 10 g natrium potasium tartarat ($\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) dengan akuades, cukupkan volumenya dengan akuades menjadi 1.000 ml. Simpan pada suhu 4°C tidak lebih dari beberapa hari.
- Reagen alkalin
 - Campur 1.000 ml reagen A dengan 20 ml reagen B dan 20 ml reagen C. Siapkan larutan kerja ini setiap akan melakukan analisis.
- Reagen *fenol folin-ciocalteu* (33%)
 - Encerkan 167 ml reagen *fenol folin-ciocalteu* dengan akuades sampai 500 ml. Siapkan larutan ini tiap akan melakukan analisis.
- Larutan standar tirosin (500 ppm)
 - Encerkan 50 mg tirosin dengan bufer Tris. Jika perlu, hangatkan agar larut sempurna. Cukupkan volume larutan tirosin bufer Tris sampai 100 ml. Simpan pada suhu 4°C tidak lebih dari beberapa hari.

Prosedur

- Masukkan 1 g tanah lembap (2 mm) ke dalam tabung sentrifus, lalu tambahkan 5 ml bufer tris dan 5 ml natrium kaseinat.
- Tutup tabung sentrifus, vortek, lalu inkubasi selama 2 jam pada suhu 50°C dalam penangas.
- Setelah inkubasi, tambahkan larutan TCA, lalu aduk dengan vortek. Untuk tabung kontrol, tambahkan 5 ml larutan natrium kaseinat segera sebelum penambahan larutan TCA. Sentrifus suspensi tanah 10.000-12.000 rev min⁻¹, selama 10 menit.
- Pipet 5 ml supernatan ke dalam tabung reaksi, campurkan dengan 7,5 ml reagen alkalin, lalu inkubasi selama 15 menit pada suhu ruang.
- Tambahkan 5 ml reagen folin, filter campuran reaksi dengan kertas saring ke dalam tabung atau sentrifus pada kecepatan 7000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C.
- Ukur absorbansi supernatan tepat setelah 1 jam pada panjang gelombang 700 nm.

Kurva kalibrasi

- Pipet 0 (blanko), 1, 2, 3, 4, 5 ml larutan tirosin ke dalam 6 tabung reaksi, lalu tambahkan 5 ml natrium kaseinat.
- Cukupkan volume campuran menjadi 10 ml dengan menambah bufer Tris, kemudian tambahkan 5 ml larutan substrat dan 5 ml TCA. Selanjutnya perlakukan campuran reaksi untuk pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 700 nm.

Kalkulasi

$$\text{Aktivitas protease } (\mu\text{g tirosin g}^{-1} \text{ (bk) } 2 \text{ jam}^{-1}) = (C \times 15) / \text{bk}$$

bk = berat kering 1 g contoh tanah lembap

15 = volume akhir larutan yang ditambahkan dalam pengukuran

C = konsentrasi tirosin yang terukur ($\mu\text{g ml}^{-1}$ supernatan)

4.7.3 Ulasan

Beberapa catatan berikut penting untuk diperhatikan dalam analisis protease, yaitu:

- Komplek warna stabil selama waktu yang relatif pendek (90 menit). Oleh karena itu, ikuti dengan tepat interval waktu yang ditentukan tersebut. Setelah penambahan reagen *folin-ciocalteu* biarkan tabung reaksi selama 90 menit, lalu ukur absorbansi.
- Filtrat bisa disimpan paling cepat 5 jam pada suhu 4°C.

- Jika konsentrasi tirosin pada contoh melebihi konsentrasi tertinggi standar kalibrasi, encerkan contoh dengan bufer tris atau waktu inkubasi menjadi 1 jam.
- Metode analisis aktivitas protease seperti diuraikan di atas didasarkan atas determinasi derivat tirosin larut TCA dengan reagen *follin*. *Follin* yang diencerkan bersifat tidak stabil dan sebaiknya disiapkan segera sebelum digunakan.
- Sebaiknya pengukuran aktivitas protease dilakukan pada pH dan suhu berbeda untuk mendapatkan kondisi optimum untuk tanah yang dianalisis.
- Pada penyiapan kontrol, kasein sebaiknya ditambahkan segera sebelum penambahan TCA pada akhir waktu inkubasi karena presipitasi akan berlangsung tidak sempurna jika substrat ditambahkan setelah larutan asam.
- Kurva kalibrasi sebaiknya dibuat setiap kali pengukuran protease.
- Fumigasi kloroform tidak mempengaruhi aktivitas hidrolisis kasein pada tanah yang berbeda.

Daftar Pustaka

- Alef, K. & P. Nannipieri. 1995. Protease activity. p.313-315. *In* K. Alef & P. Nannipieri (Eds.) *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press. London.
- Bonmati, M., B. Ceccanti, & P. Nannipieri. 1991. Spatial variability of phosphatase, urease, protease, organic carbon and total nitrogen in soil. *Soil Biol. Biochem.* 23: 391-396.
- Kandeler, E. 1995. Protease activity. p.165-168. *In* F. Schinner, E. Kandeler, R. Ohlinger, & R. Margesin (Eds.). *Methods in Soil Biology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Kandeler, E., J. Luxhüb, D. Tscherkoc, & J. Magidb. 1999. Xylanase, invertase and protease at the soil litter interface of loamy sand. *Soil Biol. Biochem.* 31:1171-1179.
- Kumar, K., C.J. Rosen, & M.P. Russelle. 2003. A novel approach to regulate soil nitrogen mineralization. Annual Meeting Abstracts. *CD-ROM*. Paper No. S03-kumar285158.
- Law. 1980. Soil quality indicator. p. 3-11. <http://webdoc.sub.gwdg.de/diss/1997/wick/state.pdf>. [17 Nopember 2007].
- Ward, O.P. 1983. Properties of microbial proteinase. p 251 *In* W. Fogarty W.M. (Ed.) *Microbial Enzymes and Biothechnology*. Applied Science Publishing, London.

5

FAUNA TANAH

Bab ini menguraikan teknik pengambilan contoh tanah untuk koleksi dan identifikasi fauna, analisis keragaman, dan kelimpahan populasi. Uraian lebih rinci difokuskan pada analisis kelimpahan populasi cacing tanah, nematoda, dan beberapa arthropoda yang banyak berperan dalam siklus hara dan aliran energi di dalam tanah.

Teknik pengambilan contoh tanah untuk analisis fauna di permukaan dibedakan dengan fauna yang terdapat di dalam tanah (bawah permukaan) karena ada perbedaan dinamika fauna tanah yang terkait dengan jenis perlakuan atau variasi penggunaan tanah. Analisis kelimpahan populasi dan keragaman fauna tanah mencakup identifikasi terhadap mikro, meso, dan makrofauna tanah serta interpretasi hasil untuk menilai tingkat keragaman fauna tanah dengan keberlanjutan produktivitas tanah.

Prosedur analisis untuk cacing tanah yang disajikan dalam bab ini diuraikan secara lengkap yang mencakup teknik koleksi, perhitungan kelimpahan populasi, dan identifikasi cacing tanah menggunakan kunci panduan sederhana. Sedangkan untuk nematoda, analisis mencakup teknik ekstraksi (dari tanah maupun jaringan tanaman) dan teknik enumerasi menggunakan mikroskop.

Analisis kelimpahan arthropoda difokuskan pada Collembola dan Acarina yang mempunyai distribusi luas; dapat hidup di daratan yang bertemperatur– 60° sampai > 40° C. Analisis mencakup prosedur ekstraksi dengan teknik pengapungan dan penggunaan saringan, cara perhitungan kelimpahan populasi, dan prosedur untuk membedakan ordo Collembola dengan Acarina disertai ilustrasi fauna yang dijumpai di Indonesia.

PENGAMBILAN CONTOH UNTUK PENELITIAN FAUNA TANAH

Ea Kosman Anwar

Tanah kaya akan berbagai jenis fauna tanah dengan berbagai ukuran dan bentuk kehidupan. Komponen biotik di dalam tanah memberi sumbangan terhadap proses aliran energi dari ekosistem tanah. Kelompok biotik ini melakukan penguraian sisa-sisa tumbuhan dan hewan yang telah mati (dekomposisi). Adanya perbedaan keadaan lingkungan biotop (satuan geografi terkecil habitat yang dicirikan oleh biotanya) mengakibatkan perbedaan struktur maupun sifat fauna tanah dari biotop tersebut. Fauna tanah merupakan salah satu komponen dalam ekosistem tanah, berperan dalam memperbaiki struktur tanah melalui penurunan berat jenis (bulk density), peningkatan ruang pori, aerasi, drainase, kapasitas penyimpanan air, dekomposisi sisa organik, pencampuran partikel tanah dan penyebaran mikroba (Anwar *et al.*, 2006; Hanafiah *et al.*, 2003). Fauna tanah dapat dibedakan atas makrofauna (contoh: cacing tanah), mesofauna (contoh: nematoda) dan mikrofauna (contoh: protozoa)

Kelompok fauna tanah paling penting adalah protozoa, nematoda, annelida, dan arthropoda. Dalam hubungan timbal balik dengan mikroba, peranan utama fauna tanah adalah mengoyak, memasukkan, dan melakukan pertukaran secara kimia hasil proses dekomposisi serasah tanaman. Klasifikasi menurut cara hidup fauna tanah didasarkan pada morfologi dan fisiologi tergantung pada kedalaman tanah. Fauna fitotrofik memakan tanaman hidup, fauna zootrofik memakan materi binatang, fauna mikrotrofik hidup dalam mikroorganisme, dan fauna saprofitik menggunakan materi organik yang telah mati. Melalui proses mineralisasi materi yang telah mati akan menghasilkan garam-garam mineral yang akan digunakan oleh tumbuh-tumbuhan (Thomas & Mitchell, 1951). Secara umum fauna tanah dapat dipandang sebagai pengatur terjadinya proses dalam tanah. Dengan perkataan lain fauna tanah berperan dalam menentukan kesuburan tanah bahkan beberapa jenis fauna tanah dapat digunakan sebagai indikator tingkat kesehatan tanah di suatu daerah pertanian (Adianto, 1983).

5.1.1 Prinsip

Pengambilan contoh fauna tanah dimulai dengan pengambilan contoh tanah di lapangan. Pada prinsipnya pengambilan contoh tanah adalah mengambil tanah dengan suatu alat pada luas areal dan kedalaman tertentu. Pengambilan contoh tanah dapat dilakukan dengan metode kuadrat (persegi) atau dengan bor tanah. Pengambilan contoh tanah dengan metode kuadrat dilakukan dengan cara membuat kuadrat di atas tanah dengan luas tertentu, misal dengan ukuran 25 cm x 25 cm atau 50 cm x 50 cm, sesuai dengan jenis fauna tanah yang akan dikoleksi, kemudian tanah tersebut digali dengan sekop sesuai kedalaman yang diperlukan. Pengambilan contoh tanah dengan bor tanah prinsipnya sama hanya pengambilan contoh tanah dengan bor tanah ukuran luas contoh tanah telah disesuaikan dengan diameter bor yang digunakan. Kedalaman contoh yang diambil sangat tergantung pada hewan yang akan diteliti (Suin, 2003).

Untuk makrofauna yang hidup dalam tanah dan dalam serasah di permukaan tanah umumnya menggunakan metode standar dari *Tropical Soil Biology and Fertility Program (TSBF)*, *Hand Book Method* (Anderson & Ingram, 1993), dengan metode pengambilan contoh tanahnya menggunakan metode kuadrat (persegi), dengan langkah-langkah sebagai berikut:

- Penetapan titik-titik pengambilan contoh
- Pengambilan contoh tanah
- Pemisahan fauna tanah dan pengelompokannya (koleksi)

5.1.2 Penetapan Titik Pengambilan Contoh

Pengambil contoh untuk penelitian fauna tanah perlu menetapkan lebih dahulu titik-titik pengambilan contoh yang dikehendaki. Banyak pilihan metode penarikan contoh yang bisa digunakan, namun hanya beberapa yang relatif sering digunakan (Hidayat & Makarim, 1992), yaitu:

1. Metode transek atau diagonal dimana titik-titik pengambilan contoh pada suatu areal ditetapkan secara garis lurus dengan jarak antara titik-titik telah ditetapkan pula. Digunakan pada areal pengamatan yang relatif luas dan mempunyai agroekosistem relatif homogen.
2. Metode *stratified* yaitu areal pengamatan dibagi dalam strata-strata. Tiap strata ditetapkan jumlah titik pengambilan contoh yang akan diamati. Metode ini digunakan apabila bidang pengamatan dianggap heterogen, sehingga perlu pembagian strata-strata dengan pertimbangan setiap strata mewakili kondisi agroekosistem masing-masing.
3. Metode acak penuh yaitu titik pengambilan contoh ditetapkan secara acak hanya berdasarkan pertimbangan aksesibilitas,

kemudahan pengamatan pada areal yang relatif homogen, dengan tidak mengabaikan kaidah kaidah penelitian.

4. Metode zigzag yaitu menempatkan titik-titik pengambilan contoh tanah secara zigzag pada kondisi areal pengamatan sesuai keadaan lapangan.

5.1.3 Pengambilan Contoh Tanah

Alat

- Meteran kayu ukuran 1 m, meteran gulung ukuran 50 m terbuat dari logam atau fiber glas, meteran siku dari kayu atau logam.
- Ajir dari bambu/kayu ukuran 1 m
- Sekop
- Bor
- Kantung kain (dari katun)
- Pitfal (perangkap)
- Mikroskop
- Berlese-Tullgren
- Bohlam 15 watt
- Termometer
- Higrometer

Bahan

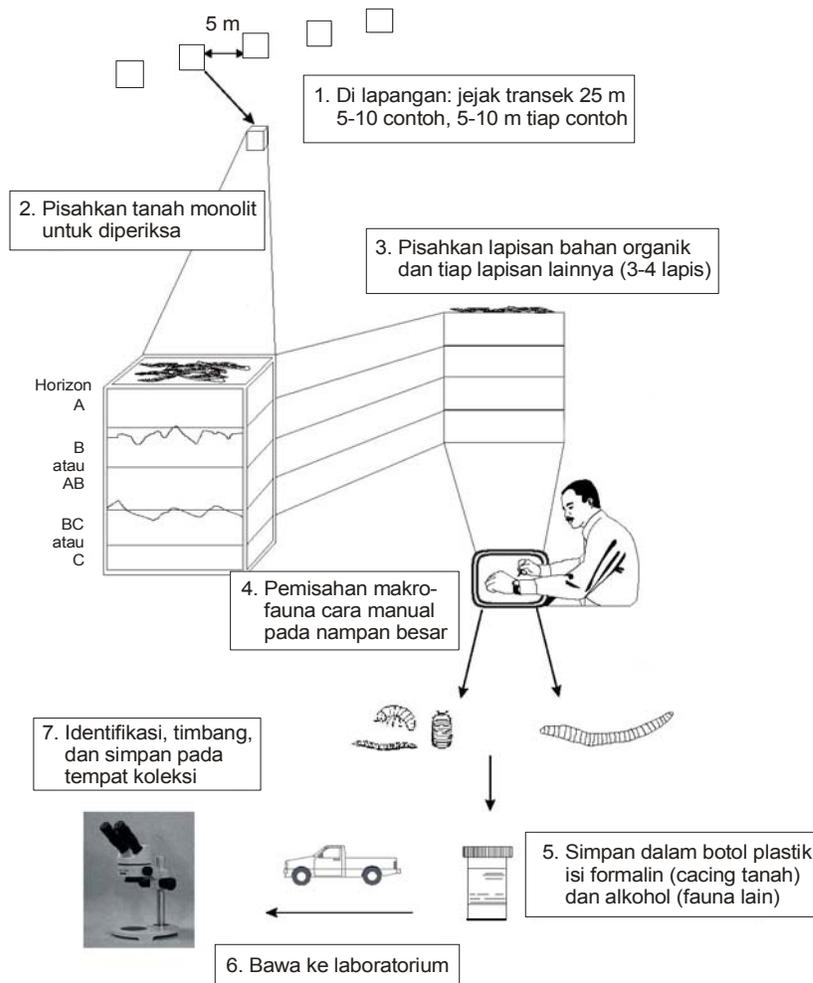
- formalin 4%
- alkohol 70%.
- Deterjen

5.1.3.1 Pengambilan Contoh Tanah Monolit (Metode TBSF, Anderson & Ingram, 1993)

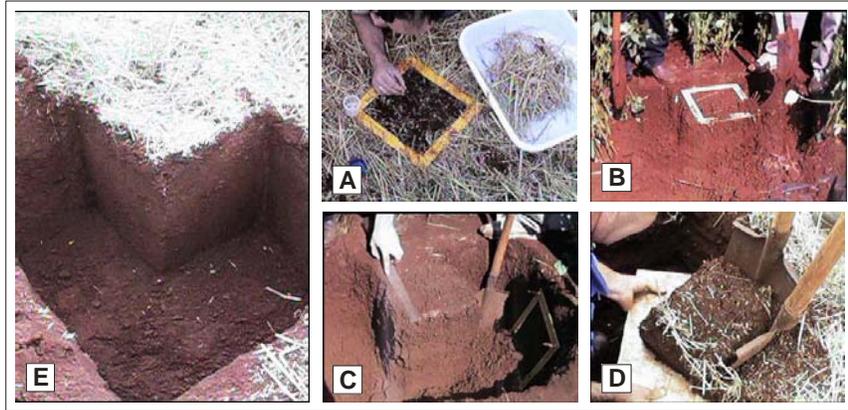
Prosedur

- Tahapan pengambilan contoh tanah cara 'monolit' pada tiap titik pengambilan contoh sepanjang garis penarikan contoh (Gambar 1).
- Tentukan dan tandai dengan ajir 5-10 titik pengambilan contoh untuk 'monolit', sesuai jarak antara ajir 5-10 m sepanjang garis penarikan contoh (5.1.2). Lebih banyak jumlah monolit lebih bagus untuk analisis data statistik, minimum 5 monolit dan 8 monolit cukup memadai. Penandaan dengan ajir jangan sampai mengganggu kehadiran fauna tanah.

- Pada tiap titik pengambilan contoh, sekitar luasan 25 cm x 25 cm bersihkan dari sampah dengan tangan. Ikuti dengan menetapkan secara pasti posisi monolit dengan menggunakan "penggaris persegi" kayu atau logam dengan luas 25 cm x 25 cm pada dimensi luar (Gambar 2A).



Gambar 1. Diagram alur pengambilan contoh tanah dan fauna tanah (Sumber: Anderson & Ingram, 1993)



Gambar 2. Tahapan pengambilan contoh tanah monolit: (A) tetapkan posisi blok monolit dengan penggaris persegi 25 cm x 25 cm; (B, C dan E) gali parit sedalam 30 cm pada 2 sisi blok monolit; dan (D) ambil tiap lapisan blok monolit (0-10 cm, 10-20 cm, dan 20-30 cm) (Sumber: Anderson & Ingram, 1993)

- Isolasi monolit dengan memotong ke bawah menggunakan sekop beberapa cm di luar "penggaris persegi" dan gali pada lebar 20 cm dan kedalaman parit 30 cm mengelilinginya (Gambar 2B dan 2C).
- Pada sisi lain blok monolit arah vertikal cungkil dengan sekop, dan arah horisontal potong dengan parang sehingga diperoleh blok-blok monolit dengan kedalaman 0-10 cm, 10-20 cm, 20-30 cm apabila diperlukan 30 - 40 cm (Gambar 2D).
- Tanah hasil galian pada parit sekitar blok monolit, wadahi pada kantong kain, kemudian lakukan sortasi dengan tangan atau dengan metode lain setelah sortasi pada blok monolit selesai, kumpulkan semua invertebrata yang mempunyai panjang tubuh lebih dari 10 cm, seperti kaki seribu, dan cacing-cacing tanah. Walau kepadatan populasinya rendah namun dianggap mewakili biomassa yang penting. Konversi kelimpahan kepada volume 0,42m³ contoh, yaitu lebar blok ditambah dua lebar parit persegi dikalikan kedalaman 30 cm (Gambar 2E).
- Lakukan sortasi dengan tangan secara terpisah pada masing-masing lapisan blok monolit. Jika waktu yang tersedia terbatas atau cahaya kurang (sorting pada kanopi hutan yang rapat biasanya susah dilakukan setelah lewat jam 3.30), masukkan tanah ke dalam tas kain untuk selanjutnya dibawa ke laboratorium untuk sortasi. Pisahkan semut-semut dengan hati-hati menggunakan kuas kecil pada sekepal (sejumlah kecil) tanah lalu diayak pada ayakan 5 mm di atas nampan; ayakan akan menahan semut. Hindarkan tas kain tempat tanah dari cahaya matahari langsung dan lakukan sortasi dalam waktu maksimum 24 jam dari pengambilan contoh, lebih cepat lebih bagus.

- Catat jumlah dan berat utuh (basah) semua binatang dan identifikasi termasuk taksonomi dan indikasi level (derajat) fungsional (berat, volume, jumlah). Catat kehadiran dan berat termit "jamur sisir" (jika ada).
- Jika timbangan tidak tersedia di lapangan, perkirakan berat basah untuk menjaga spesimen dari kehilangan data, kemudian timbang di laboratorium setelah sedikit kering (mengalami penurunan kadar air).
- Buat daftar spesies, jika mungkin golong-golongkan sampai subfamili atau famili. Dengan masing-masing gunakan nama genus dengan urutan alfabetik. Gabungkan dengan hasil dari perangkap "pitfall" dan monolit untuk kompilasi dalam tabel ini.

5.1.3.2 Pengambilan Contoh Tanah Metode Neuman

Prosedur

- Tahapan pengambilan contoh tanah metode Neuman (Suin, 2003) hampir sama dengan cara 'monolit' yaitu pada tiap pengambilan contoh sepanjang garis penarikan contoh.
- Tentukan dan tandai dengan ajir. 5-10 titik pengambilan contoh sesuai dengan jarak 8 m sepanjang garis penarikan contoh(5.1.2). Lebih banyak lebih bagus untuk analisis data statistik. Penandaan dengan ajir jangan sampai mengganggu kehadiran fauna tanah.
- Gunakan bor tanah dengan diameter 4 cm (Gambar 3) untuk pengambilan contoh tanah pada kedalaman 0-5 cm, 5-10 cm, 10-15 cm dan 15-20 cm.
- Masukkan contoh tanah kedalam kantung kain, beri label dan segera bawa ke laboratorium
- Letakkan contoh tanah dengan volume 50 cm³ pada alat Berlese-Tullgren, gunakan penyinaran lampu 15 W untuk memisahkan hewan tanah dari tanahnya, sebagai larutan pembunuh dipakai larutan alkohol 70%. Setelah contoh tanah dimasukkan ke dalam Berlese-Tullgren, dan lampu dinyalakan selama empat hari, fauna yang telah tertampung pada botol penampung kemudian dipisah-pisahkan menggunakan mikroskop lalu dihitung.



Gambar 3. Barlese Tullgren (kiri), bor tanah (kanan)

5.1.4 Pengambilan Contoh Fauna di Permukaan Tanah

Untuk membandingkan populasi fauna tanah antar plot sebagai akibat perlakuan, maupun untuk mengetahui dinamika populasi fauna permukaan tanah misalnya di hutan alami digunakan perangkap "Barber" atau disebut juga "pitfall" (Anderson & Ingram, 1993). Perangkap "Barber" yaitu suatu bejana bergaris tengah 8 cm, tinggi 10 cm atau botol gelas dengan lebar mulut 10-15 cm.

Prosedur

- Tanam pitfall di permukaan tanah pada setiap plot atau pada sekitar titik-titik monolit atau pada sekitar interval 4m sepanjang garis penarikan contoh. Permukaan bejana harus rata dengan permukaan tanah.
- Di atas bejana tersebut, beri atap dari seng dengan ukuran 20 cm x 20 cm, atau sebuah tutup seperti petridisk, kayu, atau plastik, kuatkan dengan ranting di atasnya, jaga agar tidak terbawa hanyut air hujan.
- Hindarkan air hujan masuk ke dalam bejana maupun sinar matahari dan kotoran yang mungkin terjatuh ke dalam bejana. Atap dipasang kira-kira 15 cm di atas permukaan tanah. Bejana diisi larutan formalin 4% sebanyak 150 ml dan sedikit deterjen untuk menghilangkan tegangan permukaan agar spesimen tidak bergerak-gerak pada saat tenggelam.

- Perangkat diletakkan pada sore hari atau pada permulaan malam hari dan dibiarkan selama 24 jam. Dalamnya perangkat tidak terlalu berpengaruh, tetapi mulutnya harus persis sama rata dengan permukaan tanah.

5.1.5 Pengukuran Faktor Fisik Lingkungan

Pada saat pengumpulan hasil tangkapan, lakukan pengukuran suhu udara, suhu tanah, dan kelembapan udara relatif serta keadaan cuaca. Selain itu, ambil contoh tanah untuk penetapan kadar air, kadar bahan organik, dan pH tanah di laboratorium (Lembaga Penelitian Tanah, 1979; Suin, 2003).

Pengukuran suhu udara dilakukan dengan menggunakan termometer yang digantungkan kira-kira satu meter di atas permukaan tanah, sedangkan untuk mengukur suhu tanah, masukkan termometer ke dalam tanah dengan cara membuat lubang menggunakan besi berdiameter sama dengan termometer yang digunakan, kemudian masukan termometer ke dalam lubang tersebut sampai kedalaman yang dikehendaki, misal untuk lapisan olah cukup sampai kedalaman 20 cm. Gunakan higrometer untuk mengukur kelembapan udara relatif, pengukuran dilakukan antara jam 9.00 sampai jam 11.00.

5.1.6 Pelabelan

Pada saat pekerjaan di lapangan, beri label semua contoh yang diambil dan simpan pada tempat-tempat khusus sesuai keperluan seperti kantung kain katun untuk contoh tanah, botol-botol tempat menyimpan contoh sesuai tempat, waktu pengambilan, kedalaman tanah, dan lain-lain. Setelah seluruh keperluan pengambilan contoh telah siap, kemudian contoh dibawa ke laboratorium untuk diidentifikasi.

Siapkan buku catatan khusus untuk mencatat keadaan yang tidak berhubungan langsung dengan pekerjaan pengambilan contoh tanah, namun mendukung dan mempengaruhi secara langsung keberadaan fauna tanah di lapangan, seperti suhu udara, cuaca, musim, tipe agrosistem, dll, yang perlu dicatat secara khusus.

5.1.7 Pemisahan Fauna Tanah dan Pengelompokannya

Pisah-pisahkan contoh hewan permukaan tanah dari lapangan dengan metode sortasi dengan tangan, menurut jenisnya dengan menggunakan stereomikroskop, setelah dihitung kemudian awetkan dalam larutan formalin

4%. Contoh fauna tanah yang diambil menurut kedalaman yang telah ditentukan masukkan kedalam kantung yang dibuat dari kain katun, dan contoh tanah dalam perjalanan ke laboratorium tidak boleh lebih dari empat jam agar hewan tidak mati di perjalanan (Anderson & Ingram, 1993).

DAFTAR PUSTAKA

- Adianto.1983. Biologi Pertanian. Penerbit ALUMNI. Bandung.
- Anderson, J.M. & J.S.I. Ingram. 1993. Tropical soil biology and fertility: A Handbook of Methods, 2nd ed. CAB International. Wallingford. UK.
- Anwar, E.K., P. Kabar, & Subowo. 2006. Pemanfaatan cacing tanah *Pheretima hupiensis* untuk meningkatkan produksi tanaman jagung. Jurnal Penelitian Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Islam Sumatera Utara 25(1): 42-51.
- Hanafiah, K.A., I. Anas, A. Napoleon, & N. Ghoffar. 2003. Biologi Tanah. Ekologi dan Makrobiologi Tanah. Divisi Buku Perguruan Tinggi. PT Raja Grafindo Persada. Jakarta
- Hidayat, A. & A.K. Makarim 1992. Pengambilan dan Persiapan Contoh Tanah dan Tanaman. Bulletin Teknik No.4. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. Balai Penelitian Tanaman Pangan. Bogor.
- Lembaga Penelitian Tanah. 1979. Penuntun Analisis Fisika Tanah. Departemen Pertanian. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. Bogor
- Suin, N.M. 2003. Ekologi Hewan Tanah. Penerbit Bumi Aksara dan Pusat Antar Universitas Ilmu Hayati. ITB
- Thomas, C.A., & G.H. Mitchell. 1951. Eelworms. Nematodes as pest of mushrooms. M.G.A Bull. 22: 61-71

ANALISIS KELIMPAHAN DAN KERAGAMAN FAUNA TANAH

Edi Santosa

Fauna tanah merupakan salah satu komponen ekosistem tanah yang berperan dalam memperbaiki struktur tanah melalui penurunan berat jenis, peningkatan ruang pori, aerasi, drainase, kapasitas penyimpanan air, dekomposisi bahan organik, pencampuran partikel tanah, penyebaran mikroba, dan perbaikan struktur agregat tanah (Witt, 2004). Walaupun pengaruh fauna tanah terhadap pembentukan tanah dan dekomposisi bahan organik bersifat tidak langsung, secara umum fauna tanah dapat dipandang sebagai pengatur terjadinya proses fisik, kimia maupun biokimia dalam tanah (Hill, 2004).

Berdasarkan ukuran, secara garis besar terdapat 3 kelompok Invertebrata yang hidup di dalam tanah, yaitu: mikrofauna (protozoa dan nematoda), mesofauna, dan makrofauna. Mikrofauna memacu proses dekomposisi bahan organik dengan memperkecil ukuran bahan dengan enzim selulase yang kemudian dimanfaatkan oleh mikroba perombak lainnya. Mesofauna dan makrofauna selain memperkecil ukuran bahan organik, aktivitas metabolismenya menghasilkan *faeces* yang mengandung berbagai hara dalam bentuk tersedia bagi tanaman dan biota tanah lainnya. Beberapa makrofauna seperti cacing tanah mempunyai peranan penting dalam mempengaruhi kesehatan dan produktivitas tanah. Lubang cacing merupakan rongga-rongga dalam tanah yang dapat meningkatkan aerasi, penetrasi akar, dan infiltrasi air (Curry & Good, 1992). Kotoran cacing (*casting*) merupakan campuran tanah dengan bahan organik yang telah dicerna yang mengandung berbagai hara yang tersedia bagi tanaman (Lake & Supak, 1996). Fauna bersama hayati tanah lainnya sebagai komunitas yang mendiami daratan/tanah menciptakan *biogenic soil structure* yang khas, alami, dan berperan pada kelancaran terjadinya proses siklus hara di dalam tanah.

Peranan fauna tanah dalam pemeliharaan kualitas lingkungan di lahan pertanian tidak diragukan lagi. Pengelolaan tanah/lahan yang tidak memenuhi kaidah-kaidah yang benar akan menyebabkan penurunan kelimpahan dan keragaman fauna tanah, dalam jangka panjang akan mengakibatkan terganggunya siklus hara alami dalam agroekosistem, menurunnya kualitas dan produktivitas lahan, dan pada gilirannya akan mengancam keberlangsungan usaha tani di lahan tersebut. Pengetahuan ini dapat dipakai untuk menciptakan atau memperbaiki penerapan teknologi

pengelolaan lahan pertanian yang lebih ramah lingkungan, mempunyai produktivitas tinggi, dan mengarah pada sistem pertanian berkelanjutan.

Dalam sub-bab ini dikemukakan tentang salah satu cara pengamatan, mendapatkan dan analisis data, serta interpretasi data kelimpahan dan keragaman fauna tanah lahan pertanian terutama pada lahan kering.

5.2.1 Pinsip

Metode pengambilan contoh fauna tanah sangat banyak macamnya, tetapi tidak satupun di antaranya dapat digunakan untuk mendapatkan semua kelompok fauna tanah. Untuk mendapatkan contoh fauna tanah yang dapat mewakili keberadaannya disuatu tempat/lahan, perlu digunakan beberapa metode pengambilan contoh fauna seperti pada sub-bab 5.1.

Penggunaan corong Berlese-Tullgren merupakan salah satu metode untuk pengambilan meso-mikrofauna tanah khususnya dari arthropoda seperti Colembolla, Acarina, Isopoda, dan larva Insekta. Sedangkan untuk contoh tanah tertentu seperti yang banyak mengandung serasah atau tanah-tanah berpasir bisa menggunakan metode lain seperti pengapungan dengan sentrifus atau pengapungan-penyaringan.

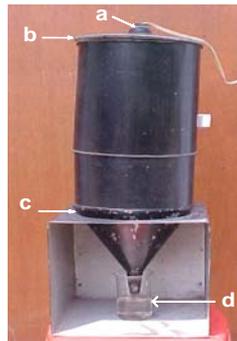
Pada prinsipnya corong Berlese-Tullgren terdiri atas corong untuk menempatkan contoh tanah, penutup yang dipasang lampu/bohlam, dan botol penampung yang berisi larutan pembunuh dan pengawet fauna. Contoh tanah ditempatkan dalam corong yang kemudian disinari dan dipanasi. Karena sebagian besar mesofauna maupun mikrofauna tidak suka cahaya (fototaksis negatif) dan permukaan contoh tanah menjadi panas maka fauna akan bergerak turun dari permukaan tanah, jatuh, dan terjebak ke dalam botol penampung yang berisi larutan pengawet. Fauna yang terkumpul biasanya termasuk meso dan mikro-arthropoda, larva Coleoptera dan larva Diptera yang masih hidup. Fauna yang mati, telur, dan pupa Insekta tidak bisa dikumpulkan karena tidak bisa bergerak dan masih tertinggal dalam contoh tanah.

Semua fauna yang telah didapat baik dari hasil koleksi di lapangan (lihat 5.1) maupun di laboratorium, dikelompokkan menurut jenis kategori takson tertentu, diamati dan diidentifikasi, dihitung jumlah individunya, dan berdasarkan data pengamatan tersebut dibuat penilaian keadaan ekologis ekosistem lahan.

5.2.2 Analisis Kelimpahan dan Kepadatan Fauna Tanah

Bahan dan Alat

- Bahan: contoh tanah, alkohol 50-70% atau formalin 5-10%, dan larutan Hoyer (terdiri atas campuran 30 g gum arab berupa kristal, 200 g kloral hidrat, 20 ml gliserol dan 50 ml aquades yang dilarutkan pada suhu kamar dan disaring dengan kain katun yang halus) (Woolley, 1982).
- Alat tulis: buku catatan, kertas label, pensil atau spidol.
- Kaca pembesar atau mikroskop dan gelas preparat.
- Beberapa cawan Petri ukuran kecil (diameter 5 cm).
- Contoh makrofauna hasil koleksi dari lapang (sub-bab 5.1).
- Corong Berlese-Tullgren modifikasi yang terdiri atas tabung yang di dalamnya diletakkan alat penyaring/kawat kasa, lampu dan botol penampung beserta tutupnya (misal: tabung bekas film). Tabung terbuat dari logam (lembaran seng) atau plastik berdiameter 20 - 30 cm dengan tinggi 35 - 40 cm, bagian bawah disambung dengan tabung kerucut dengan diameter pucuk kerucut 2 - 2,5 cm. Pucuk kerucut dipasang/disambung dengan tabung berdiameter 2 - 2,5 cm sepanjang 5 - 10 cm. Tutup bagian atas corong terbuat dari triplek yang sekaligus berfungsi sebagai tempat penggantung lampu dengan daya 15 - 20 W. Penutup dapat dibuka dan ditutup dengan mudah untuk memasukkan dan mengeluarkan contoh tanah. Bagian dasar tabung (perbatasan antara tabung dengan bagian kerucut) dipasang kawat kasa dengan lubang 1,5 - 2 mm x 1,5 - 2 mm yang juga berfungsi sebagai alas untuk contoh tanah dan sebagai penyaring sehingga memungkinkan fauna tanah melarikan diri/ bergerak ke bawah (Gambar 1).



Gambar 1. Corong Berlese Tullgren modifikasi: tempat bohlam (a), penutup (b), letak penyaring (penyaring di dalam tabung) (c), dan botol penampung (d).

Prosedur

44) Pemasangan dan penggunaan alat

- Masukkan contoh tanah sebanyak ± 1 kg atau 1 L ke dalam corong Berlese-Tullgren. Goyang-goyangkan atau pukul pelan-pelan di sekeliling tabung sedemikian rupa sehingga partikel tanah atau bahan organik yang berukuran $\leq 1,5$ mm jatuh ke bawah. Penggoyangan dihentikan setelah tidak ada lagi partikel tanah yang jatuh. Tampung semua partikel tanah yang jatuh dengan botol dan masukkan kembali ke dalam corong. Contoh tanah yang telah disimpan dalam alat pendingin, sebelum dimasukkan ke dalam tabung anginkan lebih dahulu pada suhu kamar selama 1 – 4 hari. Sedangkan contoh tanah yang baru diambil dari lapang bisa langsung dimasukkan ke dalam corong. Untuk kepentingan tertentu, hasil pengamatan akan diperhitungkan berdasarkan konversi berat kering contoh, maka sebagian contoh tanah diukur berat kering mutlaknya.
- Beri label pada tabung penampung atau tabung bekas film yang berisi tentang: i) asal lokasi contoh tanah; ii) tanggal pengambilan contoh; dan iii) nama pengambil contoh, atau cukup berisi nomor/kode contoh saja, catatan keterangan tentang nomor/kode tersebut dibuat di dalam buku catatan.
- Isi tabung penampung yang telah berlabel dengan alkohol 70% setinggi 3,0 – 5,0 cm, letakkan tepat di bawah lubang corong Berlese-Tullgren, dan pastikan semua fauna yang ke luar dari tabung pasti jatuh ke dalam tabung penampung.
- Pasang penutup corong, nyalakan lampu di dalam corong, dan biarkan selama 2 – 4 hari.

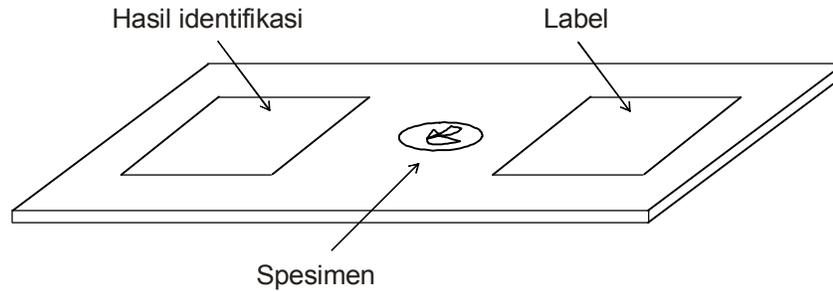
45) Koleksi dan sortasi

- Ambil tabung penampung, tutup rapat, dan spesimen yang diperoleh siap diamati/identifikasi.
- Keluarkan contoh tanah dari corong Berlese-Tullgren dan bersihkan dengan kuas atau alat penghisap debu sehingga dapat dipastikan bahwa tidak ada fauna yang tertinggal. Dengan demikian maka contoh tanah berikutnya tidak terkontaminasi oleh fauna dari contoh sebelumnya.
- Jika di dalam tabung penampung cukup banyak serasah bahan organik, pisahkan fauna dari serasah dengan metode pengapungan. Caranya yaitu, buang alkohol dalam tabung dan ganti dengan larutan garam NaCl $\pm 30\%$ (30 g NaCl dilarutkan dalam 100 ml air), fauna akan mengapung di permukaan larutan. Tuang fauna yang terapung beserta larutan garam pada kertas saring, cuci dengan air bersih, cuci kembali berturut-turut dengan alkohol 30%, 50%, dan 70%, dan simpan di dalam tabung yang diisi alkohol 70%.

- Contoh makrofauna yang telah dikumpulkan/diperoleh dari hasil koleksi di lapangan (lihat 5.1), pisah-pisahkan (*sorting*) menurut kelompok/jenis katagori takson tertentu. Pemisahan bagi jenis-jenis makrofauna hasil koleksi di lapangan bisa dilakukan dengan pengamatan mata telanjang atau dengan bantuan kaca pembesar. Masukkan makrofauna dari anggota takson yang sama ke dalam satu cawan Petri yang telah diisi formalin 5 – 10%.
 - Masukkan contoh mesofauna dan mikrofauna yang telah terkumpul dari corong Berlese-Tullgren ke dalam cawan Petri (diameter \pm 5 cm) yang di bawahnya telah diberi garis-garis bersilang sehingga terbagi atas beberapa petakan. Tempatkan dan kumpulkan (dengan memakai jarum/pinset/spatula kecil dan kaca pembesar) setiap mesofauna atau mikrofauna dari anggota takson yang sama pada satu petak. Kemudian lakukan pemisahan dengan memindahkan (memakai pipet tetes mata) mesofauna atau mikrofauna yang telah terkumpul di petak tersebut ke dalam cawan Petri lain yang telah diisi alkohol 70%. Dengan demikian maka pada satu contoh tanah dapat diperoleh beberapa cawan Petri yang berisi beberapa jenis fauna tanah.
- Catatan :
- Cawan Petri yang berisi fauna yang belum siap diamati sebaiknya ditutup untuk mencegah terjadinya penguapan alkohol dan diberi label sesuai dengan label contoh tanah.

46) Pengamatan dan identifikasi

- Identifikasi masing-masing jenis fauna berdasarkan klasifikasi dari taksonomi hewan dan setiap jenis ditentukan nama jenisnya sampai pada katagori takson paling rendah yang dimungkinkan/diketahui, misalnya sampai pada katagori takson famili, genus, atau spesies.
- Pelaksanaan identifikasi untuk menentukan klasifikasi fauna tanah bagi mikrofauna yang membutuhkan pengamatan morfologi/anatomi lebih terinci, amati dengan menggunakan mikroskop yaitu dengan membuat preparat lebih dahulu bagi spesimen yang akan diamati. Teteskan larutan Hoyer di bagian tengah gelas preparat ukuran 55 mm x 75 mm, letakkan spesimen-spesimen dari satu spesies fauna menempel di atas tetesan larutan Hoyer pada berbagai posisi yang berbeda (*ventral* = arah perut, *dorsal* = arah punggung, dan *lateral* = arah samping). Bagian kanan gelas preparat diberi label yang berisi tanggal, lokasi, dan nama kolektor. Sedangkan bagian kiri untuk mencatat hasil identifikasi meliputi nama spesies dan famili (Gambar 2).



Gambar 2. Preparat mikrofauna tanah untuk diidentifikasi dengan pengamatan di bawah mikroskop.

Catatan:

- Buku taksonomi hewan tingkat rendah seperti buku-buku Invertebrata, Arthropoda, atau buku biologi tanah seperti buku "*Soil Biology Guide*" (Dindal, 1990) dapat dipakai untuk identifikasi fauna tanah. Sedangkan untuk mesofauna dan mikrofauna yang lebih terperinci antara lain bisa menggunakan buku "*A Manual of Acarology*" (Krantz, 1978) untuk identifikasi Acarina dan buku "*True Bugs of the World, Classification and Natural History*" (Schuh & Slater, 1995) untuk identifikasi Hemiptera dan Heteroptera.

47) Penghitungan dan interpretasi data

- Hitung berapa jenis fauna yang ada, jumlahkan setiap individu dalam tiap-tiap jenis, dan catat seperti pada lembar data pengamatan (pada contoh lembar data pengamatan dipersingkat) seperti di pada lembar data pengamatan.
- Lakukan penghitungan dan interpretasikan data yang diperoleh pada setiap titik pengamatan, sebagai berikut:

Distribusi fauna tanah (Suin, 2003)

$$I = (N \sum X^2 - \sum X)^2 : (\sum X^2 - \sum X)$$

Keterangan:

- I = Index Morista
- N = Jumlah seluruh contoh
- X = Jumlah individu setiap contoh

Interpretasi:

- I = 1, distribusi fauna random
- I > 1, distribusi fauna berkelompok
- I < 1, distribusi fauna beraturan

Lembar data pengamatan

- Jika A merupakan jenis fauna yang bermanfaat bagi pertanian, semakin tinggi nilai K atau KR berarti pengelolaan tanah dan tanaman mengarah pada kebersinambungan budi daya tanaman.
- Jika A merupakan jenis fauna yang merugikan bagi pertanian, semakin tinggi nilai K atau KR berarti pengelolaan tanah dan tanaman secara ekologis tidak menguntungkan dan pada nilai tertentu (ambang batas) mengancam kebersinambungan budidaya tanaman. Hal ini juga dipengaruhi oleh kelimpahan fauna tanah lain yang bertindak sebagai predator bagi jenis fauna yang merugikan tersebut.

Indeks keragaman dan dominasi fauna tanah, Shannon-Wiener & Simpson (Odum, 1971).

$$\begin{aligned} \text{Indek keragaman} &= \sum (ni/N) \ln (ni/N) \\ \text{Indek dominansi} &= \sum (ni/N)^2 \end{aligned}$$

Keterangan:

- ni = jumlah individu tiap jenis
- N = jumlah total seluruh jenis

Interpretasi:

- Nilai indeks keragaman semakin tinggi, dinamika biologis dan proses daur hara tanah semakin baik.
- Nilai indeks dominasi mendekati 1, terjadi ketidakseimbangan populasi dari jenis-jenis fauna yang ada dalam tanah, jenis fauna tanah tertentu mendominasi fauna tanah lainnya. Pengelolaan tanah dan tanaman secara ekologis kurang menguntungkan bagi keberlanjutan usaha tani.
- Nilai dominasi mendekati 0,5 menunjukkan bahwa populasi dari masing-masing jenis fauna dalam keadaan seimbang. Pengelolaan tanah dan tanaman secara ekologis mendukung bagi keberlanjutan usaha tani.

5.3.2 Ulasan

Kendala utama analisis kelimpahan dan keragaman fauna tanah adalah identifikasi dan klasifikasi fauna tanah, disamping cara koleksi fauna pada agroekosistem lahan sawah maupun lahan rawa. Hal ini disebabkan jenis fauna cukup beragam, sedangkan untuk mengidentifikasi dan mengklasifikasi fauna diperlukan pengetahuan/pengenalan morfologi dan anatomi dari setiap jenis fauna tanah. Apabila terdapat banyak larva, untuk mengklasifikasikannya ke dalam tingkat Ordo perlu pengenalan/

pengetahuan yang mendalam, apalagi untuk penetapan pada katagori takson yang lebih rendah. Demikian pula pada lahan sawah maupun rawa, diperlukan metode pengambilan fauna yang lebih tepat dan mudah dikerjakan sesuai dengan perilaku fauna, sehingga contoh fauna yang diambil betul-betul mewakili fauna tanah yang mendiami dan hidup pada agroekosistem tersebut. Cara pengambilan dengan corong Berlese-Tullgren tidak bisa diterapkan pada agroekosistem ini.

Kelimpahan dan keragaman fauna tanah bersifat dinamis, selalu berubah. Faktor-faktor abiotik seperti kelembapan, aerasi, dan suhu sangat berpengaruh terhadap kelimpahan dan keragaman fauna tanah. Demikian pula faktor biotik seperti jenis tanaman yang diusahakan, pola tanam, dan kadar bahan organik tanah berpengaruh terhadap fauna tanah. Hal ini berkaitan dengan ekosistem penggunaan dan pengelolaan lahan. Oleh karena itu pengetahuan tentang pengaruh berbagai cara pengelolaan lahan pada berbagai agroekosistem menjadi sangat penting karena sebagian besar kegiatan pertanian konvensional pada umumnya hanya berorientasi pada memaksimalkan hasil dengan mengandalkan bahan kimia pertanian berupa pupuk dan biosida, sehingga dapat mengakibatkan penurunan kualitas lingkungan.

Untuk mendapatkan data kerapatan dan keragaman fauna tanah yang lebih akurat, pada masa mendatang masih diperlukan perbaikan metode yang telah ada. Disamping hal tersebut kegiatan penelitian yang lebih intensif diharapkan dapat menghasilkan dan mengembangkan metode-metode baru yang lebih baik dan dapat digunakan untuk mendapatkan data-data fauna tanah yang lebih akurat pada berbagai agroekosistem lahan pertanian maupun ekosistem daratan lainnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Curry, J.P. & J.A. Good. 1992. Soil fauna degradation and restoration. *Advances in Soil Science*. 17: 171-215.
- Dindal, D.L. 1990. *Soil Biology Guide*. A Willy Interscience Pub. John Wiley & Sons. New York. Chicester. Brisbane. Toronto. Singapore.
- Hill. B.S. 2004. Soil fauna and agriculture : Past findings and future priorities. EAP Pub. 25. 8pgs. <http://eap.mcgill.ca/Publications/eap-head.htm> (21-4-2007).
- Krantz, G.W. 1978. *A Manual of Acarology*. 2nd Ed. Origon State University Book Store, Inc. Carvalis.
- Lake, E. & S. Supak. 1996. What's the deal with yucky old worms? Sierra Pelona Press. p. 1-2.

- Odum, E.P. 1971. *Fundamentals of Ecology*. 3rd ed. W.B. Sanders Company Philadelphia, London.
- Schuh, R.T. & J.A. Slater. 1995. *Frue Bugs of the World (Hemiptera: Heteroptera) Classification and Natural History*. Comstock Pub. Associates. Cornell University. Ithaca and London.
- Suin, N.M. 2003. *Ekologi Hewan Tanah*. Bumi Aksara Jakarta. Pusat Antar Universitas Ilmu Hayati. ITB
- Witt, B. 2004. Using soil fauna to improve soil health. <http://www.hort.agri.umn.edu/h5015/97papers/witt.html> (21-4-2007).
- Woolley, T.A. 1982. Mite and other soil microarthropods. p. 1131-1142. *In* A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Keeney (*Eds.*) *Method of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties*. 2nd ed. Am. Soc. of Agronomy Inc., Soil Sci. Soc. of Am. Inc. USA.

ANALISIS KELIMPAHAN POPULASI DAN KARAKTERISASI CACING TANAH

Ea Kosman Anwar

Cacing tanah merupakan Oligochaeta berperan penting dalam proses dekomposisi bahan organik. Cacing tanah memakan serasah daun dan sisa-sisa tumbuhan dan menjadikannya partikel-partikel kecil yang selanjutnya dirombak oleh mikroba. Cacing tanah juga berperan meningkatkan jumlah populasi mikroba tanah. Menurut Parmelee *et al.* (1990) di dalam usus cacing tanah terjadi pertumbuhan mikroba tanah yang lebih baik dan lebih banyak daripada di dalam tanah, sehingga cacing tanah dapat dianggap sebagai tempat pembenihan mikroba tanah.

Aktifitas cacing tanah meningkatkan kesuburan tanah dengan mendistribusikan bahan organik ke lapisan yang lebih dalam, menyebarkan mikroba dan meningkatkan aerasi tanah. Cacing yang mati merupakan sumber makanan mikroba dan unsur hara tanah yang dapat meningkatkan kesuburan tanah dan tersedia bagi tanaman. Tiap luasan satu acre tanah dapat hidup 500.000 ekor cacing tanah dan membuat sekitar 50 ton kasting dan menggali lubang di dalam tanah untuk system saluran irigasi setara panjang 2.000 kaki dengan diameter 6 inci. Aktivitas cacing tanah sangat tergantung pada kadar air, tipe tanah, vegetasi (palatibilitas serasah), dan pH tanah.

Dalam membuat lobang masing-masing jenis cacing tanah tidak sama, ada yang dilakukan dengan mendesak masa tanah dan ada pula yang dilakukan dengan memakan langsung masa tanah (Minnich, 1977). Kelompok geofagus akan memakan masa tanah, dan kelompok litter *feeder/* limifagus biasanya dengan mendesak masa tanah. Lobang tidak hanya untuk mendukung pergerakan cacing tanah dan menghindari dari tekanan lingkungan, tetapi juga diperuntukkan sebagai tempat menyimpan dan mencerna makanan (Schwert, 1990).

Lubang cacing dari *Lumbricus terrestris* berdiameter lebih kurang 0,8 cm dan dapat menghubungkan antara horison A dan lapisan subsoil (Fanning & Fanning, 1989). Pada tanah Typic Paleudalf didapatkan banyak lobang cacing dan kotorannya (*casting*) pada perlakuan tanpa olah tanah (TOT), sedang pada perlakuan pengolahan tanah secara konvensional tidak ditemukan (Drees *et al.*, 1994).

Semua cacing tanah tergolong biseksual hermaprodit, akan tetapi tidak dapat melakukan fertilisasi sendiri. Untuk reproduksi, dua ekor cacing tanah berkopulasi, (saling mempertukarkan sel sperma). Cacing tanah

bersifat fototaksis negatif, yaitu menjauhi arah datangnya cahaya. Untuk menghindari cahaya dan pemangsa cacing tanah membuat lubang persembunyian dalam tanah. Oleh karena itu cacing tanah aktif di malam hari (nokturnal).

Beberapa metode sampling kuantitatif dan kualitatif bagi cacing tanah (Lumbricidae) adalah metode sortasi dengan tangan, ekstraksi kimia dan ekstraksi listrik. Tidak satupun metode ini sempurna bagi segala lingkungan dan bagi setiap jenis. Sortasi dengan tangan merupakan teknik paling efisien, walaupun cacing yang belum dewasa dan kecil tidak mudah dilihat dan spesimen yang rusak juga harus diperhitungkan. Penggunaan bahan kimia merupakan cara yang paling banyak digunakan, walaupun keefektifannya bervariasi untuk tiap jenis, habitat, kondisi tanah, dan saat pengambilan. Metode dimamis yaitu dengan menggunakan umpan dan rumen segar sering juga digunakan sebagai umpan. Penggunaan listrik saat ini jarang digunakan. Cacing tanah dikeluarkan dari tanah dengan menggunakan arus listrik yang alirkan dari generator atau aki (Schwert, 1990).

Dalam uraian berikut disajikan metode pengumpulan (koleksi) yang diambil dari beberapa sumber.

Metode analisis kelimpahan cacing tanah pada prinsipnya mempunyai kesamaan dengan metode analisis fauna tanah lainnya, yaitu mempelajari dan mengetahui jumlah atau populasi cacing tanah dan menggolongkannya berdasarkan masing-masing jenis, pada areal atau volume tanah tertentu. Perbedaan *niche* dan sikap atau tingkah laku cacing tanah terhadap keadaan lingkungan yang mempunyai kekhasan tersendiri dapat membedakan metode analisis cacing tanah dengan fauna tanah lainnya. Kelembaban, temperatur, dan tingkat pencahayaan yang menyebabkan cacing keluar dari tanah berhubungan dengan "geotaktik" fauna tanah yang dipengaruhi oleh sifat fobi atau kebiasaan dan tingkah lakunya terhadap keadaan lahan.

Secara umum, langkah pertama dalam analisis kelimpahan cacing tanah adalah upaya menemukan dan mendapatkan cacing tanah pada areal atau volume tanah tertentu yang telah ditetapkan untuk kemudian dihitung, dikumpulkan, dan diidentifikasi.

5.3.1 Pengumpulan (Koleksi) Cacing Tanah

Alat

- Sekop kecil dan besar
- Nampan besar untuk menampung dan membersihkan cacing, nampan bedah ukuran 6 cm – 10 cm.
- Bor (diameter 30 cm, tinggi 10 -20 cm. Dibuat dari logam dengan pemegang dan ujung yang runcing (seperti dibuat dari pelat gergaji yang dibundarkan dan dilas.
- Ring PVC diameter 20 cm tinggi 20 cm
- Pisau, pisau bedah atau silet
- Gunting kecil, gunting bunga iris
- Peniti serangga ukuran 0.00 sampai 1
- Jarum
- Tas/kantong kain

Bahan

- Air ledeng (kran) 2 L.
- Larutan mustard
 - Larutkan 2 sendok teh bubuk mustard dalam 2 L air kran aduk sampai rata
- Formalin 0,2 – 0,4 %
 - Campurkan 2 – 4 cc formalin dalam 998 cc – 996 cc akuades aduk sampai rata
- Alkohol
 - Alkohol 70 % (tersedia)
 - Alkohohol 50%
 - Alkohol 20% (encerkan 1 L alkohol 70% dengan akuades menjadi 100-20/100-70 x 1 L =8/3 x 1 L = 2,67 L campuran)
- Boraks

Prosedur

48) Menggunakan formalin

- Siramkan formalin (0,2 – 0,4%) ke permukaan tanah (titik pengambilan) ukuran panjang 1 m x 0,5 m, sampai seluruh permukaan basah dan tertutup larutan formalin secara merata. Ulangi penyiraman setiap 10 menit sampai cacing dalam tanah muncul ke permukaan.
- Tergantung kadar air tanah dan temperatur tanah cacing akan keluar setelah 30 menit. Untuk tanah becek gunakan larutan yang lebih pekat. Biasanya larutan formalin yang diperlukan 5 – 10 L.
- Cacing tanah yang muncul ke permukaan kemudian kelompokkan berdasarkan ciri fisik (warna atau besar tubuh).

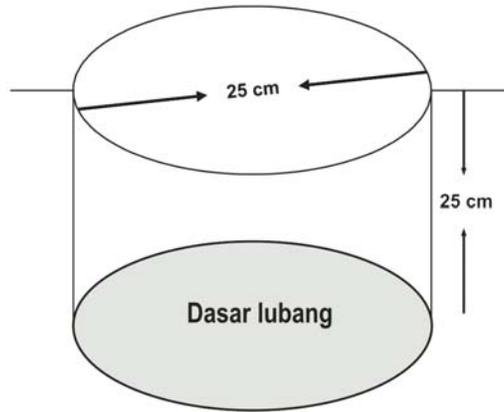
- Identifikasi menggunakan kunci panduan dan hitung jumlah dan timbang beratnya masing-masing (Lihat 5.3.3)
 - Hitung kepadatan populasi dan kepadatan relatif yang mengacu kepada Suin (2003) (Lihat 5.2).
- 49) Menggunakan arus listrik
- Gunakan aliran listrik arus lemah 12 volt, cacing dapat dipaksa keluar ke permukaan tanah. Caranya yaitu dengan mengatur elektroda dalam lingkaran tertutup pada areal dimana cacing tanah akan dianalisa, kemudian arus listrik dialirkan.
 - Kelompokkan cacing tanah yang muncul ke permukaan tanah berdasarkan ciri fisik (warna atau besar tubuh).
 - Identifikasi menggunakan kunci panduan dan hitung jumlah dan timbang beratnya masing-masing (Lihat 5.3.3)
 - Hitung kepadatan populasi dan kepadatan relatif yang mengacu kepada Suin (2003) (Lihat 5.2).
 - Keefektifan metode ini sangat ditentukan oleh kandungan air tanah, pada tanah yang kurang mengandung air metode ini akan kurang efektif.
- 50) Pengumpulan langsung (sortasi dengan tangan)
- Lakukan penghitungan kuantitatif dengan cara mengumpulkan langsung dengan tangan pada tempat sampling seperti pada lapisan serasah organik yang berstruktur lepas, dengan luas yang telah ditentukan 1 m x 0,5 m atau 1m x 1 m (lebih luas lebih bagus disesuaikan dengan tenaga yang tersedia).
 - Cacing tanah yang ukurannya besar dan masih hidup, identifikasi bisa dilakukan dilapangan.
 - Cacing tanah yang mati dan harus dilihat dengan mikroskop karena ukurannya kecil, diwadahi dengan menggunakan tabung glass yang berisi formalin 2%.
 - Identifikasi menggunakan kunci panduan dan masing-masing dihitung jumlah dan ditimbang beratnya (Lihat 5.3.3)
 - Hitung kepadatan populasi dan kepadatan relatif yang mengacu kepada Suin (2003) (Lihat 5.2).
 - Metode dianggap lebih efisien.
- 51) Pengumpulan dari contoh tanah bor
- Sampel diambil 2 kali setahun yaitu musim hujan dan kemarau
 - Unit sampel tanah diambil dengan bor logam dengan diameter 30 cm, tinggi 20 cm.

- Bor diputar dimasukkan kedalam tanah sedalam mungkin. Dengan sekop yang lebar gali lebih dalam kedalam tanah sepanjang pinggir luar bor.
- Salah satu pinggirnya gali lubang dan angkat (ungkit) tanah dalam bor ke atas.
- Dengan menggunakan pisau, pisah-pisahkan sampel hingga kedalaman 15 cm, pada lapisan horizontal (0-7 cm, 8-15 cm) dan tuangkan ke dalam kantung kain (agar terjadi pertukaran udara), dengan diberi labels.
- Kirim sampel ke laboratorium dengan aerasi yang cukup dan tidak tertekan.
- Di dalam lapisan bahan organik yang berstruktur lepas pada tanah hutan, bor umumnya hanya untuk menandai area pengambilan sampel. Horizon organik kemudian dibuang (disingkirkan) pada wadah kecil dengan menggunakan sekop kecil. Paling sedikit 5 sampel tiap plot.
- Identifikasi menggunakan kunci panduan dan masing-masing dihitung jumlah dan ditimbang beratnya (Lihat 5.3.3)
- Hitung kepadatan populasi dan kepadatan relatif yang mengacu kepada Suin (2003) (Lihat 5.2).
- Metode ini efektif untuk mengetahui populasi cacing tiap lapisan tanah.

52) Dengan pembuatan lubang

- Pilih lokasi tanah yang mewakili (representatif), hindarkan tempat-tempat yang mungkin mempengaruhi populasi cacing tanah, seperti mulsa atau tumpukan kompos.
- Menggali tanah (plot)
- Ukur luasan galian tanah (25 cm x 25 cm) dan gali sampai kedalaman 25-30 cm dengan sekop, upayakan seminimal mungkin cacing yang terpotong sekop.
- Sortasi tanah galian dengan tangan untuk diambil cacing tanahnya.
- Hitung jumlah cacing. Sortir lagi sampel tanah pada sebuah tempat yang diberi warna berbeda untuk memudahkan penghitungan
- Tumpahkan 2 L larutan mustard ke dalam lubang, bisa juga diganti dengan formalin 0,4% (larutan hendaknya cukup memabukkan tapi tidak meracuni cacing tanah). Untuk memunculkan cacing tanah endogaesis (yang membuat lubang dalam),
- Dasar lubang harus rata, cacing tanah endogaesis akan keluar dari dasar lubang kemudian hitung jumlah cacing.
- Catat total cacing tanah yang muncul di dasar lubang, ditambahkan dengan jumlah cacing dalam tanah galian (hasil sortasi tangan)
- Bilas cacing tanah dengan air sebelum dikembalikan ke tanah.
- Identifikasi menggunakan kunci panduan dan masing-masing dihitung jumlah dan ditimbang beratnya (Lihat 5.3.3).

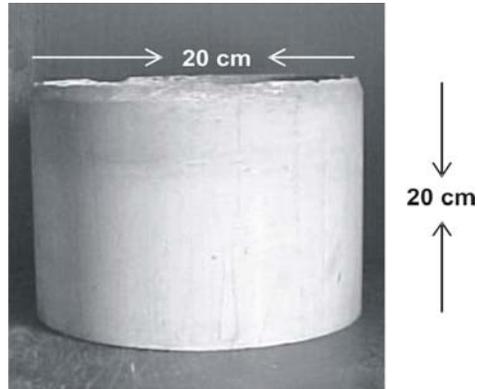
- Hitung kepadatan populasi dan kepadatan relatif yang mengacu kepada Suin (2003) (Lihat 5.2).
- Kepadatan populasi cacing tanah umumnya erat dengan keadaan lapangan oleh karena itu penghitungan cacing tanah harus beberapa kali dalam satu musim dan menggunakan rata-rata ukuran baku dari tahun ke tahun.



Gambar 1. Skema lubang yang dibuat untuk mendapatkan cacing tanah permukaan (kanan) dan cacing tanah yang keluar dari dasar lubang setelah diberi larutan mustard (formalin 0,4%) (kiri).

53) Dengan ring-sampel PVC

- Gunakan ring sampel untuk tanah-tanah lumpur seperti tanah sawah, ring-sampel terbuat dari PVC diameter 20 cm dengan tinggi 20 cm.
- Tekan PVC ke dalam lumpur, lumpur yang ada di dalam ring diambil dengan tangan dan dipisahkan ke dalam ember.
- Lumpur dalam ember masukan ke dalam ayakan atau plankton sieve ukuran 32 mesh untuk disortir dan dipisahkan dengan cacing tanah menggunakan air mengalir dari kran atau air yang dituang ke atas ayakan.
- Cacing yang diperoleh kumpulkan dan masukan ke dalam wadah botol yang berisi alkohol 20% selama 5 – 6 menit agar tidak mengkerut, kemudian masukan lagi ke dalam botol berisi campuran alkohol 70% 640 cc, boraks 4 g, dan formalin 40 cc.
- Bawa ke laboratorium untuk diidentifikasi
- Identifikasi menggunakan kunci panduan dan masing-masing dihitung jumlah dan ditimbang beratnya (Lihat 5.3.3).
- Hitung kepadatan populasi dan kepadatan relatif yang mengacu kepada Suin (2003) (Lihat 5.2).



Gambar 2. Ring sampel terbuat dari PVC diameter 20 cm tinggi 20 cm

5.3.2 Penghitungan Kelimpahan Populasi Cacing

Analisis kelimpahan fauna tanah, dikonversi ke luasan, volume atau berat tanah tertentu, misalnya luasan 1 m^2 , berat 1 kg atau volume 1 L. Agar konversi lebih mendekati ketepatan perlu disesuaikan dengan cara pengambilan/pengumpulan cacing. Konversi ke-luasan tertentu (misal 1 m^2), cocok untuk cara pengambilan dengan sortasi dengan tangan pada lapisan organik, formalin dan arus listrik. Konversi ke berat atau volume cocok untuk cara pengambilan contoh tanah dan lubang. Sedangkan konversi ke volume cocok untuk cara ring sampel PVC. Penghitungan kepadatan populasi dan kepadatan relatif dilakukan dari tiap titik pengamatan dan mengacu pada Suin (2003) (lihat.5.2).

5.3.3 Identifikasi dan Pengelompokan

- Kumpulkan cacing tanah yang akan diidentifikasi, dan cuci di dalam air. Cacing yang masih hidup dimatikan dengan beberapa cara, yaitu: 1) celupkan dalam air mendidih beberapa saat dan segera angkat kembali; 2) celupkan beberapa saat kedalam alkohol 50%, angkat kembali setelah cacing tidak bergerak lagi; dan 3) dibius dengan alcohol 5%, tambahkan sejumlah alkohol tiap 10 menit secara periodik sampai cacing seluruhnya mengendur dan tidak merespon terhadap sentuhan maupun penambahan alkohol.
- Simpan cacing dalam nampan, luruskan, dan kemudian rendam dalam formaldehida 5%. Tutup rapat dan hindarkan dari binatang maupun manusia dan simpan di tempat dengan ventilasi yang baik. Setelah 24

jam, buang formaldehida, kemudian 24 jam lagi buang formaldehida dengan air kran, tunggu dua jam atau lebih dan buang airnya. Ulangi bila dirasa belum cukup. Saat ini cacing bisa disimpan dalam botol atau kulkas.

- Simpan cacing dalam alkohol 80% yang diberi label kertas yang resisten air atau alkohol dan ditulis dengan tinta resisten atau pensil yang disimpan di bagian dalam botol. Data label meliputi lokasi yang tepat, tanggal pengumpulan dan nama pengumpul. Selanjutnya spesimen ini siap untuk diidentifikasi.
- Kelompokkan cacing tanah berdasarkan taksonomi (untuk menetapkan sampai ketinggian jenis atau spesies memerlukan keahlian khusus). Tersedia berbagai kunci taksonomi. Di bawah ini disajikan langkah-langkah *general earthworm diagram* (James, 2005)
- *Download* gambar/diagram tubuh cacing secara umum. Diagram ini merupakan pokok-pokok tampilan fisik yang perlu diidentifikasi/dikenali secara tepat.
- Pilih suatu sifat khusus cacing (misalnya warna) yang cocok dengan cacing yang akan diidentifikasi dengan cara mengklik-on teks. Secara otomatis akan muncul sifat berikutnya sampai cacing dapat diidentifikasi/dikenali.

Kunci Panduan

Berikut ini dicantumkan kunci panduan model *on-line* (James, 2005), model *Herman's Adventur* dan model modifikasi Kassam (Hanafiah *et al.*, 2003).

Panduan *on-Line* akan menuntun bagaimana menggunakan kunci identifikasi untuk klasifikasi cacing. Uraian berikut adalah langkah-langkah dalam klasifikasi cacing.

Tidak semua cacing yang ditemukan dapat diidentifikasi

Identifikasi hanya dapat dilakukan pada cacing-cacing dewasa yang telah mempunyai klitellum (organ reproduksi pada cacing dewasa) (Gambar 3). Kokon dan cacing juvenil (cacing muda) dapat diidentifikasi, namun perlu mata yang terlatih dan alat-alat khusus. Cacing dewasa mudah dikenal dari lokasi klitellum dekat kepala cacing tanah. Klitellum normal berwarna abu-abu putih, tetapi bisa juga oranye muda pada spesies yang sama. Warna oranye muda menunjukkan cacing sedang kepanasan dan tidak dapat diartikan sebagai cacing dengan spesies yang berbeda.



Gambar 3. Cacing dewasa (foto kiri); tangan harus selalu dalam keadaan lembap pada saat identifikasi cacing tanah (foto kanan) (Sumber: James, 2005)

Beberapa hal yang perlu diperhatikan sebelum memulai identifikasi cacing.

Siapkan Kunci taksonomi yang akan digunakan sebagai penuntun diagram alur. Dimulai dengan sifat-sifat dasar yang spesifik pada masing-masing level. Ketika pengamatan turun satu cabang dari diagram alur, sisihkan ciri-ciri cacing yang tidak diperlukan dan pilih ciri cacing sedikit saja yang paling penting.

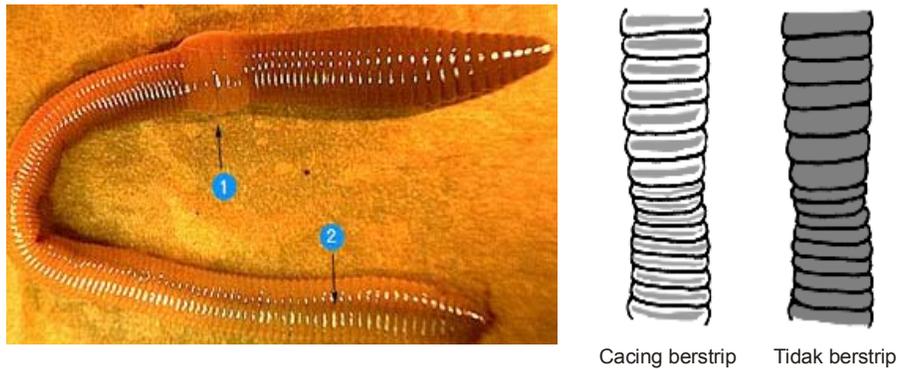
Sebelum identifikasi, yakinkan tangan dalam keadaan lembap dan terbebas dari sabun atau minyak wangi yang menyebabkan cacing-cacing luka (iritasi) dan sukar ditangani/dikendalikan karena bergerak-gerak. Sediakan botol semprotan air untuk menjaga kelembapan tangan dan tempat sekelilingnya apabila terlalu kering. Apabila mencari sesuatu sifat-sifat fisik dalam tubuh cacing, lihat petunjuk pola (garis besar) tidak kepada detil-detil kecil.

Memulai identifikasi cacing.

Untuk memulai identifikasi cacing, turun ke halaman berikutnya dan pilih kunci *start on-line* (<http://www.nrri.umn.edu.worm/key/diagram.htm>).

54) Ukuran tubuh cacing. Untuk determinasi panjang tubuh cacing, diperlukan saduran dari diagram cacing secara umum. Diagram ini membantu dalam determinasi panjang cacing dan sifat-sifat fisik lain yang diperlukan. Dalam identifikasi panjang cacing, cacing dibiarkan menjulur secara bebas hingga merangkak. Jangan sekali-kali cacing dijulurkan karena akan merusak cacing secara serius. Pilih dan klik ukuran yang paling cocok bagi cacing yang dideterminasi. Hal ini akan membawa kita ke sifat-sifat berikutnya.

- 55) Warna cacing. Pastikan yang dilihat bagian belakang (dorsal) dari tubuh cacing. Bagian ventral cacing sebagian besar tidak berwarna, sehingga tidak dapat digunakan untuk identifikasi. Amati dan perhatikan warna antara kepala dan klitellum. Di bagian ini biasanya terjadi pigmentasi. Warna cacing sebagian besar solid, dan sebagian berstrip-strip.



Gambar 4. Penampang belakang cacing tanah 1. klitellum, 2. segmen (Sumber: James, 2005)

Dalam Kunci Taksonomi *On Line*, *Eisenia foetida* merupakan spesies strip, punya segmen-segmen berwarna merah, dan alur-alur antara segmen berwarna kuning.

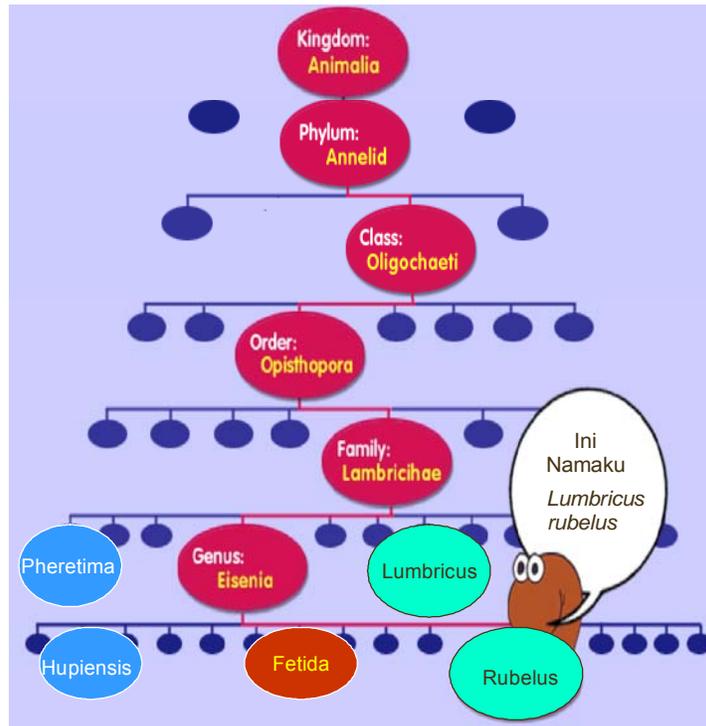
- 56) *Tubercula pubertatis* (TP) dan *genital tumescence* (GT) yang berada pada sisi bagian depan (ventral) dari klitellum, merupakan ciri taksonomi yang sangat penting. Perhatikan apakah semua GT berlokasi di dalam klitellum, atau beberapa ditemukan di luar klitellum? Apakah ukuran TP seperti segitiga atau batang? Apakah TP lebih panjang dari klitellum atau lebih pendek (Gambar 5).



Gambar 5. Penampang depan (ventral) *genital tumescence* (GT), *Tubercula pubertatis* (TP) dan klitelum cacing tanah (Sumber: James, 2005)

Kunci ini menggambarkan secara penuh dan mengandung deskripsi umum untuk mendapatkan sifat sifat yang dicari, juga dapat klik *on* kata-kata kunci untuk mengantar ke *glossary*. Untuk informasi bagaimana mempersiapkan dan mengemas cacing tanah, klik *on* tombol dari Kunci Menu. Gunakan Kunci *On Line* melalui email.

Model klasifikasi: Herman's Adventure <http://www.urbanext.uiuc.edu/worms>. (6 September, 2004)



Gambar 6. Pohon klasifikasi cacing tanah model Herman's Adventure (<http://www.urbanext.uiuc.edu/worms>. 6 September, 2004)

- Kingdom : Binatang (hewan)
 Phylum : Annelida (tubuh beruas-ruas)
 Kelas : Oligochaeta (tubuh berbulu halus-dapat terlihat dengan mikroskop)
 Ordo : Opisthokora (pada tiap ruas terdapat sepasang lubang)
 Famili : Lumbricidae (tubuh berlumur)
 Genus : Tiap ruas berstrip/tidak, gemuk/langsing
 Spesies : Warna merah muda, merah, gendola(ungu)
 Contoh : *Pheretima hupiensis*: langsing, merah muda, tidak berstrip
 : *Eusenia fetida*: gemuk, merah, segmen berstrip.
 : *Lumbricus rubelus*: lambat , warna keungu-unguan

Kunci Detereminasi Cacing tanah Modifikasi Kemas (Hanafiah *et al.*, 2003).

Kunci Familia/Genus

Familia dan Genus (g) cacing tanah diklasifikasikan berdasarkan perbedaan yang terjadi pada piranti reproduksi, setae, dan kelenjar kalsiferous, sebagai berikut.

- 1) Perhatikan peranti reproduksi cacing tanah, apabila klitelum berada
 - a) di depan segmen ke 15, teruskan ke (2) tetapi jika
 - b) setelah segmen ke 15 adalah famili *Lumbricidae*, teruskan ke(4)
- 2) Setae tersusun menurut pola:
 - a) Perisetin: Genus *Pheretima* (f. Megascolecidae),
 - b) Lumbrisin, teruskan ke (3)
- 3) Lubang kelamin jantan pada segmen ke:
 - a) 17 atau pada 17/18, dan spermathecal di belakang segmen ke10: g *Eudrilus*, ke D
 - b) 18 dan spermathecal di depan segmen ke 10: g. *Diplocardia* (f. Eudrilidae), ke C;
 - c) 19 (semiaquatik): g. *Sparganophilus* (f. Sparganophilidae) ke D.
- 4) Prostomium
 - a) tanylobous, dan setae berpasangan erat paling tidak di bagian atas tubuhnya: g. *Lumbricus*.
 - b) Epilobous, atau jika tanylobous, setae berpasangan renggang atau berjarak di seluruh tubuhnya, teruskan ke (5)
- 5) Klitelum berada pada:
 - a) segmen ke 28, teruskan ke (6)
 - b) sebelum segmen ke 28, dan penampang tubuhnya berupa kuadrangular: g. *Eiseniella*.
- 6) Tubercula pubertatis:
 - a) tidak ada, meskipun, hanya berupa penebalan seadanya pada ujung klitelum: g. *Bimastos*.
 - b) ada, berupa tonjolan atau papillae yang terisolasi, teruskan ke (7)
- 7) Setae berpasangan secara:
 - a) dekat pada seluruh tumbuh, ke (9)
 - b) dekat di bagian depan (area jantung) dan renggang di bagian belakang, tubercula pubertatis (TP) berupa tonjolan sepasang atau lebih panjang dari klitelum: g. *Octolasion*.
 - c) Renggang pada seluruh tubuh, TP berupa tonjolan (kecuali seperti tubercula terpisah) yang meluas Pada sebagian klitelum g. *Dendrobaena*
- 8) Lubang spermathecal:
 - a) segaris dengan setae "d" atau lebih sering dekat garis punggung tengah, dan potongan melintang tubuh berbentuk trapesium g. *Eisenia* dan *Eisenoides*
 - b) terletak antara setae "e" dan "d" atau "a" dan "b" atau "c" dan "d", dan potongan melintang tubuh tidak trapesium, ke (9).
- 9) Prostomium:

- a) dengan tonjolan longitudinal: g. *Eophila*.
 - b) Tanpa tonjolan longitudinal, ke (10)
- 10) Kelenjar kalsiferous:
- a) dengan dua kantong lateral dalam satu segmen, hidup di daratan: g. *Allolobophora*
 - b) Tanpa kantong lateral, bersifat amfibi: ag. *Helodrilus*.

DAFTAR PUSTAKA

- Drees, L.R., A.D. Karathanasis, L.P. Wilding, & R.L. Blevins. 1994. Micromorphological Characteristics of Long-Term No-Till and Conventionally Tilled Soils. *Soil Sci. Amer. J.* 58 : 508 – 517.
- Fanning, D.S. & M.C.B. Fanning. 1989. *Soil Morphology Genesis and Classification*. John Wiley and Sons. New York/Chichester/Brisbane/Toronto/Singapore. 365 p.
- Hanafiah, K.A., I. Anas, A. Napoleon, & Nuni Ghoffar. 2003. *Biologi Tanah. Ekologi dan Makrobiologi Tanah*. Divisi Buku Perguruan Tinggi. PT Raja Grafindo Persada. Jakarta
- Herman's Adventure. www.urbanext.uiuc.edu/worms. 6 Sept 2004. <http://www.nrri.umn.edu/worm/key/diagram.htm>. Januari, 2006
- James, S. 2005. ELAETAO: Taxonomy Days. 2nd Latin-American Meeting on Oligochaeta Ecology and Taxonomy. Nov. 14 - 18, 2005
- Minnich, J. 1977. Behavior and Habits of The Earthworm. p. 115-149. *In* The Earthworm Book, How to Raise and Use Earthworms for Your Farm and Garden. Rodale Press Emmanaus, P.A.
- Parmelee, R.W., M.H. Beare, W. Cheng, P.F. Hendrix, S.J. Rider, D.A. Crossley Jr., & D.C. Coleman. 1990. Earthworm and Enchytraeids in Conventional and No-tillage Agroecosystems: A Biocide Approach to Asses Their Role in Organic Matter Breakdown. *Biol.Fertil.Soils* 10: 1–10.
- Schwert, D.P. 1990. Oligochaeta: Lumbricidae dalam Daniel L. Dindal *Soil Biology Guide*. A Wiley-Interscience Publication. John Wiley & Sons New York.
- Suin, N.M. 2003. *Ekologi Hewan Tanah*. Penerbit Bumi Aksara dan Pusat Antar Universitas Ilmu Hayati. ITB

ANALISIS KELIMPAHAN NEMATODA

Rohani Cinta Badia Ginting & Ea Kosman Anwar

Nematoda adalah cacing gelang yang tidak bersegmen, dimana kelompok mikrofauna ini sangat beragam dan kebanyakan merupakan hewan mikroskopik dengan panjang tubuh >2 mm dan diameter lebar $0,05$ mm (Van Guhdy, 1982). Nematoda dapat ditemukan dalam segala keadaan, baik di tempat yang berair maupun yang hanya kadang-kadang berair. Nematoda memperoleh nutrisi dari sumber yang berbeda-beda. Banyak jenis nematoda merupakan parasit terhadap manusia, hewan, tanaman, insekta, dan invertebrata lainnya. Kebanyakan tanaman dan binatang dapat menjadi inang dari satu jenis atau lebih nematoda parasit. Dengan demikian, banyak nematoda parasit yang merupakan hama penyakit merugikan. Sebaliknya, jenis nematoda hidup bebas yang memangsa bakteri dan jamur mempunyai fungsi ekologi yang nyata seperti perannya dalam siklus hara pada ekosistem tanah. Selain itu, nematoda yang hidup sebagai parasit pada patogen yang menyerang tanaman termasuk yang menguntungkan. Ada juga nematoda yang merupakan saprofit, yang memotong partikel tanah menjadi butiran yang lebih kecil dan mencampur bahan organik dengan bahan anorganik sehingga meningkatkan kesuburan tanah.

Nematoda dalam tanah dikelompokkan menjadi 8 kelompok berdasarkan jenis makanan atau karakteristik morfologi bentuk mulutnya, yaitu nematoda pemakan tanaman, hifa, bakteri, bahan organik, fauna, sel eukariotik, parasit tanaman pada tahap infeksi, dan omnivora. Perkembangbiakan nematoda ada yang seksual dan aseksual. Dalam siklus nematoda, ada 4 tahap juvenil antara telur dengan nematoda dewasa.

Nematoda merupakan kelompok fauna tanah yang dominan kedua setelah protozoa baik dalam populasi maupun dalam biomassa. Sekitar 90% nematoda berada pada kedalaman 15 cm dari permukaan tanah. Kelimpahan spesifik nematoda $<1,1$ g cm^{-3} , pada partikel tanah $> 2,0$ g cm^{-3} , dalam larutan tanah $1,1-2,0$ g cm^{-3} .

Pada kondisi lingkungan yang cocok, waktu generasi nematoda tanah (dari telur ke telur) berkisar 1-2 bulan (Anderson, 1988). Pengamatan terhadap individu yang aktif dan hidup bebas diperlukan dalam studi ekologi.

5.4.1 Ekstraksi Nematoda

Kelimpahan populasi dan spesies nematoda dilakukan dengan ekstraksi untuk memisahkan nematoda dari tanah atau jaringan tanaman. Ini dilakukan dengan mencuci contoh tanah/tanaman secara langsung sehingga nematoda terpisah dari tanah/tanaman, atau memancing nematoda bergerak keluar dari tanah/tanaman.

Metode ekstraksi nematoda pada dasarnya relatif sederhana dan cara kerjanya mudah. Namun demikian, tidak ada metode yang dapat digunakan untuk mengevaluasi populasi nematoda dalam segala situasi (Freckman & Baldwin, 1990; Van Guhdy, 1982). Metode ekstraksi yang digunakan dipilih dan disesuaikan dengan jenis nematoda, biologi nematoda, tingkat parasit nematoda, jenis contoh tanah, dan data yang diperlukan (kualitatif ataupun kuantitatif). Metode ekstraksi dapat dipilih sesuai kebutuhan dan dapat merupakan salah satu, kombinasi, atau modifikasi dari metode yang ada. Efisiensi ekstraksi dipengaruhi antara lain jenis tanah, jenis nematoda, dan peralatan ekstraksi.

Metode ekstraksi dapat dibagi menjadi 3 (Aescht & Foissner, 1995) yaitu:

- 57) Penghitungan secara langsung. Nematoda dihitung langsung dari larutan contoh tanah.
- 58) Prosedur dinamik yaitu metode ekstraksi berdasarkan pergerakan nematoda. Prosedur ini disebut juga metode aktif dimana nematoda dipancing agar aktif bergerak keluar dari tanah atau akar tanaman.
- 59) Prosedur mekanik yaitu metode ekstraksi berdasarkan perbedaan ukuran dan kerapatan. Prosedur ini disebut juga metode pasif dan menggunakan berbagai kombinasi penyaringan, penuangan, dan pengapungan. Contohnya adalah teknik sentrifusi.

Ekstraksi nematoda dengan teknik penghitungan secara langsung dilakukan pada contoh tanah dengan volume sedikit dan tingkat pengenceran tinggi. Hasil yang diperoleh lebih baik dengan tingkat akurasi lebih tinggi dibandingkan dengan metode yang lain. Metode ini dapat digunakan untuk semua jenis substrat. Namun demikian, metode ini jarang dipakai karena membutuhkan waktu yang relatif lama, yakni sekitar 4 jam terus menerus dengan efisiensi sekitar 85% (Aescht & Foissner, 1995).

Prosedur dinamik digunakan untuk nematoda aktif dengan memancing nematoda keluar dari tanah atau akar tanaman. Cara yang paling sederhana untuk prosedur dinamik ialah dengan menggunakan teknik baki Whitehead atau corong Baermann. Walaupun cara kerjanya sederhana tetapi ekstraksi memerlukan waktu 2-4 hari dan hasil tangkapan

kurang baik untuk nematoda yang bergerak lamban atau yang berukuran besar. Pengujian cara ini seringkali diragukan keakuratannya.

Pada metode mekanik yang menggunakan cara penyaringan dan flotasi, contoh tanah yang sama disaring berulang-ulang antara 2-8 kali untuk memperoleh hasil yang maksimum. Dengan cara ini nematoda yang lolos pada penyaringan pertama akan tertangkap pada penyaringan berikutnya.

Populasi nematoda yang diperoleh dengan metode penghitungan secara langsung hampir dua kali lipat daripada hasil yang diperoleh dengan metode pasif. Meyer (1995) memodifikasi teknik sentrifusi yang ditemukan oleh Jenkins pada tahun 1964, dan melaporkan bahwa 60-90% nematoda tidak tertangkap terutama yang berukuran kecil (<38 μm) dibandingkan dengan metode penghitungan secara langsung.

Estimasi jumlah total nematoda dilakukan segera setelah prosesing. Nematoda hidup yang bergerak lebih mudah dihitung dan diidentifikasi di bawah mikroskop daripada yang sudah mati dan difiksasi. Nematoda dapat disimpan pada suhu 15⁰C selama 1 minggu.

5.4.1.1 Penghitungan Langsung (Lüftenegger *et al.*, 1988)

Prinsip

Individu dan spesies nematoda dihitung langsung dari larutan tanah. Individu yang hidup dan yang sudah mati dibedakan dengan pewarnaan.

Alat

- Timbangan
- Bejana kecil (diameter 2-3 cm)
- Pengaduk kaca
- Pipet mikro dan tip
- Kaca objek untuk preparasi
- Mikroskop dan minyak imersi

Bahan

- Larutan stok ekstrak tanah standar
 - Rebus 300 g contoh tanah dalam 1 L akuades selama 10 menit. Saring larutan dan sterilisasi dalam autoklaf. Ekstrak tanah sangat mudah dikolonisasi oleh bakteri atau fungi, oleh karena itu sebelum digunakan sebaiknya sterilisasi kembali dengan autoklaf.

- Ekstrak tanah standar
 - Encerkan larutan stok ekstrak tanah standar dengan akuades dengan perbandingan 1:4 sampai 1:6 dan sesuaikan pH larutan menjadi pH 7.0 dengan HCl atau NaOH. Larutan kerja ini disiapkan sebelum digunakan kira-kira 10 ml.

Prosedur

- Masukkan 0,1 g contoh tanah basah ke dalam bejana (diameter 2-3 cm).
- Tambahkan kira-kira 1-3 ml ekstrak tanah standar kerja (tergantung jumlah populasi nematoda dan kandungan liat) ke dalam contoh tanah.
- Aduk larutan menggunakan pengaduk kaca untuk mendapatkan larutan yang homogen. Letakkan setetes larutan (0,1-0,3 ml) di atas kaca objek dan jangan tutup dengan kaca penutup.
- Lakukan langkah ini sebanyak sepuluh kali sehingga jumlah total tanah yang dianalisis 1 g tanah.

5.4.1.2 Teknik Sentrifusi dan Flotasi Modifikasi (Jenkins, 1964)

Prinsip

Jenkins menambahkan teknik sentrifusi terhadap teknik penyaringan yang dimodifikasi Christie & Perry (1951). Teknik ini baik untuk analisis laboratorium secara rutin. Teknik ini menggunakan prinsip perbedaan gravitasi spesifik nematoda dan partikel tanah. Nematoda akan rusak jika berada lebih dari 10 menit dalam larutan sukrosa. Efisiensi ekstraksi sama antara nematoda yang bergerak aktif dengan nematoda yang bergerak lamban. Hasil maksimum diperoleh dengan mengulangi penyaringan filtrat.

Alat dan Bahan

- Timbangan
- 2 wadah plastik volume 4 L
- Pengaduk kaca
- Botol semprot
- Gelas beaker
- Tabung plastik setrifugasi dengan volume 50 ml dengan dasar bundar
- Saringan 38 μ m
- Sentrifus dan tabung
- Mikroskop dengan minyak immersi
- Mikroskop binokular

- Larutan gula (sukrosa) 1,3 M
 - Larutkan 456 g sukrosa dalam 1 L akuades.

Prosedur

- Masukkan sebanyak 100 g contoh tanah ke dalam wadah plastik. Buang batu dan akar-akar yang besar.
- Tambahkan 1 L akuades dan hindari jangan sampai meluap. Aduk selama 10 detik biar tercampur rata. Biarkan selama 10 menit agar partikel tanah yang besar mengendap.
- Tuangkan supernatan ke dalam wadah plastik kedua melalui saringan berukuran 38 μm . Bilas saringan di atas wadah plastik kedua. Buang tanah yang ada pada wadah plastik pertama.
- Nematoda yang tertangkap dicuci dari saringan dengan cara membilas dari bagian belakang saringan menggunakan botol semprot dan hasil bilasan dimasukkan ke dalam gelas beaker dengan sedikit akuades.
- Beberapa nematoda dapat lolos dari saringan. Oleh karena itu, saring kembali filtrat untuk mendapatkan nematoda yang lepas dan penyaringan ini dapat diulangi sampai tiga kali.
- Aduk kembali larutan tanah pada wadah plastik kedua. Biarkan selama 1 menit, lalu tuang ke dalam wadah plastik pertama melalui saringan ukuran 38 μm . Bilas hasil tangkapan pada saringan di atas wadah plastik pertama. Kumpulkan hasil tangkapan dalam gelas beaker.
- Aduk kembali larutan yang ada dalam wadah plastik pertama, diamkan selama 1 menit. Perlahan-lahan tuangkan supernatan ke dalam wadah plastik kedua melalui saringan. Bilas saringan di atas wadah plastik kedua dan masukkan hasil tangkapan ke dalam gelas beaker.
- Proses keseluruhan mulai dari pencucian tanah dapat diulang dua kali atau lebih untuk mendapatkan hasil yang maksimum.
- Saring kembali hasil yang diperoleh dalam gelas beaker dengan saringan dan masukkan ke dalam tabung sentrifugasi.
- Turunkan nematoda dengan cara sentrifugasi selama 5 menit pada kecepatan 2200 rpm di dalam tabung sentrifugasi dan buang dengan hati-hati supernatan sampai airnya tinggal sedikit.
- Larutkan pelet yang mengandung nematoda dalam larutan gula, lalu diaduk rata dengan pengaduk kaca, dan sentrifugasi selama 3 menit dengan kecepatan 2200 rpm. Pada saat melakukan sentrifugasi, tidak boleh berhenti karena pelet tanah yang ada dalam dasar tabung akan naik dan tercampur lagi dengan nematoda. Buang bahan organik yang mengambang dari permukaan larutan gula. Cuci larutan gula yang di dalamnya terdapat nematoda dengan saringan 38 μm dan ambil nematoda. Filtrat dapat disaring dua kali lagi untuk memperoleh hasil yang maksimum. Larutan gula pekat akan mengering dan merusak nematoda, jadi prosesnya harus dilakukan dengan singkat. Perlakuan dapat disimpan pada suhu 4⁰C sebelum dianalisis lebih lanjut. Larutan diencerkan dan diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 40 kali atau mikroskop binokular.

5.4.1.3 Teknik Flotasi-Sentrifusi Modifikasi (Caveness & Jensen, 1955)

Prinsip

Metode ini digunakan untuk mengekstrak nematoda dan telur dari jaringan tanaman. Untuk mengeluarkan nematoda dari jaringan tanaman dilakukan dengan memotong tanaman menggunakan blender. Selanjutnya nematoda dipisahkan dari jaringan tanaman dengan teknik penyaringan dan sentrifugasi.

Alat

- Timbangan
- Blender
- Sentrifus dan tabung
- Saringan diameter 0,5 mm dan 5 μm
- Wadah plastik
- Cawan hitung
- Gelas piala
- Vorteks

Bahan

- Kaolin
- Larutan sukrosa (500 g L⁻¹)

Prosedur

- Cuci bersih sebanyak 10 g akar dari tanah serta kotoran lain dan potong-potong sepanjang 1 cm tambahkan 100 ml air, lalu blender dengan kecepatan 10.000 rpm selama 5 detik.
- Untuk memisahkan jaringan tanaman yang kasar dari nematoda dan telur, saring suspensi dengan saringan diameter 0,5 mm ke dalam wadah plastik.
- Masukkan nematoda yang tertangkap ke dalam tabung sentrifugasi 50 ml dan tambahkan 1-2 sendok teh kaolin.
- Vorteks suspensi selama 30 detik dan sentrifugasi dengan kecepatan 420 g selama 4-5 menit.
- Tuang supernatan dan larutkan pelet dalam larutan sukrosa menggunakan vorteks dan sentrifugasi dengan kecepatan 2.200 rpm selama 3-4 menit.
- Sesudah disentrifugasi, saring nematoda dengan saringan diameter 5 μm dan cuci dalam sebuah gelas piala yang berisi air.

- Kumpulkan nematoda dari saringan dan masukkan ke dalam cawan hitung dengan sedikit air.

5.4.2 Perhitungan

Penghitungan nematoda biasanya dilakukan di bawah mikroskop stereoskopik pada pembesaran 20 – 100 kali.

Kelimpahan atau jumlah populasi

Jumlah populasi dihitung per g berat kering tanah dan atau per luasan tanah (m²). Dengan demikian, kandungan air dan atau kelimpahan populasi dari lapisan tanah ditentukan dengan metode standar.

$$l. g^{-1} \text{ bk} = \frac{l_{bb} \cdot 100}{bb. \% \text{ bk}}$$

$$l. m^{-2} = \frac{l_{bb} \cdot B. D. 10^4 \cdot 100}{bb. \% \text{ bk}}$$

Keterangan:

- l_{bb} = jumlah populasi dalam contoh tanah lembap
- w_m = berat tanah lembap (g)
- l = Kelimpahan (jumlah) populasi
- B = Bulk densiti (g cm⁻³)
- D = Kedalaman lapisan tanah dari contoh tanah yang dianalisis (cm)
- 10^4 = Faktor bulk densiti ke 1 m² (1 m² = 10⁴ cm²)
- 100 = Faktor untuk berat kering tanah

Biomassa

Bobot dari satu individu nematoda dihitung dengan cara mengukur minimal 10 individu per spesies (Schinner *et al.*, 1995).

$$G = \frac{w^2 \cdot l}{16 \cdot 10^5}$$

Keterangan:

- w = Lebar maksimum nematoda (μm)
- l = Panjang nematoda (μm)
- $16 \cdot 10^5$ = Faktor massa
- M = Massa (μg)

DAFTAR PUSTAKA

- Aescht, E. & W. Foissner. 1995. Microfauna. p. 316-337. *In* F. Schinner, E. Kandeler, R. Öhlinger, & R. Margesin (*Eds.*) *Methods in Soil Biology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Germany.
- Anderson, J.M. 1988. Spatiotemporal effects of invertebrates on soil processes. *Biol. Fertil. Soils*. 6: 216-227.
- Caveness, F.E. & H.J. Jensen. 1955. Modification of the centrifugal-flotation technique for the isolation and concentration of nematodes and their eggs from soil and plant tissue. *Proc. Helminth. Soc. Wash.* 22: 87-89.
- Christie, J.R. & V.G. Perry. 1951. Removing nematodes from soil. *Proc. Helminthol. Soc. Wash.* 18: 106-108.
- Freckman, D.W. & J.G. Baldwin. 1990. Nematoda. p. 155-200. *In* D.L. Dindal (*Ed.*) *Soil Biology Guide*. A John Wiley & Sons. New York.
- Jenkins, W.R. 1964. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant. Dis. Rep.*: 48:692.
- Lüftenegger, G., W. Petz, W. Foissner, & H. Adam. 1988. The efficiency of a direct counting method in estimating the numbers of microscopic soil organisms. *Pedobiologia* 31:95-101.
- Meyer, E. 1995. *Methods in Soil Zoology: Nematodes (Nematoda)*. p. 310-337. *In* F. Schinner, R. Öhlinger, E. Kandeler, & R. Margesin (*Eds.*) *Methods in Soil Biology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York.
- Schinner, F., E. Kandeler, R. Öhlinger, & R. Margesin. 1995. *Methods in Soil Biology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Germany.
- Van Guhdy, S.D. 1982. Nematodes. p. 1121-1131. *In* R.H. Miller & D.R. Keeney (*Eds.*) *Methods of Soil Analysis*. 2nd ed. American Soc. Agronomy, Inc. Soil. Sci. Soc. America, Inc. Publ. Madison, Wisconsin, USA.

ANALISIS KELIMPAHAN ARTHROPODA TANAH: COLLEMBOLA DAN ACARINA

Prastowo Kabar, Ea Kosman Anwar, & Edi Santosa

Arthropoda tanah adalah kelompok fauna tanah yang mempunyai kaki berbuku-buku dan sebagian besar terdiri atas anggota Ordo Collembola dan Acarina. Kelompok fauna ini mempunyai penyebaran luas dan ditemukan di seluruh lokasi yang ditumbuhi tanaman, dapat hidup di daratan yang bertemperatur dari -60° sampai $>40^{\circ}\text{C}$, dan berperan sebagai hewan pioner. Arthropoda tanah tergolong saprofagus (pemakan sisa-sisa tanaman) yang telah mati, sebagian kecil termasuk karnivora dan saprofagus, dan berperan dalam dekomposisi bahan organik baik dengan enzim yang diproduksi sendiri atau dari enzim yang dihasilkan mikroflora tanah.

Collembola mempunyai panjang tubuh antara 1 – 2 mm, berekor pegas yaitu alat pipih di bagian belakang tubuhnya yang berfungsi untuk melompat. Collembola mampu melompat sejauh lebih dari 100 kali panjang tubuhnya (Pfadt, 1971). Collembola memegang peran penting pada proses perombakan bahan organik dan penyuburan tanah. Dengan fungsi yang dimilikinya, Collembola secara nyata berperan dalam dinamika unsur hara dalam ekosistem lantai hutan (Killham, 1994).

Acarina (*mite*) yang biasa disebut tungau merupakan Arthropoda tanah yang mempunyai panjang ≤ 1 mm. Acarina dari keluarga Oribatidae merupakan hewan tanah yang bertindak sebagai predator. Acarina dibagi menjadi empat Subordo yaitu: Mesostigmata, Prostigmata, Astigmata dan Cryptostigmata (Wallwork, 1970). Sebagian besar anggota Mesostigmata dan Prostigmata merupakan predator dan sebagian kecil sebagai detritus primer (pemakan tumbuhan tingkat rendah, misal lumut). Astigmata pada umumnya terdapat terutama pada tanah berumput dan tanah-tanah pertanian walaupun populasinya relatif kecil. Sedangkan anggota dari kelompok Cryptostigmata hampir semuanya sebagai detritus dan pemakan cendawan. Acarina erat hubungannya dengan proses dekomposisi bahan organik dalam tanah.

Kebanyakan Acarina dan Collembola terdistribusi di lapisan tanah 0 – 5 cm (Kabar, 1985). Jenis Collembola yang berada di lapisan tanah yang lebih dalam mempunyai kulit tubuh cenderung berwarna gelap (Poduridae). Selain itu sebagian anggota Collembola memiliki struktur kaki berambut (Pseudochorutidae) dan bentuk tubuh sederhana (Sminturidae). Pada tahun 1999 telah ditemukan sekitar 50.000 spesies anggota Acarina, sebagian besar mempunyai kaki 4 pasang, tetapi ada yang mempunyai 2 pasang

bahkan 1 pasang kaki ([http://en.wikipedia.org/wiki/Image: Peacock_mite%2 Tucherela_sp.jpg](http://en.wikipedia.org/wiki/Image:Peacock_mite%2Tucherela_sp.jpg)).

Dalam ekologi hewan tanah, baik kelompok Collembola maupun Acarina merupakan salah satu komponen dari faktor-faktor pembentuk ekosistem tanah sehingga kelimpahan populasinya ikut berperan dalam siklus makanan dan aliran energi di dalam tanah.

5.5.1 Prinsip

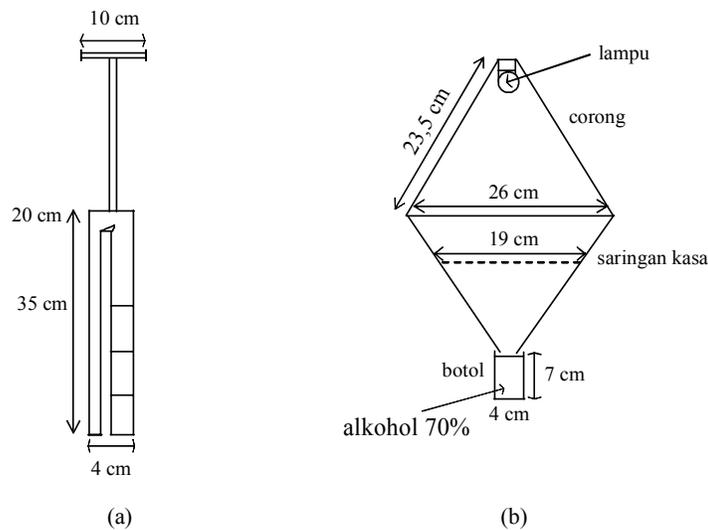
Metode pengapungan dan penyaringan (floating and sieving) dan penggunaan corong Berlese-Tullgren (Gambar 1) merupakan beberapa teknik pengumpulan contoh Collembola dan Acarina. Metode pengapungan dan penyaringan didasarkan atas perbedaan berat jenis (BJ) fauna dan bahan organik dengan mineral tanah. Larutan garam yang digunakan menyebabkan fauna dan bahan organik tanah terapung sedangkan partikel tanah akan tenggelam. Bagian yang terapung disaring untuk memisahkan fauna tanah dan bahan organik.

Penggunaan corong Berlese-Tullgren (dibahas lebih terinci pada 5.1.2) didasarkan atas sifat Collembola dan Acarina yang tidak suka cahaya (fototaksis negatif). Alat ini terdiri atas corong yang bertindak sebagai tutup dan sekaligus sebagai dudukan lampu/bohlam, saringan dan botol penampung yang berisi larutan pembunuh dan pengawet Collembola atau fauna tanah lainnya (Gambar 1). Contoh tanah dimasukkan ke dalam corong dan permukaan contoh tanah disinari dan dipanasi. Dengan sinar dan panas ini, Collembola dan Acarina akan bergerak turun dari permukaan tanah, jatuh, dan masuk dalam botol penampung yang berisi larutan pengawet.

5.5.2 Analisis Kelimpahan Collembola dan Acarina

Alat

- Botol plastik/ukuran volume 800 ml dan 100 ml.
- Bor tanah (lihat Gambar 1a)
- Mikroskop binokuler
- Baskom
- Saringan nilon
- Corong Berlese Tullgren (lihat Gambar 1b)
- Lampu 15 W
- Botol contoh



Gambar 1. Bor tanah (a) dan corong Berlese-Tullgren (b) (Adianto, 1983)

Bahan

- Larutan $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
 - Larutkan 50 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dalam 800 ml akuades
- Alkohol 70 % (larutan pengawet)

Prosedur

60) Pengambilan contoh tanah

- Ambil contoh tanah (seperti diuraikan pada sub-bab 5.1) dengan bor tanah yang bertanda (0-5, 5-10, 10-15 dan 15-20 cm) (Gambar 1). Volume contoh tanah 50 cm^3 .
- Masukkan contoh tanah ke dalam kain katun (berpori-pori) agar di dalam contoh tanah tetap ada pertukaran udara sehingga Collembola dan Acarina tetap hidup.
- Bawa contoh tanah tersebut ke laboratorium tidak lebih 4 jam.

61) Koleksi Collembola dan Acarina

- Metode pengapungan dan penyaringan (*floating and sieving*) (Southwood, 1966)
 - Pecah-pecah contoh tanah yang menggumpal sampai ukuran $< 5 \text{ mm}^3$.
 - Masukkan contoh tersebut ke dalam botol yang telah diisi larutan garam $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.
 - Aduk merata contoh tanah tersebut.

- Diamkan selama 4 jam.
- Saring bahan-bahan yang melayang dalam larutan maupun yang terapung di permukaan larutan dengan saringan nilon.
- Hasil penyaringan berupa serasah bahan organik tumbuhan dan hewan dari kelompok mesofauna Arthropoda.
- Dimasukan ke dalam botol ukuran 100 ml.
- Metode corong Berlese-Tullgren (Adianto, 1983)
 - Masukkan contoh tanah ke dalam corong Berlese-Tullgren dan ratakan.
 - Nyalakan lampu bohlam pada corong Berlese-Tullgren (penyinaran dan pemanasan) selama 48 jam.
 - Ambil dan tutup rapat botol koleksi setelah Collembola dan Acarina turun ke bawah dan masuk dalam botol tersebut (berisi alkohol 70%).

62) Pengamatan dan identifikasi

- Lihat dan amati spesimen yang ditemukan di bawah mikroskop binokuler dengan menggunakan cawan Petri. Spesimen yang termasuk Collembola seperti terlihat pada Gambar 2 dan 4 biasanya secara visual terlihat berwarna putih. Spesimen seperti Gambar 3 merupakan Acarina, biasanya secara visual berwarna putih-kekuningan.
- Spesimen lainnya yang bukan merupakan Collembola maupun Acarina dipisah dan dihitung.
- Identifikasi spesimen-spesimen Colembola maupun Acarina dengan memakai mikroskop binokuler dan berpedoman pada buku-buku Arthropoda. Khusus untuk identifikasi Acarina bisa dipakai buku "*A Manual of Acarology*" yang disusun oleh Kranz (1978), sedangkan untuk Collembola menggunakan "*Check List of Collembolan Species Reported from Indonesia*" yang disusun oleh Yosii (1966).

63) Penghitungan

- Hitung masing-masing jenis/spesies Colembolla, Acarina, dan Arthropoda lainnya dengan asumsi contoh tanah 50 g maka kepadatan Collembola dan Acarina tanah setiap hektar atau per meter persegi dapat dihitung.

Perhitungan Kepadatan Populasi

Kepadatan populasi satu jenis atau kelompok hewan tanah dapat dinyatakan dalam bentuk jumlah atau biomassa per unit contoh, atau per satuan luas, atau persatuan volume, atau per satuan penangkapan. Perhitungan kepadatan populasi dan kepadatan relatif Collembola dan Acarina mengacu kepada Suin (2003) sebagai berikut.

$$K \text{ jenis A} = \frac{\text{Jumlah individu jenis A}}{\text{Jumlah unit contoh/luas atau volume tanah}}$$

$$KR \text{ jenis A} = \frac{K \text{ jenis A}}{\text{Jumlah K semua jenis}} \times 100\%$$

Keterangan:

K = Kepadatan populasi

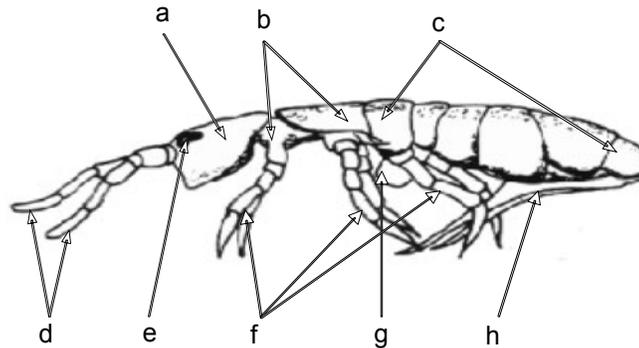
KR = Kepadatan relatif

5.5.3 Ulasan

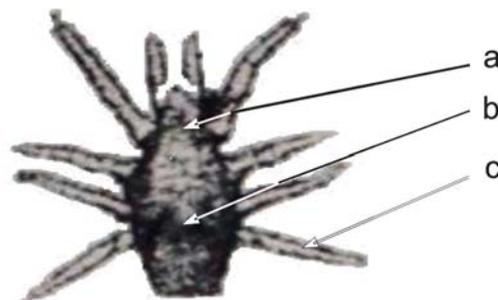
Metode pengapungan dan penyaringan memberikan hasil yang lebih optimal jika dipakai untuk koleksi Collembola dan Acarina dari tanah-tanah berpasir atau tanah yang berserasah tinggi, sedangkan pada tanah berliat atau menggumpal lebih baik dipakai metode Berlese-Tullgren. Sebaliknya penggunaan metode Berlese-Tullgren pada tanah berpasir atau tanah berserasah akan menyebabkan banyak partikel tanah/serasah yang masuk ke dalam botol. Hal ini disebabkan sewaktu fauna turun, butiran partikel tanah mudah runtuh dan jatuh ke dalam botol yang berisi larutan pengawet. Akibatnya jika terlalu banyak tanah/pasir yang jatuh, larutan pengawet tersebut tumpah.

Dalam perhitungan kepadatan populasi Collembola dan Acarina, identifikasi spesimen dilakukan secara lebih rinci bagi kedua ordo tersebut, sedangkan jenis Arthropoda lain tidak perlu diidentifikasi, tetapi jumlah individunya secara keseluruhan perlu dihitung.

Pada Gambar 2 dan 3 dapat dilihat perbedaan kedua ordo tersebut. Selain itu, juga pada Gambar 4 dan 5 perbedaan kedua ordo berdasarkan kunci ordo kelompok hewan tanah berdasarkan Lewis & Taylor (1974).



Gambar 2. Struktur tubuh Collembola, a). kepala (caput), b). dada (thorax) terdiri dari 3 ruas (segmen), c). badan (abdomen) terdiri dari ≥ 6 segmen, d). antena, terdiri atas 4 – 6 ruas sebagai alat peraba, e). mata majemuk telah mereduksi, tidak lebih dari 8 omatidia, f). kaki beruas (3 pasang), g). kolofor (tabung ventral) terdapat di badan pada ruas I sebagai alat pelekat, h). furkula, alat pegas untuk melompat.



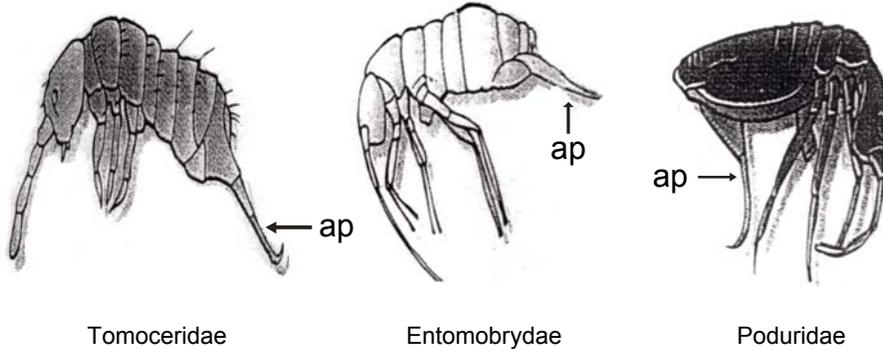
Gambar 3. Struktur tubuh Acarina, a). *cephalothorax* (kepala dan dada bersatu), b). badan (abdomen) c). kaki (1-4 pasang)

Kunci Ordo Kelompok Hewan Tanah (Lewis & Taylor, 1974)

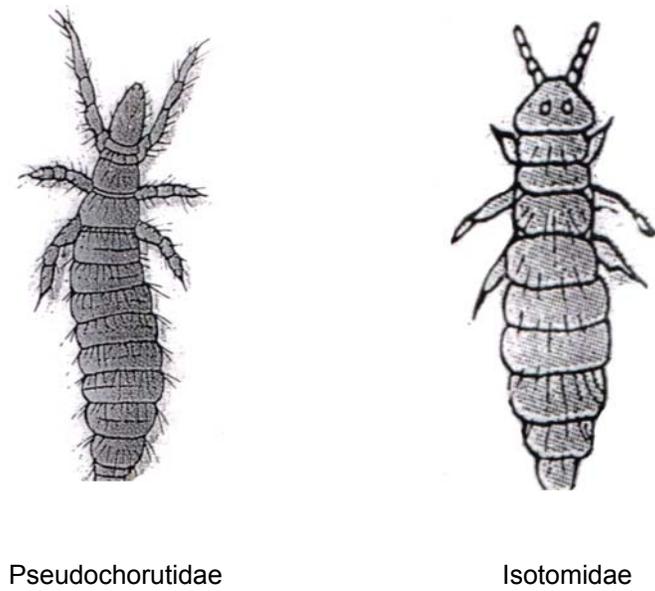
- Di bawah abdomen terdapat alat pegas panjang atau globular, berfungsi untuk meloncat; warna putih, abu-abu atau hitam ..

.....
Ordo Collembola

A



B

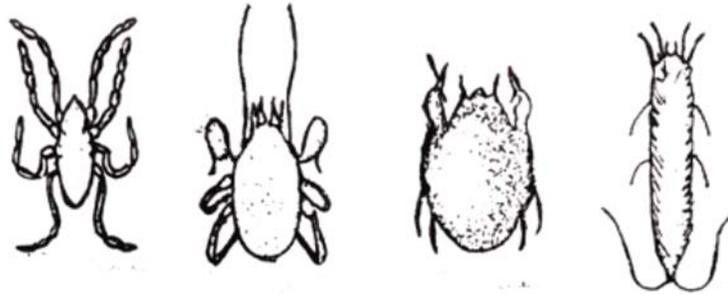


Gambar 4. Contoh sebagian anggota Collembola yang mempunyai alat pegas(ap) panjang (A) dan alat pegas globular (B)

Contoh spesies Collembola yang ada di Indonesia :

- Isotomidae : *Folsomia octoculata* HANSCHIN
- Entomobryidae : *Entomobrya proxima* FALSOM
- Pseudochorutidae : *Pseudochorutes javanicus* HANDSCHIN
- Tomoceridae : *Tomocerus montanus*

- Punya 1 – 4 pasang kaki, tubuh pendek dan tidak bersegmen yang jelas, dan tidak bersayap Ordo Acarina



Trambidiforme mite (0,5mm)

Mesostigmatid mite (1 mm)

Oribatid mite (1 mm)

Eriophyid mite (>0,5 mm)



Belum dewasa (> 1mm)

Gambar 5. Contoh sebagian anggota Acarina

Daftar Pustaka

- Adianto. 1983. Biologi Pertanian. Penerbit Alumni Bandung.
- [Http:// en. Wikipedia.org/wiki/image.-Peacock.mite % C Turcherela \(1999\).](http://en.wikipedia.org/wiki/image:-Peacock.mite_%C3%9C_Turcherela_(1999).)
- Kabar, P. 1985. Pengaruh Pemberian Pupuk NPK dan Urea terhadap Populasi Mesofauna Tanah. Skripsi S-1. Departemen Biologi, ITB. Bandung.
- Killham, K. 1994. Soil Ecology. the University Press, Cambridge. Britain.
- Krantz, G.W.1978. A Manual of Acarology, 2nd ed. Oregon State University Book Stores Corvales, OR.
- Lewis, T. & L. R. Taylor. 1974. Introduction to Experimental Ecology. Acad. Press. New York.
- Pfadt, R. E. 1971. Fundamentals of Applied Entomology. Maxmillan Company, New York.
- Southwood, T. R. E .1966. Ecological Methods. Chapman and Hall, London.
- Suin, N.M. 2003. Ekologi Hewan Tanah. Penerbit Bumi Aksara dan Pusat Antar Universitas Ilmu Hayati. ITB.
- Wallwork, J. A. 1970. Ecology of Soil Animals. Mc Graw Hill Publishing Company Limited. London.
- Yosii, R. 1966. Check List of Collembolan Species Reported from Indonesia. Treubia. 27: 45 – 52.

