

Edisi 2, 2022

# METODE ANALISIS BIOLOGI TANAH

*Editor:*

Edi Husen

Surono

Etty Pratiwi

Ladiyani Retno Widowati



BALAI PENELITIAN TANAH  
BB LITBANG SUMBERDAYA LAHAN  
PERTANIAN  
BADAN LITBANG PERTANIAN  
KEMENTERIAN PERTANIAN  
2022



# Metode Analisis Biologi Tanah

Edisi 2

EDITOR:

*Edi Husen, Surono, Ety Pratiwi, Ladiyani Retno Widowati*

## **BALAI PENELITIAN TANAH**

BALAI BESAR LITBANG SUMBERDAYA LAHAN PERTANIAN  
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN PERTANIAN  
KEMENTERIAN PERTANIAN

2022

## **Metode Analisis Biologi Tanah, Edisi 2**

© 2022 Balai Penelitian Tanah.

Husen E, Surono, Pratiwi E, Widowati LR. (Eds) 2022 Metode Analisis Biologi Tanah, Edisi 2. Balai Penelitian Tanah, Bogor, Indonesia

**Redaksi Pelaksana:** Heri Wibowo, Didi Supardi

Setting/Layout: Edh

**Penerbit:**

Balai Penelitian Tanah  
Jl. Tentara Pelajar No. 12, Kampus Penelitian Pertanian Cimanggu  
Bogor 16114  
Indonesia

T +62 (251) 8336757

F +62 (251) 8321608

<http://balittanah.litbang.pertanian.go.id>

E-mail: [balittanah.isri@gmail.com](mailto:balittanah.isri@gmail.com)

**ISBN:** 978-602-8039-50-5

Penulisan dan pencetakan buku ini dibiayai DIPA TA 2022

Satker Balai Penelitian Tanah, Bogor

# KATA PENGANTAR

Pesatnya pembangunan pertanian dewasa ini untuk mencukupi kebutuhan pangan penduduk yang jumlahnya terus bertambah telah memacu peningkatan penggunaan lahan pertanian (makin intensif) dan penambahan luas areal tanam. Situasi ini sudah tentu memicu peningkatan kebutuhan dan ketersediaan sarana produksi, seperti pupuk dan pestisida. Menghadapi situasi ini, peran biologi tanah menjadi semakin penting ke depan karena penggunaan berbagai produk berbasis biologi tanah dapat menghemat penggunaan pupuk anorganik, meningkatkan produktivitas lahan, dan dalam beberapa kasus mampu memperbaiki kualitas tanah pertanian akibat salah kelola.

Saat ini berbagai jenis mikroba dan juga fauna tanah telah diketahui berpotensi sebagai pupuk hayati, perombak bahan organik, dan beberapa atribut biologi tanah juga sudah mulai banyak digunakan sebagai indikator kualitas dan kesehatan tanah. Namun untuk mengetahui pemanfaatan produk berbasis biologi tanah tersebut perlu ditunjang oleh penuntun analisis biologi tanah yang memadai untuk eksplorasi agen hayati, analisis aktivitas, merakit formula dan teknologi penggunaannya secara tepat, dan analisis mutu agen hayati komersial.

Buku metode analisis biologi tanah ini merupakan buku edisi ke-2 yang merupakan penyempurnaan dari buku edisi pertama. Sebagai buku penuntun analisis biologi tanah, di dalam buku ini dijelaskan prosedur analisis berbagai jenis mikroba dan fauna serta berbagai atribut biologi tanah yang disajikan dalam empat Bab besar dan terdiri atas 35 judul prosedur dan analisis (ada penambahan 6 judul baru).

Ucapan terima kasih saya sampaikan kepada para penulis yang telah bekerja keras menyempurnakan buku ini dan kepada semua pihak yang telah berkontribusi dalam penyelesaiannya. Semoga buku ini dapat bermanfaat bagi para pengguna dan dapat menjadi salah satu acuan dalam kegiatan analisis biologi tanah.

Balai Penelitian Tanah

Kepala,



Dr. Ir. Ladiyani Retno Widowati, M.Sc.



# DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR .....	i
DAFTAR ISI .....	iii
1     PENDAHULUAN <i>Edi Husen</i> .....	1
2 <b>ISOLASI, KARAKTERISASI, DAN ENUMERASI MIKROBA .....</b>	<b>3</b>
2.1   Prosedur Pengambilan Contoh untuk Analisis Mikroba <i>Edi Husen</i> .....	5
2.2   Enumerasi Bakteri, Cendawan, dan Aktinomiset <i>Rohani Cinta Badia Ginting, Erny Yuniarti, Selly Salma, Surono,       Ratih Dewi Hastuti</i> .....	13
2.3   Bakteri Penambat Nitrogen Hidup Bebas <i>Ety Pratiwi, Ratih Dewi Hastuti</i> .....	29
2.4   Bakteri Pembentuk Bintil Akar <i>Erny Yuniarti, Rasti Saraswati</i> .....	53
2.5   Sianobakteri <i>Jati Purwani</i> .....	67
2.6   Mikroba Pelarut Fosfat <i>Edi Santosa, Ety Pratiwi</i> .....	79
2.7   Cendawan Mikoriza Arbuskuler <i>Rohani Cinta Badia Ginting, R.D.M. Simanungkalit</i> .....	95
2.8   Cendawan <i>Dark Septate Endophyte</i> (DSE) <i>Surono, Nicho Nurdebyandaru</i> .....	127
2.9   Bakteri Siderofor <i>Edi Husen</i> .....	137
2.10  Mikroba Perombak Bahan Organik <i>Selly Salma, Erny Yuniarti, Rosmimik</i> .....	143
2.11  Mikroba Pendegradasi Polutan <i>Rohani Cinta Badia Ginting, Erny Yuniarti</i> .....	151
2.12  Mikroba Pengakumulasi Logam Berat <i>Rohani Cinta Badia Ginting, Jati Purwani, Erny Yuniarti, Surono,       Rasti Saraswati</i> .....	165
2.13  Mikroba Penghasil Fithohormon <i>Erny Yuniarti, Jati Purwani</i> .....	173
2.14  Bakteri Pelarut Silikat <i>Ety Pratiwi</i> .....	183

2.15	Bakteri Nitrifikasi <i>Dila Aksani, Jati Purwani, Edi Husen</i> .....	195
2.16	Bakteri Denitrifikasi <i>Selly Salma, Jati Purwani, Dila Aksani, Edi Husen</i> .....	199
2.17	Bakteri Pelarut K <i>Surono, Ety Pratiwi</i> .....	207
2.18	Bakteri Koliform <i>Selly Salma, Erny Yuniarti</i> .....	217
2.19	Protozoa <i>Rohani Cinta Badia Ginting, Jati Purwani, Ea Kosman Anwar, Rosmimik</i> .....	225
3	<b>ESTIMASI BIOMASSA DAN AKTIVITAS MIKROBA</b> .....	235
3.1	Estimasi Biomassa C-mikroba <i>Sarmah, Edi Husen, Edi Santosa, Sri Widati</i> .....	237
3.2	Pengukuran Respirasi Tanah <i>Edi Husen, Dila Aksani, Sri Widati</i> .....	251
3.3	Aktivitas Dehidrogenase <i>Erny Yuniarti, Rasti Saraswati</i> .....	255
3.4	Aktivitas Nitrifikasi <i>Edi Husen,</i> .....	263
3.5	Aktivitas Denitrifikasi <i>Edi Husen, Ety Pratiwi, Erny Yuniarti, Dila Aksani, RDM Simanungkalit</i> .....	269
4	<b>AKTIVITAS ENZIM</b> .....	279
4.1	Kitinase <i>Rohani Cinta Badia Ginting</i> .....	281
4.2	Ligninase <i>Surono, Erny Yuniarti, Rasti Saraswati</i> .....	289
4.3	Selulase <i>Selly Salma, Rosmimik</i> .....	299
4.4	Fosfatase <i>Rohani Cinta Badia Ginting, Ety Pratiwi, Edi Santosa</i> .....	303
4.5	Protease <i>Erny Yuniarti</i> .....	319
4.6	Urease <i>Selly Salma</i> .....	329

5	FAUNA TANAH .....	335
5.1	Prosedur Pengambilan Contoh untuk Penelitian Fauna Tanah <i>Jati Purwani, Surono, Sarmah, Ea Kosman Anwar</i> .....	337
5.2	Analisis Kelimpahan dan Keragaman Fauna Tanah <i>Jati Purwani, Sarmah, Dila Aksani, Edi Santoso</i> .....	347
5.3	Analisis Kelimpahan Populasi dan Karakterisasi Cacing Tanah <i>Ea Kosman Anwar, Ety Pratiwi</i> .....	357
5.4	Analisis Kelimpahan Nematoda <i>Sarmah, Rohani Cinta Badia Ginting, Ea Kosman Anwar</i> .....	369
5.5	Analisis Kelimpahan Arthropoda: Collembola dan Acarina <i>Prastowo Kabar, Ea Kosman Anwar, Edi Santosa, Ety Pratiwi</i> .....	387



# 1

## PENDAHULUAN

---

---

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 dan 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, Nannipieri P. 1995. *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press. London.
- Schinner F, Öhlinger R, Kandeler E, Margesin R. 1995. *Methods in Soil Biology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Weaver RW, Angle S, Bottomley P, Bezdicsek D, Smith S, Tabatabai A, Wollum A. 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 perbanyak mikroba. Selain itu juga menjelaskan 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 mikroba. 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 higienitas 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. Dalam bab ini disertakan beberapa jenis analisis yang jarang dijumpai dalam buku metode analisis, seperti mikroba pendegradasi polutan, pengakumulasi logam berat, penghasil asam indolasetat (AIA), dan bakteri penghasil siderofor yang sekarang ini mulai banyak dipelajari dan dikomersialkan. Selain itu, dalam edisi-2 ini ditambahkan sebanyak 5 subbab yang saat ini cukup populer dan sangat diperlukan untuk pengembangannya ke depan, yaitu analisis bakteri pelarut Silikat, cendawan *Dark Septate Endophyte* (DSE), bakteri pelarut K feldspar, bakteri nitrifikasi dan denitrifikasi.

*The era in which workers tended to look at bacteria as very small bags of enzymes has long passed.*

Howard J. Rogers

# 2.1

## PROSEDUR PENGAMBILAN CONTOH UNTUK ANALISIS MIKROBA

*Edi Husen*

Pengambilan contoh merupakan langkah pertama dalam mempelajari mikroba dengan cara mengisolasi mikroba yang diinginkan dari sumber asalnya. Pengambilan contoh juga ditujukan untuk mempelajari dinamika dan aktivitas mikroba di dalam suatu ekosistem tanah. Di dalam tanah, kehidupan berbagai jenis mikroba dan aktivitasnya disokong oleh bahan organik yang kandungannya paling banyak di alam, yakni 1,2 sampai  $1,6 \times 10^{15}$  kg C (Wagner & Wolf 1997). Berbagai jenis mikroba yang diisolasi dari tanah sudah banyak yang dikomersialkan seperti mikroba penambat  $N_2$ , pelarut P, pemacu tumbuh tanaman, pengendali patogen, dan lain-lain. Berbagai atribut mikroba seperti keragaman jenis, kepadatan populasi, dan laju respirasi mikroba dalam tanah menjadi indikator yang potensial untuk menilai kualitas dan kesehatan tanah. Oleh sebab itu, untuk mendapatkan isolat mikroba ataupun untuk mempelajari dinamika populasi dan aktivitas mikroba di dalam tanah, prosedur pengambilan contoh tanah yang tepat dan benar menjadi penting.

Keberadaan mikroba di dalam tanah sangat dipengaruhi oleh kondisi fisik, kimia, dan biologi tanah. Ungkapan Beijerinck (the Father of Microbial Ecology) "Everything 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 pengelolannya. Dengan memperhatikan dan mempertimbangkan keberagaman ini, prosedur pengambilan contoh tanah yang tepat perlu dipahami agar waktu, tenaga, dan biaya untuk pengambilan contoh tanah menjadi lebih efisien. Jumlah contoh yang terlalu banyak merupakan pemborosan, namun apabila jumlah contoh terlalu sedikit interpretasi data bisa kurang memadai dan informasi yang diperoleh bisa menjadi kurang sempurna.

### **Prinsip**

Pengambilan contoh tanah adalah suatu aktivitas pengumpulan sebagian volume tanah yang mewakili suatu wilayah tertentu secara tepat untuk menghasilkan data atau nilai yang bisa memberi gambaran kondisi tanah di wilayah tersebut secara keseluruhan atau untuk mendapatkan isolat mikroba tertentu sebagai sumber asal (origin) suatu isolat.

Pengambilan contoh didahului dengan perencanaan sesuai dengan tujuan pengambilan contoh dan tingkat ketelitian data yang diinginkan. Kecuali untuk

keperluan isolasi mikroba tanah, untuk mendapatkan data tentang suatu atribut mikroba, misalnya kepadatan populasi bakteri Gram negatif pada tanah lapisan atas atau aktivitas laju respirasi tanah yang dipupuk dengan pupuk organik, dan sebagainya maka perlu dirancang cara atau strategi pengambilan contoh tanah, baik jumlah contoh yang diperlukan, kedalaman pengambilan contoh, ataupun ukuran contoh yang diperlukan.

### **Cara pengambilan contoh tanah**

Pengambilan contoh tanah dapat dilakukan dengan beberapa cara tergantung pada tujuan dan sasaran yang ingin dicapai (Wollum 1994), yaitu cara: (i) bebas, (ii) sistematis atau random/acak, dan (iii) komposit. Selain itu, cara polar sampling atau *algorithm-orientated sampling* seperti yang diuraikan oleh Totsche (1995) untuk tujuan evaluasi tingkat pencemaran. Cara polar sampling ini tidak dibahas di dalam buku ini.

#### **1. Pengambilan contoh tanah secara bebas**

Pengambilan contoh tanah cara bebas hanya ditujukan untuk keperluan isolasi mikroba (contoh tanah atau tanaman sebagai sebagai sumber mikroba). Tempat 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.

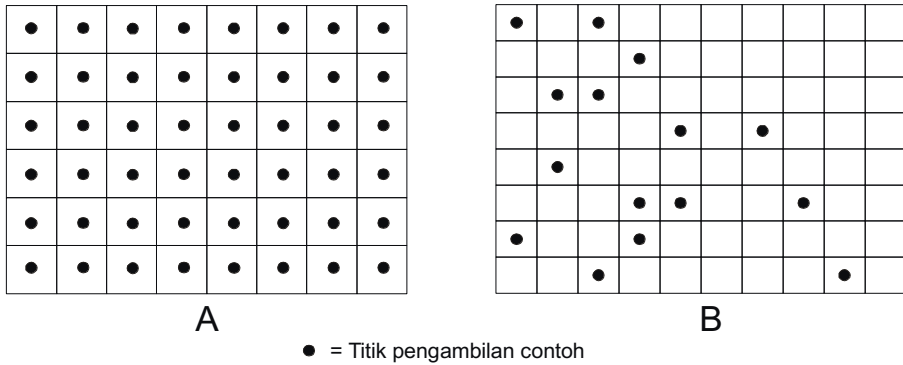
#### **2. Pengambilan contoh tanah secara sistematis dan random**

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

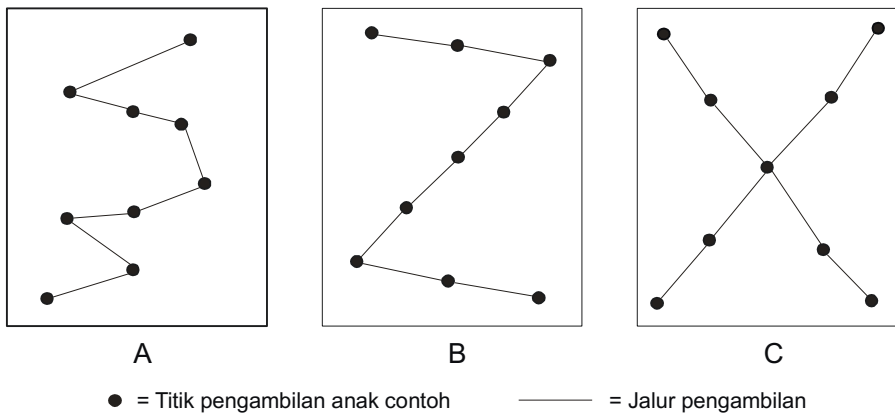
Pengambilan contoh secara sistematis, contoh tanah individu diambil di tiap areal kecil, sedangkan pada cara random hanya dilakukan di beberapa areal kecil yang dipilih secara acak (Gambar 1). Cara random lebih menghemat waktu dan biaya asalkan banyaknya contoh individu yang diambil memperhatikan heterogenitas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

#### **3. Pengambilan contoh tanah secara komposit**

Pengambilan contoh secara 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, zig-zak, 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 1. Pengambilan contoh tanah cara sistematis (A) dan cara random/ acak (B)



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

**Jumlah contoh**

Secara umum tujuan pengambilan contoh adalah untuk mendapatkan beberapa unit contoh dari suatu populasi pada tempat pengamatan dilakukan agar diperoleh 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.

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 atau horison tanah.

Ukuran (berat) tiap contoh tanah yang diperlukan tergantung pada banyaknya jenis analisis. Secara umum, 500 g tanah per contoh sudah cukup untuk keperluan isolasi dan analisis mikroba.

## **Alat, Bahan, dan Cara Pengambilan Contoh**

### **Alat dan Bahan**

- Sekop atau sendok tanah
- Bor tanah
- Kantong plastik contoh (plastik transparan)
- 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, dll).
- Khusus contoh tanah untuk trapping mikroba simbiosis seperti rhizobia, catat tanaman inang (legum) yang tumbuh di lokasi pengambilan contoh dan ambil contohnya untuk diidentifikasi.



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-rhizosfer

#### 1. Pengambilan contoh tanah non-rhizosfer (tanah bulk)

- Tanah non-rhizosfer merupakan bagian tanah tanpa akar ataupun tanah yang melekat pada akar (Gambar 3, pengambilan contoh tanah komposit non-rhizosfer).
- 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 laboratorium 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.

## 2. Pengambilan contoh tanah rhizosfer/rhizoplan

- Rhizosfer merupakan porsi tanah yang langsung dipengaruhi oleh akar tanaman, sedangkan rhizoplan adalah permukaan akar dengan tanah yang melekat kuat pada permukaannya. Batas rhizosfer 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, kemudian masukkan akar beserta tanah yang melekat ke dalam plastik, beri label, dan selanjutnya masukkan ke dalam kotak es (Gambar 4).
- Pengambilan contoh rhizosfer/rhizoplan kedua dari jenis tanaman yang berbeda dilakukan setelah semua peralatan bersih dan steril dengan cara seperti dijelaskan pada bagian Alat dan Bahan di atas.



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

## 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.

## Daftar Pustaka

- Foster JC. 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 GH, Wolf DC. 1997. Carbon transformation and soil organic matter formation, p 218-258. *In* Silvia DM, Fuhrmann JJ, Hartel PG, Zuberer DA (*Eds.*) *Principles and Applications of Soil Microbiology*. Prentice Hall. New Jersey.
- Wollum AG. 1994. Soil sampling for microbial analysis, p 1-14. *In* Weaver RW, Angle S, Bottomley P, Bezdicsek D, Smith S, Tabatabai A, Wollum A (*Eds.*) *Methods of Soil Analysis (Microbiological and Biochemical Properties)*. SSSA. Wisconsin, USA.

*Everything is everywhere and the milieu selects*

Beijerinck, the Father of Microbial Ecology

## 2.2

# ENUMERASI BAKTERI, CENDAWAN, DAN AKTINOMISETES

Rohani Cinta Badia Ginting, Erny Yuniarti, Selly Salma, Surono, Ratih Dewi Hastuti<sup>†</sup>

Tanah merupakan suatu ekosistem yang mengandung berbagai jenis mikroba dengan morfologi dan sifat fisiologi yang berbeda-beda (Pavao-Zuckerman 2008). 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 (Jacoby *et al.* 2017). 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 (Fierer & Jackson 2006). 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

<sup>†</sup>Sudah meninggal dunia

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

Sumber contoh	Rata-rata jumlah bakteri ( $\times 10^5$ Cfu mL <sup>-1</sup> )		
	<i>Peptonized milk-actidione agar</i> (PMA)	<i>Soil extract agar</i> dengan glukosa (SE)	<i>Trypticase soy agar</i> (TSA)
Tanah gurun			
- Iron Spring, Ariz	530	163	88
- Toyahvale, Tex	700	74	31
Tanah subur			
- Oak grove	97	33	48
- Halaman	67	16	
Padang rumput	650	340	55
Lumpur			
- Elbow Bayou	280	163	

\*) Sumber: Larkin (1972)

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.

Aktinomisetes adalah kelompok mikroorganisme yang berada di antara bakteri dan cendawan (Hesseltine 1960). 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 dan 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.

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

Tabel 2. Total aktinomisetes dan cendawan dari profil tanah braunerde, gley dan pseudogley dengan metode cawan hitung\*)

Keterangan	2% Malt extract agar	Rose bengal-Malt extract agar	Glycerol -Glycine-agar	Glucose-Asparagine agar	Oatmeal agar	
	Cendawan		Aktinomisetes			
Total	6,01	6,43	1,95	2,07	1,77	1,23

\*) Sumber: Ottow & Glathe (1968)

- Jumlah aktinomisetes dikalikan  $10^7$  yang mewakili jumlah aktinomisetes per g tanah kering oven. Jumlah cendawan dikalikan  $10^5$

cendawan yang lain, sehingga medium ini dapat dipilih untuk enumerasi cendawan dan aktinomisetes.

### 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°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.

### 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

$$KA = \{(BBk - BKk) / (BBk - k)\} \times 100\%$$

KA = kadar air contoh tanah (%)

BBk = berat basah tanah + berat kaleng (g)

BKk = berat kering tanah + berat kaleng (g)

k = berat kaleng (g)

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

### Enumerasi Total Bakteri, Cendawan, dan Aktinomisetes

#### Alat

- Botol serum besar
- Botol serum kecil
- Cawan Petri
- Pipet mikro dan tip ukuran 1 mL dan 200  $\mu$ L
- Batang penyebar (*spreader*)
- Vortex
- Timbangan

#### Bahan

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

Tabel 3. Media spesifik untuk pertumbuhan mikroba

Mikroba	Medium pertumbuhan
Bakteri	Medium nutrisi agar (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>
<i>Trichoderma</i> sp. dan <i>Gliocladium</i> spp	<i>Potato Dextrose Agar</i> yang dimodifikasi (Gli <i>et al.</i> 2009)
Aktinomisetes	<i>Rose bengal-malt extract agar</i> <i>Humic acid-vitamin agar</i> (HV agar) Media Küster + sikloheksamida+ natrium propionat (Gli <i>et al.</i> 2009)

- Medium nutrisi 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 larutan sikloheksamida (100 µg mL<sup>-1</sup>) yang telah disterilisasi dengan filter ukuran 0,2 µm 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
  - Campur 1 kg tanah dengan 1000 sampai 1500 mL akuades dalam tabung yang besar dan suspensi disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 0,1 MPa selama 30 menit sampai dengan 1 jam. Tambahkan 0.5 g kalsium karbonat atau kalsium sulfat, campur dan saring suspensi melalui beberapa lapis kertas saring. Ulangi penyaringan sampai diperoleh cairan bening. 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. Sterilisasi dan simpan dalam pendingin atau lemari es.
- Medium agar ekstrak tanah
  - Masukkan 20 g agar; 0,5 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 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 µL 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; 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.
- Medium *Potato Dextrose Agar* yang dimodifikasi (Gli et al. 2009)
  - Timbang 200 g kentang yang telah dikupas, dicuci bersih, dan diiris tipis-tipis, rebus dalam 1 L akuades sampai kentang matang dan lembut. Saring kaldu kentang dan masukkan ke dalam tabung Erlenmeyer, tambahkan akuades sampai volume 1 L pH 6,0. Tambahkan 20 g sukrosa, dan 20 g agar. Sterilisasi medium dengan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 0,1 MPa selama 15 menit. Tambahkan 0,3 g  $L^{-1}$  klorampenikol, streptomisin 0,1 g  $L^{-1}$ , rose bengal 0,02 g  $L^{-1}$  ke dalam medium steril suhu 40°C.
- Medium Küster yang dimodifikasi (Gli et al. 2009)
  - Timbang 10 g gliserol, 0,3 g kasein (tanpa vitamin), 2 g  $KNO_3$ , 2 g NaCl, 2 g  $K_2HPO_4$ , 0,05 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,02  $CaCO_3$ , 0,01 g  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , 20 g agar, 1 L akuades pH 7,0-7,2. Sterilisasi medium dengan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 0,1 MPa selama 15 menit. Tambahkan 0,1 g  $L^{-1}$  sikloheksamida, 0,4 g  $L^{-1}$  natrium propionat ke dalam medium steril suhu 40°C (Vargas et al. 2009).
- Larutan pengencer dapat menggunakan salah satu larutan berikut: 0.85% NaCl (garam fisiologis), larutan Ringer (takaran penuh atau seperempat takaran), larutan garam Winogradsky, natrium pirofosfat 0.1 % steril, garam bufer-fosfat, bufer fosfat dengan berbagai takaran, pepton-air, atau ekstrak tanah (Zuberer 1994).

- Garam fisiologis: larutkan 8.5 g NaCl dalam 1000 mL akuades.
- Larutan Ringer ("Krebs-Ringer") (Umbreit *et al.* 1972): larutkan 8.2 g NaCl, 4.18 g KCl, 3.32 g CaCl<sub>2</sub>, 1.9 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> dan 3.46 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O dalam 1000 mL akuades.
- Larutan garam Winogradsky (dimodifikasi oleh Dabek-Szreniawska & Hattori 1981): larutkan 3.8 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5.1 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 2.5 g NaCl dan 0.05 g masing-masing Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>·nH<sub>2</sub>O dan Mn<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>·4H<sub>2</sub>O dalam 1000 mL air deionisasi.
- 0.1% natrium pirofosfat: larutkan 0.1 % (b/v) natrium pirofosfat dalam akuades (Balkwill 1990).
- Garam bufer-fosfat: larutkan 1.18 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.22 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·1H<sub>2</sub>O dan 8.5 NaCl dalam 1000 mL akuades. Jika perlu sesuaikan kemasaman menjadi pH 7.2.
- Air-pepton: larutkan 1.0 g pepton dalam 1000 mL akuades. Pengencer ini mengandung sumber C yang dapat digunakan, jadi jangan membiarkan sampel dalam larutan ini terlalu lama untuk menghindari pertumbuhan sel.
- Ekstrak tanah (seperti yang dijelaskan di atas).

## Prosedur

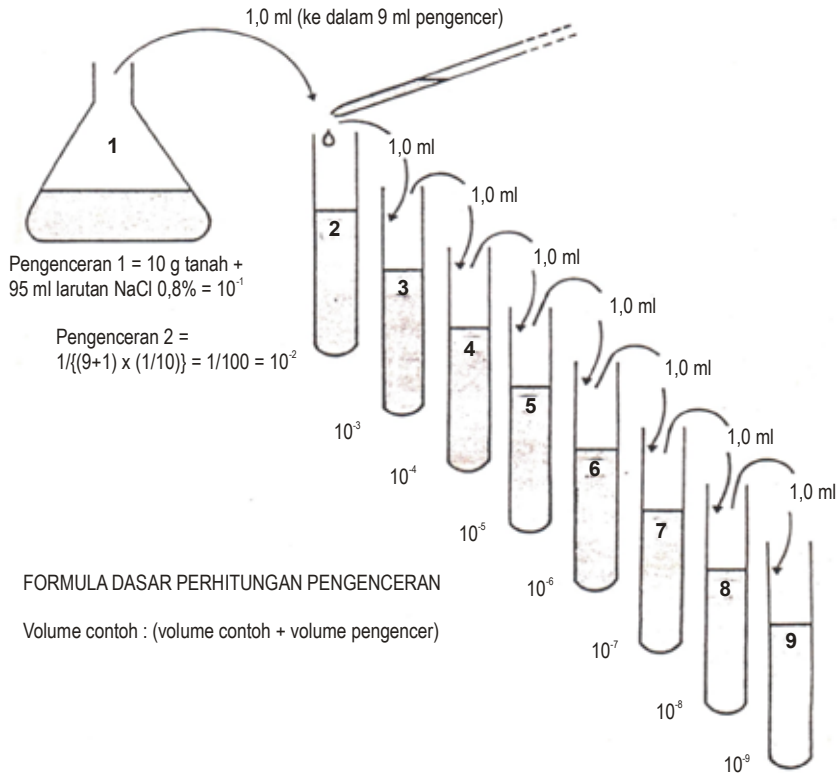
### 1. Pengenceran contoh tanah.

- Timbang 10 g tanah dan masukkan ke dalam botol bertutup yang berisi 95 mL larutan pengencer dan satu tetes tween 80 steril (Beberapa buku manual menggunakan 90 mL larutan pengencer). Lakukan beberapa ulangan untuk penentuan kadar air. Penentuan kadar air dilakukan sehingga jumlah mikroba dapat dihitung berdasarkan berat kering.
- Kocok selama 2 menit, lalu letakkan dalam shaker selama 2 jam dengan kecepatan 150-200 rpm, beri label pada botol pengenceran 10<sup>-1</sup>. Diamkan selama 30 detik, pindahkan 1 mL larutan tanah ke tabung reaksi yang berisi 9 mL larutan pengencer steril. Kocok dengan vortex, dan beri label pengenceran 10<sup>-2</sup>. Gunakan pipet yang baru pada setiap pemindahan 1 mL larutan. Pengenceran dilakukan sampai pada pengenceran 10<sup>-7</sup>.
- Catatan: Blanko pengencer disterilkan terlebih dahulu sebelum didistribusikan ke dalam tabung atau botol secara aseptik untuk menghindari kehilangan akibat penguapan selama proses sterilisasi dalam autoklaf (Koch 1981).

### 2. Penyebaran (*plating*) mikroba dapat dilakukan dengan beberapa teknik yaitu

#### a. Teknik sebar (*spread plate*)

- Pipet 0,1 mL larutan tanah pada pengenceran serial 10<sup>-4</sup>-10<sup>-7</sup> (bakteri), 10<sup>-2</sup>-



Gambar 1. Seri pengenceran

$10^{-5}$  (cendawan), dan  $10^{-3}$ - $10^{-6}$  (aktinomisetes) dan teteskan di bagian tengah cawan Petri pada permukaan agar. Setiap pengenceran diulang tiga kali (triplo). Pemindean dimulai dari pengenceran  $10^{-7}$ .

- Catatan: pilih kisaran 3-4 pengenceran yang diduga menghasilkan 30-300 biakan per cawan Petri.
- 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, satu set cawan Petri untuk setiap sampel (gunakan kode singkatan ID sampel, pengenceran, tanggal, dan media jika perlu). 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.
  - Catatan: media dalam cawan Petri sebaiknya dikeringkan terlebih dahulu sebelum diinokulasi untuk mengantisipasi kelembaban yang berlebihan (Clark 1971).

b. Teknik tuang (*pour plate*)

- Siapkan media biakan dalam jumlah yang cukup sesuai dengan cawan Petri yang digunakan untuk enumerasi mikroba. Sebagai contoh, untuk sampel dengan empat pengenceran dan tiga ulangan (15-20 mL per cawan Petri), maka dibutuhkan media 300-400 mL.
  - Inkubasi media padat yang masih cair dalam penangas air suhu 42-45°C.
  - 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 ke cawan Petri steril yang kosong. Setiap pengenceran diulang tiga kali (triplo) seperti yang telah diuraikan di atas.
  - Beri label di bagian pinggir tiap cawan Petri seperti diuraikan di atas.
  - Putar perlahan tabung atau botol yang berisi media dalam kondisi hangat agar media tercampur rata (tidak ada endapan), lalu tuang kira-kira 15-20 mL ke dalam cawan Petri yang berisi sampel hasil pengenceran.
  - Sebarkan inokulum dengan memutar cawan Petri di atas permukaan meja 3-5 kali dalam gerakan searah jarum jam kemudian 3-5 kali berlawanan arah jarum jam.
    - Catatan: Memutar tabung atau botol yang berisi media jangan terlalu kencang untuk menghindari media menjadi berbusa. Demikian juga pada waktu memutar cawan Petri berisi media dan sampel.
  - Diamkan media tersebut dan biarkan sampai mengeras.
    - Catatan: Teknik spread plate menghasilkan jumlah mikroba 70-80% lebih besar dari teknik tuang. Hal ini mungkin terjadi karena aerasi yang lebih baik memungkinkan pengembangan koloni yang lebih baik dan sel tidak mengalami kejutan termal (Clark 1971, Busta *et al.* 1984).
3. Penghitungan koloni.
- Bakteri dihitung hanya dari cawan Petri yang mempunyai 30-300 koloni, cendawan 10-100 koloni, dan aktinomisetes 30-300 koloni.

## Perhitungan

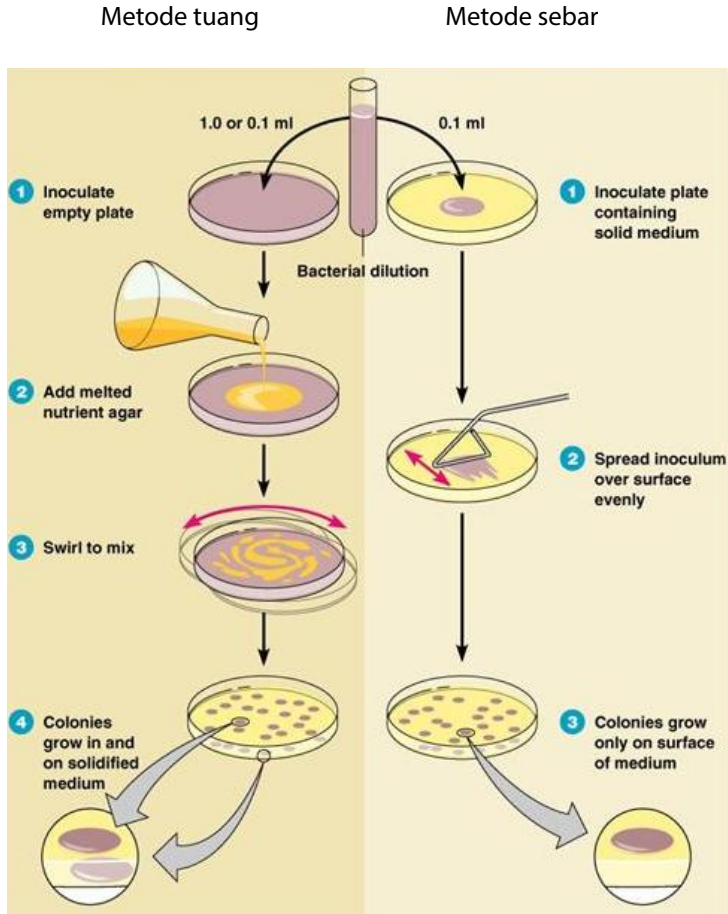
Total populasi (CFU)  $g^{-1}$  tanah kering = (jumlah koloni) x (fp)/bk tanah

## 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 penjelasan sebelumnya) sehingga berat kering contoh tanah yang digunakan adalah  $\{1 \times (1 - (25 / 100))\} g = 0,75 g$ . Dengan demikian total populasi adalah  $(65 \times 10^6) / 0,75 g = 8,7 \times 10^7$  CFU per g tanah kering.



Gambar 2. Penyebaran mikroba (Sumber: Tortora et al. 2013)

#### 4. Penambahan inhibitor ke dalam media biakan.

Untuk meningkatkan selektifitas media biakan terhadap kelompok mikroorganisme tertentu dapat dilakukan dengan penambahan antibiotik atau antimikroba lainnya seperti pewarna. Sebagai contoh, untuk menekan pertumbuhan fungi pada media biakan untuk enumerasi bakteri, media tersebut ditambah dengan sikloheksimida ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) yang dapat disterilkan dengan autoklaf atau dengan natamisin yang disterilkan dengan filter ( $21.6 \text{ mg L}^{-1}$ ) ditambahkan ke media yang didinginkan (Pedersen 1992). Bakteri gram positif dapat ditekan melalui penambahan penisilin ( $1-10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) atau vankomisin ( $15 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Sebaliknya, bakteri gram negatif dapat ditekan dengan menambahkan polimiksin B ( $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) ke media. Media yang digunakan untuk enumerasi fungi disuplementasi dengan streptomisin ( $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), aureomisin ( $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) atau klorampenikol ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), bakteriostatik spektrum luas untuk menekan

pertumbuhan bakteri. Rose bengal ( $30 \text{ mg L}^{-1}$ ) dapat digunakan sebagai bakteriostatik dan fungistatik terutama ditujukan untuk menghambat pertumbuhan mikroba yang tumbuh cepat.

## 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.

## Enumerasi Langsung dengan Mikroskop Epifluoresensi (Foght & Aislabie 2005)

### Prinsip

Larutan tanah dengan volume tertentu disaring menggunakan saringan ukuran pori 0,2  $\mu\text{m}$ . Mikroba yang terkumpul dalam saringan diwarnai dengan pewarna fluoresen dan dihitung menggunakan mikroskop epifluoresensi. Minimal 20 bidang pengamatan yang berisi 20-50 sel diamati dan jumlah total mikroba dihitung dari rata-rata pengamatan tersebut dan dibandingkan dengan volume larutan yang disaring. Enumerasi metode ini dapat menghitung total mikroba baik bakteri maupun fungi dan mikroba yang masih aktif maupun yang sudah mati. Pewarna fluoresen ada berbagai macam seperti acridine orange atau 4,6-diamino-2-phenylindole (DAPI) yang mewarnai sel-sel yang mengandung DNA. Pewarna untuk menghitung sel bakteri aktif dapat menggunakan redoks 5-cyano-2,3-ditoly tetrazolium chloride (CTC) (Créach et al. 2003). Pewarna yang dapat membedakan antara sel hidup dan sel mati yaitu kombinasi propidium iodida (PI) dan tiazol oranye (TO). Banyak tersedia kit perwarna komersial dengan instruksi khusus sesuai penggunaannya, seperti Live/Dead Kit BacLight (Molecular Probe, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

### Alat

- Membran filter ukuran pori 0,2  $\mu\text{m}$  untuk mensterilkan reagen
- Membran filter polikarbonat hitam ukuran pori 0,2  $\mu\text{m}$ , diameter 25 mm (sebagai contoh Millipore)
- Penahan filter 25 mm yang terdiri dari wadah kaca reservoir 15 mL dan wadah kaca fritted (dibungkus dan disterilkan), penjepit, dan labu vakum
- Penjepit filter berujung tumpul
- Pompa vakum dengan kontrol halus
- Kaca objek dan penutup yang sudah dibersihkan sebelumnya
- Mikroskop epifluoresensi dengan filter yang sesuai

### Reagen

- Semua larutan pengencer dan reagen dalam keadaan steril yang disterilisasi menggunakan membran filter ukuran pori 0,2  $\mu\text{m}$
- Pewarna fluoresen yang sesuai untuk sel target: misalnya, larutan stok DAPI (1 mg mL<sup>-1</sup>) dalam air deionisasi, diencerkan menjadi 1  $\mu\text{g}$  mL<sup>-1</sup> dalam air deionisasi yang disaring. Pewarna ini disimpan dalam keadaan gelap, terlindung dari cahaya.
- Larutan pencuci yang sesuai: misalnya larutan pencuci fosfat yang mengandung 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,85% NaCl dan 5 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O
- Minyak imersi non-fluoresen

## Prosedur

- Dari larutan tanah hasil serial pengenceran di atas, kocok larutan selama 5 menit lalu biarkan kira-kira 30 menit agar partikel tanah yang lebih besar mengendap. Jika sampel disimpan lebih dari 30 menit sebelum diamati, tambahkan pengawet (misalnya, formaldehida steril dengan konsentrasi akhir 3,7% atau glutaraldehida grade untuk mikroskop elektron konsentrasi akhir 2,5%).
- Letakkan membran filter hitam di penahan filter, cuci dengan 4 mL larutan pencuci fosfat, dan masukkan 0,1 mL suspensi tanah hasil pengenceran. Hindari partikel tanah yang mengendap. Langkah selanjutnya dilakukan dalam kondisi tanpa cahaya terutama untuk pewarna peka cahaya seperti DAPI.
- Tambahkan 1 mL pewarna (mis. DAPI) ke dalam sampel yang ada dalam reservoir kolom dan biarkan dalam kondisi gelap selama 7-10 menit pada  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ .
- Saring perlahan larutan tanah membran dalam kondisi vakum. Bilas perlahan sisi kolom reservoir dengan pengencer (2-3x volume awal) dan biarkan filter mengering.
- Letakkan setetes minyak imersi pada kaca objek, letakkan membran filter di atasnya, dan tutup dengan kaca penutup. Teteskan minyak imersi di atas kaca penutup dan amati di bawah mikroskop epifluoresensi pada panjang gelombang dan filter yang sesuai.
- Hitung setidaknya 20 bidang pengamatan yang berisi 20-50 sel dan dilakukan secara acak. Hindari pengamatan di bagian tepi.
- Blanko yang hanya berisi reagen diamati pada interval tertentu, paling tidak pada awal dan akhir penghitungan sampel. Blanko biasanya berisi <5% dari total kepadatan mikroba dalam sampel dan perhitungan jumlah total mikroba harus dikurangi dari jumlah sampel blanko.

## Perhitungan

Total populasi (CFU)  $\text{g}^{-1}$  tanah basah =  $(\text{JSD}/\text{JBP}) \times (\text{TLM}/\text{BK})$

JSD = Jumlah sel yang diamati

JPB = Jumlah bidang pengamatan

TLM = Total luas membran

BK = Berat kering tanah dalam filter

- Contoh: Luas bidang pengamatan =  $0,01 \text{ mm}^2$ , luas membran filter yang diwarnai =  $\pi r^2 = 176,8 \text{ mm}^2$  (diameter area membran filter yang tertutup filtrat pewarnaan = 15 mm), Jumlah total 20 bidang pengamatan dengan

0,1 mL pengenceran  $10^{-3} = 929$ , umlah total dalam 20 bidang pengamatan blanko reagen = 40, Berat tanah basah pada filter = 0,1 mL pengenceran  $10^{-3} = 10^{-4}$  g. Dengan demikian total populasi adalah  $\{(929 - 40) / 20\} \times (176,8 / 0,01) \times (0,75 / 10^{-4}) \times = 5,9 \times 10^9$  CFU per g tanah kering.

### Daftar Pustaka

- Balkwill DL. 1990. Deep-aquifer microorganisms. p. 183-211. *In* Labeda DP. (Ed.) Isolation of biotechnological organisms from nature. McGraw-Hill Publ. Co., New York.
- Busta FF, Peterson EH, Adams DM, Johnson MG. 1984. Colony count methods. p. 62-83. *In* Speck ML. (Ed.) Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Am. Publ. Health Assoc., Washington, DC.
- Clark DS. 1971. Studies on the surface plate method of counting bacteria. *Can. J. Microbiol.* 17: 943-946.
- Créach V, Baudoux A-C, Bertru G, Le Rouzic B. 2003. Direct estimate of active bacteria: CTC use and limitations. *J. Microbiol. Methods* 52(1): 19-28.
- Dabek-Szreniawska M, Hattori T. 1981. Winogradsky's salts solution as a diluting medium for plate count of oligotrophic bacteria in soil. 1. *Gen. Appl. Microbiol.* 27: 517-518.
- Fierer N, Jackson RB. 2006. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *PNAS* 103(3): 626-631.
- Foght J, Aislabie J. 2005. Enumeration of Soil Microorganisms. *In* Margesin R, Schinner F. (Eds). *Soil Biology, Volume 5. Manual for Soil Analysis.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Gil SV, Pastor S, March GJ. 2009. Quantitative isolation of biocontrol agents *Trichoderma* spp., *Gliocladium* spp. and actinomycetes from soil with culture media. *Microbiol. Res.* 164(2): 196-205.
- Hesseltine CW. 1960. Relationships of the Actinomycetales, *Mycologia* 52(3): 460-474.
- Jacoby R, Peukert M, Succurro A, Koprivova A, Kopriva S. 2017. The role of soil microorganisms in plant mineral nutrition-Current knowledge and future directions. *Front. Plant Sci.* 8: 1617.
- Koch AL. 1981. Growth measurement. p. 179-207. *In* Costilow RN. (Ed.) *Manual of methods for general bacteriology.* Am. Soc. Microbiol. Washington, DC.
- Larkin JM. 1972. Peptonized milk as an enumeration medium for soil bacteria. *Appl. Microbiology.* 23 (5): 1031-1032.
- Ottow JCG, Glathe H. 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.
- Pavao-Zuckerman MA. 2008. Soil Ecology. p. 3277-3283, *In* Jørgensen SE, Fath BD. (Eds), *Encyclopedia of Ecology.* Academic Press.
- Pedersen JC. 1992. Natamycin as a fungicide in agar media. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 1064-1066.
- Skinner FA, Jones PCT, Mollison JE. 1952. A comparison of a direct and plate counting

- technique for quantitative estimation of soil microorganisms. *J. Gen. Microbiol.* 6: 261-271.
- Tortora GJ, Funke BR, Case CL. 2013. *Microbiology: An Introduction*. 11th Edition, Pearson Benjamin Cummings, San Francisco.
- Umbreit WW, Burris RH, Stauffer JF. 1972. *Manometric and biochemical techniques*. 5th ed. Burgess Publ. Co., Minneapolis.
- Zuberer DA. 1994. Recovery and enumeration of viable bacteria. *In* Weaver RW, Angle S, Bottomley P, Bezdicek D, Smith S, Tabatabai A, Wolum A. (Eds.), *Methods of Soil Analysis: Part 2 - Microbiological and Biochemical Properties*. pp. 119–144. WI: Soil Science Society of America.

*Living cells are self-regulating chemical engines, tuned to operate on the principle of maximum economy*

A. L. Lehninger

## 2.3

# BAKTERI PENAMBAT NITROGEN HIDUP BEBAS

Etty Pratiwi, Ratih Dewi Hastuti †

Nitrogen ( $N_2$ ) merupakan unsur hara yang paling vital bagi pertumbuhan dan produktivitas tanaman. Meskipun ada sekitar 78%  $N_2$  di atmosfer, tanaman tidak dapat memanfaatkan nitrogen atmosfer ini secara langsung. Satu-satunya sistem alami yang dapat menambat  $N_2$ , lalu mereduksi  $N_2$  tersebut menjadi  $NH_3$  adalah enzim nitrogenase yang hanya dimiliki oleh domain archaea dan bakteri (Young 1992).

Bakteri dan archaea memiliki gugus gen *nif* (*nitrogen fixation*) penyandi enzim nitrogenase dan protein lain yang diperlukan untuk fiksasi nitrogen (Li & Chen 2020). Mikroba yang mampu mengasimilasi dan memfiksasi nitrogen atmosfer ( $N_2$ ) disebut diazotrof. Diazotrof terbagi menjadi dua kelompok, yakni: (i) diazotrof yang bersimbiosis dengan organisme atau tanaman lain, dan (ii) diazotrof yang hidup bebas di tanah.

Sistem enzim nitrogenase sangat sensitif terhadap oksigen. Kebanyakan nitrogenase tidak aktif secara ireversibel bila konsentrasi  $O_2$  yang tinggi. Pada konsep bakteri diazotrof aerobik yang berada di sekitar perakaran tanaman mampu menggunakan molekul  $N_2$  sebagai sumber nitrogen untuk pertumbuhannya. Pada umumnya bakteri 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 seperti *Azospirillum* yang termasuk diazotrof aerobik, mempunyai ciri khusus yakni bersifat mikroaerofilik yang 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 berlendir atau *gummy* (polisakarida ekstraselular) pada media agar bebas nitrogen yang berfungsi sebagai penghalang (*barrier*), sehingga bagian dalam koloni terbebas dari oksigen.

Bakteri yang hidup bebas dan mempunyai kemampuan menambat nitrogen dari udara banyak ditemukan hampir di tiap relung ekologi tanah, biasanya berasosiasi dengan tanaman, sistem perairan, dan sedimen (Knowles 1982). Bab ini memberikan gambaran singkat tentang isolasi, penapisan dan identifikasi bakteri penambat  $N_2$  hidup bebas di rhizosfer dan sudah banyak dikenal dan digunakan sebagai pupuk hayati seperti *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Azoarcus*, *Beijerinckia*, *Deroxia* (*Burkholderia*), *Desulfovibrio*, *Herbaspirillum*, dan bakteri endofitik diazotrof *Gluconoacetobacter*.

† Sudah meninggal dunia

## Isolasi dan Penapisan *Azotobacter* (Krieg & Dobereiner 1984)

*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

#### 1. Media LG

- Timbang 20,0 g sukrosa, 0,05 g  $K_2HPO_4$ , 0,15 g  $KH_2PO_4$ , 0,01 g  $CaCl_2$ , 0,20 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,01 g  $FeCl_2$ , 2 mL Bromtimol biru (0,5% larutan dalam etanol), 1 g  $CaCO_3$ , 15 g agar, dan akuades 1000 mL pH (at 25°C):  $7,0 \pm 0,2$

#### 2. Media Waksman No. 77

- Timbang 10,0 g manitol, 5 g  $CaCO_3$ , 0,5 g  $KH_2PO_4$ , 0,2 g NaCl,  $FeCl_3$  (sekelumit),  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$  (sekelumit), 15 g agar, akuades 1000 mL pH (at 25°C):  $7,0 \pm 0,2$

#### 3. Media Mannitol Ashby

- Timbang 20,0 g manitol, 0,2 g  $K_2HPO_4$ , 0,2 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,2 g NaCl, 0,1 g  $K_2SO_4$ , 5,0 g  $CaCO_3$ , 15 g agar, dan akuades 1000 mL pH (at 25°C):  $7,4 \pm 0,2$

**Prosedur:**

- Tuang media seleksi bebas N (Ashby, Waksman No. 77, atau media LG) ke dalam cawan Petri steril dan biarkan hingga memadat.
- Tambahkan 10 g contoh tanah lainnya ke dalam blanko air 90 mL, kocok selama 20-25 menit di atas magnetic shaker.
- Buat pengenceran serial sampel ini melalui blanko air steril.
- Tambahkan 100 mL masing-masing pengenceran pada cawan agar, lalu disebar secara merata dan inkubasi pada suhu 28°C selama 3-4 hari.
- Koloni *Azotobacter* tampak sebagai koloni datar, lunak, mukoid dan seperti susu.

**Ulasan**

*Azotobacter* adalah bakteri penambat nitrogen aerobik non-simbiosis, hidup bebas. Pada umumnya sel bersifat gram negatif, polimorfik, membentuk kista dan mengakumulasi poli-hidroksibutirat (PHB) dan menghasilkan gum yang melimpah. Selain fiksasi N, *Azotobacter* mengeluarkan hormon pertumbuhan tanaman yaitu: *Indole Acetic Acid* (IAA), *Gibberellic Acid* (GA) dan faktor pertumbuhan yaitu, tiamin, riboflavin dan menghasilkan beberapa antibiotik antijamur juga. Total enam spesies diidentifikasi berdasarkan pigmentasi yang dihasilkan (Jiménez *et al.* 2022), yaitu:

1. *A. chroococcum* menghasilkan pigmen hitam (melanin)
2. *A. vinelandii* menghasilkan pigmen kuning
3. *A. beijerinckii* menghasilkan pigmen kuning hijau fluorescen
4. *A. insignis* menghasilkan pigmen kuning - coklat
5. *A. macrocytogenes* menghasilkan pigmen pink
6. *A. paspali* menghasilkan pigmen fluorescen pink kehijauan

*A. chroococcum* merupakan spesies dominan yang ditemukan di tanah tropis.

**Isolasi dan Penapisan *Azospirillum* (Okon *et al.* 1977b, Reinhold *et al.* 1987, Khammas *et al.* 1989, Dobereiner 1992)**

*Azospirillum* spp. merupakan bakteri tanah, tetapi beberapa di antaranya banyak terdapat di rhizosfer dan ada strain tertentu yang mampu menginfeksi akar atau batang pada berbagai tanaman (Dobereiner 1992). Ada lima species *Azospirillum* yang mempunyai sifat fisiologis berbeda, yaitu *A. brasilense*, *A. liporerum*, *A. amazonense*, *A. irakense* dan *A. balopraeferans*. Untuk mengisolasinya digunakan media semi-padat bebas nitrogen karena bakteri ini mempunyai karakteristik aerotaktik, yaitu berpindah dari suatu tempat di dalam media 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.

### Media dan Larutan

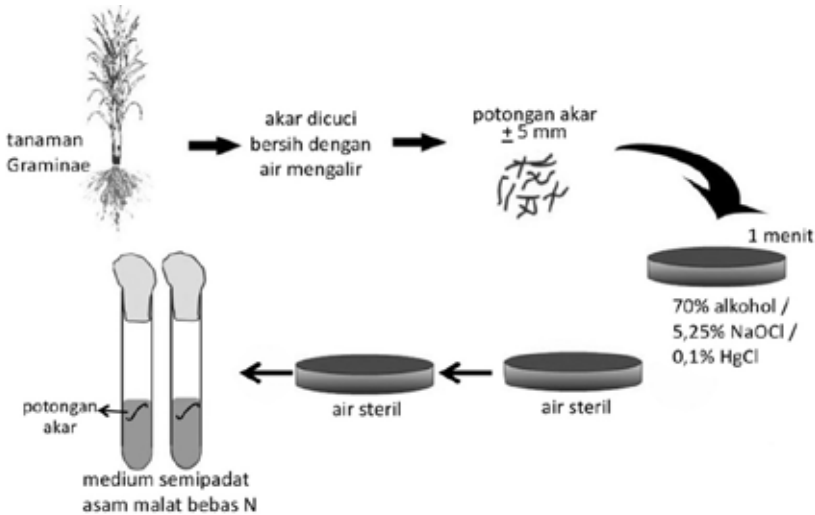
- Media Nfb semi-padat
  - Timbang 5 g asam malat, 0,5 g  $K_2HPO_4$ ; 0,2 gr  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,1 g NaCl, 0,02 g  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ , 2 mL larutan unsur mikro; 2 mL bromtimol biru (0,5% larutan dalam 0,2 M KOH); larutan FeEDTA 1,64%; 1 mL larutan vitamin; dan 1,75 g agar. Tambahkan akuades sampai volume media 1.000 mL, atur pH menjadi 6,8 dengan KOH.
- Larutan unsur mikro
  - Timbang 0,4 g  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ , 0,12 g  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ , 1,40 g  $H_3BO_3$ , 1 g  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$  dan 1,5 g  $MnSO_4 \cdot H_2O$ . 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).
- Media 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. Tambahkan akuades sampai volume media 1.000 mL, atur pH menjadi 6,8.
- Media semi-padat untuk isolasi *A. amazonese* (media 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  $FeCl_2$ ; BTB atau bromo-timol biru (larutan 0,5% dalam KOH 0,2M), 5 g sukrosa, dan 1,8 g agar. Tambahkan akuades sampai volume 1.000 mL, atur pH menjadi 6,0.
- Media semi padat N-free malic acid (Asam malat bebas N) untuk mengisolasi *Azospirillum* dari potongan akar
  - Timbang 5,0 g asam malat, 4,0g KOH, 0,5g  $K_2HPO_4$ , 0,2g  $MgSO_4$ , 0,1g NaCl, 0,2g  $CaCl_2$ , 4.0 mL Fe-EDTA (1,64% w/v), 2,0 mL larutan trace element, 2,0 mL BTB (0,5% larutan etanol), 1,75 g agar. Tambahkan akuades sampai 1000 mL, atur pH menjadi 6,8.
  - Larutan *trace element*: timbang 200 mg  $NaMoO_4$ , 235 mg  $MnSO_4$ , 280 mg  $H_3BO_3$ , 8 mg  $CuSO_4$ , 24 mg  $ZnSO_4$ . Tambahkan akuades hingga volume 200 mL.

### Prosedur

- Sampel Tanah
  - 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 media seleksi Nfb semi padat (sebanyak lima ulangan per seri pengenceran), dan inkubasi selama 3 - 5 hari hingga terbentuk pelikel berbentuk pelikel berwarna putih.
  - Amati pertumbuhannya, isolasi pelikel dan gores pada media agar yang sama tetapi diberi agar  $15 \text{ g L}^{-1}$  dan tambahkan  $0,02 \text{ g yeast extract}$ . 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 media kentang.
  - Setelah inkubasi, koloni kecil, keriting dan kering akan muncul dan berubah agak merah muda setelah 1 minggu. Kemudian pindahkan ke media semi padat Nfb dalam botol kecil untuk identifikasi di bawah mikroskop.
- Sampel Akar
- Siapkan media asam malat semi padat dalam tabung reaksi bervolume 5 mL dan sterilkan  $121^{\circ}\text{C}$  (15 psi) selama 15 menit.
  - Kumpulkan sampel akar segar dari tanaman Graminae
  - Cuci akar dengan air keran untuk menghilangkan partikel tanah.
  - Dengan menggunakan pisau yang sudah disteril, potong akar kecil-kecil berukuran 5 mm - 1 cm.
  - Sterilkan permukaan akar dengan merendamnya dalam etanol 70% atau merkuri klorida 0,1% atau NaOCl 5,25% selama 1 menit.
  - Cuci potongan akar dengan akuades steril 3-4 kali untuk menghilangkan residu etanol atau merkuri klorida.
  - Dengan menggunakan forsep steril, pindahkan 2-3 potongan akar secara aseptik ke tabung reaksi berisi media asam malat semi padat bebas N.
  - Inkubasi tabung pada suhu kamar  $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$  selama 2-3 hari.
  - Pertahankan satu tabung sebagai kontrol tanpa potongan akar.
  - Apabila pelikel telah terbentuk, kultur digoreskan menggunakan metode kuadran pada media Nfb padat yang mengandung ekstrak khamir, amonium klorida dan congo red (Okon *et al.* 1977). Koloni yang tumbuh terpisah dan menunjukkan morfologi koloni yang berbeda diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000 kali. Koloni-koloni yang terdiri atas sel yang berbentuk spiral diinokulasikan ke dalam media semipadat Nfb. Setelah diinkubasi, pelikel yang terbentuk diamati dan biakan disimpan pada media agar miring.



Gambar 1. Isolasi *Azospirillum* menggunakan sampel potongan akar tanaman Graminae

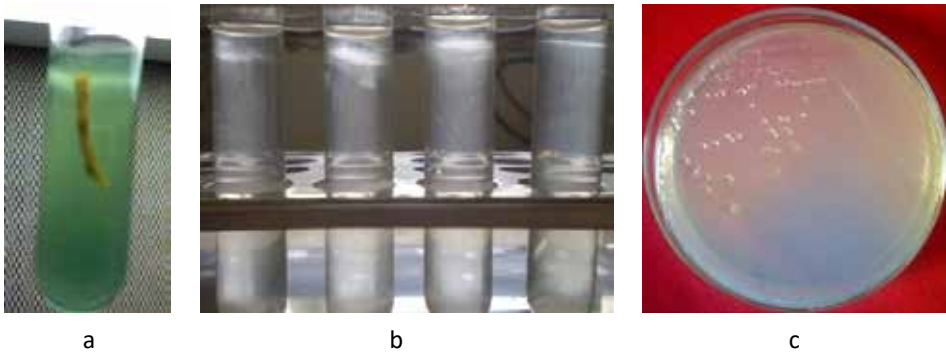
Sel *A. brasilense* bersifat sangat motil, berbentuk kurva batang mengarah ke bentuk spiral. Sedangkan pada sel *A. lipoferum* biasanya warna media berubah dari warna semula kuning menjadi biru (alkalin), dan berubah menjadi bentuk pleomorfik.

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 media basa tetapi dengan modifikasi: atur pH menjadi 8,5; tambahkan 1,2% NaCl, dan inkubasi cawan Petri pada suhu 41°C. Sedangkan *A. amazonense* bagus diisolasi pada media sukrosa semi-padat. Setelah inkubasi selama 3-5 hari pada suhu 35°C akan terbentuk pelikel, kemudian goreskan pelikel tersebut pada media LGI yang mengandung 0,02 g *yeast extract*. Bentuk sel biasanya kecil, putih, koloni keriting, hampir sama dengan *Azospirillum* spp. yang lainnya. Ini terbentuk setelah 5 hari inkubasi dan cek lagi di media semi-padat LGI untuk ketergantungan nitrogen tanpa produksi asam (media berwarna hijau). Pemurnian dilakukan dengan menggoreskannya pada media agar kentang yang mengandung sukrosa dan malat. Pada media 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.

## 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 disebabkan karena bakteri *Azospirillum* mengikat  $N_2$  dari udara



Gambar 2. Pelikel pada media semi padat Nfb (Gambar a dan b) dan koloni *Azospirillum* sp. pada media padat Nfb (Gambar c)

dan membentuk  $\text{NH}_4^+$  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  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

### Isolasi dan Identifikasi *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Sowmiya & Mahadevaswamy 2022)

*Gluconacetobacter diazotrophicus* (sama dengan *Acetobacter diazotrophicus*) merupakan bakteri Gram-negatif yang dikelompokkan dalam famili Acetobacteraceae yang termasuk dalam filum *proteobacteria*. *G. diazotrophicus* merupakan bakteri penghasil asam asetat, sehingga bakteri ini dikenal toleran terhadap asam. Awalnya diisolasi dari bagian tanaman tebu dan juga telah diisolasi dari rerumputan seperti jagung, gandum, dan padi serta dari tanaman seperti kopi, nanas, dan wortel.

Bakteri endofit ini dilaporkan berada dalam cairan apo-plastik tanaman, terutama di mana gula mungkin bebas dalam apoplas. Sumber karbon yang mendukung pertumbuhan terbaik *G. diazotrophicus* adalah sukrosa pada 10%, dan lebih suka tumbuh bahkan pada sukrosa konsentrasi tinggi (30%). Karena endofit ini tidak dapat mengangkut atau merespirasi sukrosa, levansukrase, maka enzim ekstraseluler disekresikan untuk pertumbuhannya yang menghidrolisis sukrosa menjadi fruktosa dan glukosa.

*G. diazotrophicus* diketahui merupakan diazotrof yang memfiksasi nitrogen dalam kondisi mikroaerofilik, yang dapat diisolasi dengan media semi-padat LGI menggunakan sumber karbon sukrosa atau gula tebu dengan konsentrasi 100 g L<sup>-1</sup> dan konsentrasi agar ditingkatkan menjadi 2 g. Pengaturan pH 5,5 dilakukan melalui

penambahan asam asetat. Dalam media 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 media di bawahnya menjadi tidak berwarna yang disebabkan asimilasi bromtimol biru oleh bakteri. Kemudian dimurnikan pada media yang sama di cawan Petri (dengan 20 g agar L<sup>-1</sup>). Setelah inkubasi selama 1 minggu, muncul koloni kecil berwarna oranye gelap dan basah. Koloni ini mudah dikenali dan dimurnikan pada media agar kentang yang mengandung 10% gula tebu (tidak menggunakan malat). Pada media kentang, koloni akan terbentuk setelah 1 minggu inkubasi dengan warna coklat gelap.

### Bahan

- Sampel akar atau batang
- 0,1% HgCl<sub>2</sub> dan 70% etanol (untuk sterilisasi permukaan).
- Asam asetat glasial (untuk mengatur pH).

### Media

- Media semi solid LGI bebas N
  - Timbang 0,2 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,6 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,2 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,02 g CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0,002 g Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0,01 g FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, 5 mL Bromothymol blue 0,5% dalam 0,2 N KOH, 2,0 g agar; 100 g gula tebu kristal dan akuades hingga 1000 mL, pH 5,5.
- Media padat LGI
  - Media semi padat LGI diasamkan dengan asam asetat hingga pH mencapai pH 4,5 dan dosis agar ditambah menjadi 20 g L<sup>-1</sup>.
- Media *Potato Sucrose Agar*
  - Kentang kupas 200,0 g; 100,0 g sukrosa, 20,0 g agar, akuades sampai 1000 mL, pH 5,5.
  - Rebus kentang kupas selama 30 menit dalam 1000 mL air, lalu disaring dan dicampur dengan bahan lain pada butir di atas.
- Media GYC (*Glucose–Yeast extract–CaCO<sub>3</sub>*)
  - 100 g glukosa, 10 g yeast extract 10 g, 20 g CaCO<sub>3</sub>, dan 20 g agar 20 g, pH 5,5.
- Media YEC (*Glucose–Yeast extract–Ethanol–CaCO<sub>3</sub>*)
  - 10 g yeast extract, 20 g CaCO<sub>3</sub>, 30 mL etanol, 20 g agar, pH 5,5.

### Prosedur

- Cabut tanaman yang sehat dan kumpulkan akar segarnya. Cuci dengan air keran yang mengalir.
- Sterilkan permukaan dengan 0,1% HgCl<sub>2</sub> selama 30 detik diikuti dengan

pencucian dengan akuades dan kemudian dengan 70% etanol selama 1 menit dan segera cuci dengan akuades sebanyak 3-4 kali berulang kali. sampai tidak tersisa residu  $\text{HgCl}_2$  dan etanol.

- Timbang sampel dan homogenkan dengan larutan sukrosa steril (1%) menggunakan alu dan mortar.
- Inokulasikan tabung berisi media LGI semi padat menggunakan 0,5 mL aliquot.
- Inkubasi pada suhu  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  selama 6-7 hari. Amati terbentuknya pelikel bawah permukaan berwarna oranye-kuning di dalam tabung.
- Tumbuhkan bakteri berwarna jingga kekuningan tersebut pada media padat LGI.
- Inkubasi selama 7 hari pada suhu  $28^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ . Setelah inkubasi, pilih dan murnikan koloni oranye.
- Simpan biakan murni galur sebagai stok gliserol pada suhu  $-20^\circ\text{C}$  untuk studi lebih lanjut.

#### **Karakterisasi Morfologi dan Biokimia**

- Lakukan pewarnaan menggunakan teknik pewarnaan Gram dan uji biokimia sesuai protokol standar.
- Amati motilitas menggunakan metode penusukan pada media semi padat sesuai prosedur standar.
- Bandingkan hasil dengan hasil *G. diazotrophicus* (Tabel 1).

#### **Ulasan**

*Gluconacetobacter diazotrophicus* merupakan bakteri pengikat nitrogen endofitik. Bakteri ini tidak dapat diisolasi dari tanah (Calvante & Dobereiner 1988, Gillis *et al.* 1989). Kolonisasi endofit ini terutama pada monokotil dengan preferensi khusus pada tanaman yang memiliki konsentrasi sukrosa tinggi. Bakteri *G.diazotrophicus* dilaporkan memiliki sifat pemacu pertumbuhan tanaman dan juga aktivitas biokontrol. Media yang dilengkapi dengan gula tebu umumnya digunakan untuk isolasi *G. diazotrophicus* dari akar tanaman.

Catatan:

- Sesuaikan pH media menggunakan asam asetat glasial.
- Tambahkan sikloheksimida ke dalam media untuk menghindari pertumbuhan jamur.
- Gunakan media yang baru disiapkan untuk hasil yang lebih baik.

#### **Isolasi *Herbaspirillum* (Calvalcante & Dobereiner 1988, Dobereiner 1992)**

*Herbaspirillum* spp. merupakan bakteri endofit tanaman obligat atau hanya dapat diisolasi dari tanaman inang. Baru-baru ini ditemukan bahwa bakteri ini lebih banyak ke arah efisiensi penambatan nitrogen yang menghasilkan pertumbuhan

Tabel 1. Karakteristik *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Rao & Savalgi 2017)

Karakteristik	Hasil
Gram staining	Negatif
Motilitas	Positif
Endospora	Negatif
Media semi padat LGI bebas N pH 4.5	Terbentuk pelikel berwarna kuning di bawah permukaan media
Potato sucrose agar	Koloni berwarna coklat
Media agar GYC	Terbentuk pigmen coklat yang larut dalam air
Media agar YEC	Presipitasi CaCO <sub>3</sub> dan over oksidasi etanol
Pertumbuhan pada 30% sukrosa	Positif
Katalase	Positif
Oksidase	Negatif
Hidrolisis Gelatin	Negatif
Hidrolisis Starch	Negatif
Aktivitas Selulase	Negatif
Pembentukan H <sub>2</sub> S	Negatif
Reduksi nitrat	Negatif

tanaman yang lebih baik, khususnya di daerah tropik. *H. seropedicae* banyak dijumpai di rhizosfer 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.

### Bahan

- Media semi-padat JNFb (isolasi *Herbaspirillum* spp., *H. seropedicae* dan *H. rubrisubalbicans*):
  - D,L-asam malat 5 g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,5 g; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,2 g; NaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>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, aur 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 menggunakan media semi padat JNFb, biasanya diperoleh dari pengenceran  $10^{-2}$  -  $10^{-6}$ .
- Pertumbuhan *Herbaspirillum* spp. dalam media 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  $\mu\text{m}$ ), 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 yeast extract 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.

## Isolasi dan Identifikasi *Beijerinckia* (Gamit & Amaesan 2022)

Genus *Beijerinckia* awalnya diisolasi dari tanah masam (pH 4,5, 4,9, dan 5,2). Belakangan genus *Beijerinckia* ditemukan secara luas di tanah tropis asam Afrika, Amerika Selatan, dan Asia Selatan. Strain *Beijerinckia* juga dilaporkan di netral, basa, abu vulkanik asam, tanah tergenang air, dan tanah non-tropis.

*Beijerinckia* termasuk bakteri Gram-negatif, memiliki sel batang lurus sedikit melengkung sekitar  $0,5\text{--}2,0 \times 1,6\text{--}4,5 \mu\text{m}$  atau kadang-kadang berukuran  $3,0 \times 5,6\text{--}6,0 \mu\text{m}$ . *Beijerinckia* merupakan bakteri aerobik, motil oleh flagela peritrichous, dapat menambat  $\text{N}_2$  di bawah kondisi aerobik atau mikroaerobik, suhu pertumbuhan optimum pada  $20\text{--}30^\circ\text{C}$  dan tidak ada pertumbuhan pada  $37^\circ\text{C}$ .

Pada media agar (kondisi memfiksasi  $\text{N}_2$ ) menghasilkan koloni yang halus dan berlendir. Bakteri *Beijerinckia* adalah katalase-positif, mengoksidasi menjadi  $\text{CO}_2$ , dan memanfaatkan glukosa, fruktosa, dan sukrosa. Spesies *Beijerinckia* umumnya terbatas pada tanah asam di daerah tropis, mereka adalah bakteri yang tumbuh relatif lambat. Spesies *Beijerinckia* melimpah di filosfer tanaman tropis. Untuk isolasi genus *Beijerinckia* digunakan media selektif dan pengayaan asam bebas nitrogen, pH rendah. Media

ini mendukung pertumbuhan spesies *Beijerinckia* dan menghambat pertumbuhan organisme lain, terutama spesies *Azotobacter*.

### **Isolasi Spesies *Beijerinckia* dari Tanah**

#### **Media Pengaya**

- Timbang 20,0 g glukosa, 1,0 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . Tambahkan akuades sampai volume 1.000 mL, atur pH 5,0.

#### **Media agar mineral glukosa bebas nitrogen**

- Timbang 20 g glukosa, 0,2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,8 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,5 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,0025 g atau 0,05 g  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,005 g  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,05 g  $\text{CaCl}_2$ . Tambahkan akuades sampai volume 1.000 mL, atur pH 6,9.

#### **Prosedur**

- Siapkan media lapisan tipis (2–3 mm) ke dalam cawan Petri (lapisan tipis akan memungkinkan tersedianya  $\text{O}_2$  untuk menghambat perkembangan bakteri anaerobik *Clostridium pasteurianum* penambat nitrogen dan bakteri penambat dinitrogen anaerob fakultatif).
- Inokulasi 0,5 g tanah sebagai sumber inokulan, kemudian inkubasi pada suhu  $30^\circ\text{C}$  selama lebih dari seminggu.
- Setelah inkubasi, periksa kultur pengayaan secara mikroskopis untuk keberadaan sel *Beijerinckia* yang khas (batang tumpul dengan dua badan lipid di setiap ujung sel).
- Setelah konfirmasi sel *Beijerinckia* berdasarkan pemeriksaan mikroskopis, letakkan biakan pada media agar mineral bebas nitrogen.

### **Isolasi Spesies *Beijerinckia* dari Filosfer**

- Kumpulkan sampel daun dan rendam dalam lapisan dangkal media pengayaan cair di cawan Petri.
- Inkubasi cawan Petri pada suhu  $30^\circ\text{C}$  selama lebih dari 2 minggu.
- Setelah inkubasi, pilih koloni untuk pemurnian berdasarkan karakteristik koloni (morfologi koloni: sangat menonjol, lendir keras, dan koloni berkilau sangat elastis).
- Gunakan media agar mineral bebas nitrogen (seperti dijelaskan di atas) untuk pemurnian *Beijerinckia*. (Media harus berada pada pH netral atau basa dengan  $\text{CaCO}_3$  (1 atau 2% b/v) (lihat Catatan butir 2).

### **Identifikasi Bakteri *Beijerinckia***

Lakukan pewarnaan dan uji biokimia sesuai protokol standar (Tabel 2).

Tabel 2. Karakteristik diferensial dari spesies *Beijerinckia*

Karakteristik	<i>B. derxii</i>	<i>B. indica</i>	<i>B. doebereinae</i>	<i>B. fluminensis</i>	<i>B. mobilis</i>
Ukuran sel (µm)	1,5–2,0 × 3,5–4,5	0,5–1,2 × 1,6–3,0	1,0 × 3,25	1,0–1,5 × 3,0–3,5	0,6–1,0 × 1,6–3,0
Warna koloni	Krem	Pink	Krem	Pink	Coklat kuning
Motilitas	—	—	—	—	+
Kisaran pH untuk pertumbuhan	4,0–9,0 (6,0–7,0)	3,0–10,0 (4,0–10,0)	3,0–10,0 (6,5)	3,5–9,2 (ND)	3,0–10,0 (4,0–5,0)
Ketahanan terhadap to 1% pepton	—	d	—	—	D
Pati terhidrolisis	D	—	—	—	—
Pertumbuhan pada asparagina sebagai sumber C dan N	—	—	—	—	—
Urea terhidrolisis	+	+	—	—	+
Produksi H <sub>2</sub> S dari sistenina	—	—	+	+	—
Kandungan GC DNA (mol %)	57,5 –60,7	54,7 – 58,8	57,1	54,4 – 58,0	57,3
<b>Penggunaan Senyawa Karbon</b>					
Arabinosa	—	+	+	D	+
Galaktosa	+	+	+	+	—
Fruktosa	+	+	+	+	—
Melibiosa	d	d	—	+	—
Maltosa	+	—	+	D	—
Mannosa	—	+	+	D	—
Sorbosa	d	+	—	+	+
Raffinosa	+	+	—	D	d
Xilosa	—	—	+	+	—
Fukosa	—	—	+	—	—
Metanol	—	—	—	—	+
Gliserol	—	+	—	+	+
Sorbitol	+	+	—	+	—
Mannitol	+	+	—	d	d
Glukonat	+	+	—	+	+

Catatan:

- Isolasi *Beijerinckia* bisa juga menggunakan sampel air, tetapi jumlah inokulum harus lebih dari 10 mL. Disarankan untuk menggunakan media pengayaan cairan kekuatan ganda (pH 5.0 atau lebih rendah).
- Untuk kultivasi *Beijerinckia*, CaCl<sub>2</sub> dapat dihilangkan untuk mendapatkan media bebas kalsium dan dapat diganti dengan CaCO<sub>3</sub>.
- Untuk penyimpanan jangka panjang, liofilisasi strain *Beijerinckia* dalam susu skim atau larutan dekstran-natrium glutamat pada kertas saring, kemudian simpan pada suhu kamar dalam kondisi gelap.

## Ulasan

Genus *Beijerinckia* ditemukan secara luas di tanah tropis asam dan filosfer tanaman tropis dan secara aerobik mengikat nitrogen. *Beijerinckia* spp. dilaporkan sebagai mikroba pemacu pertumbuhan tanaman. Media bebas nitrogen dan diperkaya biasanya digunakan untuk isolasi *Beijerinckia* dari sampel tanah dan sampel daun. Mereka membentuk koloni yang halus dan berlendir pada media agar bebas nitrogen; dan membentuk butiran polihidroksibutirat intraseluler di kedua kutub.

Genus *Beijerinckia* dicirikan sebagai bakteri nonsimbiotik (hidup bebas), aerobik, kemoheterotrofik dengan kemampuan menambat nitrogen atmosfer. Mereka dapat dibedakan dari bakteri pengikat nitrogen lainnya dengan morfologi sel dan beberapa karakteristik fisiologis. Anggota genus ini memiliki sel berbentuk batang yang khas dengan ujung bulat yang mengandung badan lipoid polar. Selain itu, spesies *Beijerinckia* menunjukkan toleransi asam yang besar, mampu menumbuhkan dan menambat dinitrogen pada pH 3,0–4,0. Pada media agar (bebas nitrogen, agar mineral glukosa), mereka biasanya menghasilkan koloni berlendir.

Metode yang paling selektif untuk isolasi *Beijerinckia* adalah penggunaan media pengayaan bebas nitrogen asam (Becking 1961). *Beijerinckia* tahan asam; oleh karena itu, penggunaan media tersebut menghilangkan pertumbuhan mikroba lain, terutama spesies *Azotobacter* yang tumbuh lebih cepat.

Unsur kelumit seperti besi diperoleh dari tanah yang digunakan sebagai inokulum. Media dituangkan dalam lapisan tipis (2–3 mm) ke dalam cawan Petri untuk akses oksigen dan untuk menghambat perkembangan bakteri anaerobik seperti *Clostridium pasteurianum* pengikat nitrogen atau bakteri penambat N<sub>2</sub> fakultatif anaerob. Sekitar 0,5 g tanah per cawan Petri digunakan sebagai inokulum. Kultur pengayaan diinkubasi pada suhu 30°C.

### Isolasi dan Identifikasi *Desulfovibrio* (Mistry et al. 2022)

*Desulfovibrio* adalah genus bakteri vibrio (batang melengkung atau koma), motil dan tidak membentuk spora. Ini adalah Gram-negatif di alam dan positif untuk desulfovirdin. Desulfovirdin adalah sulfit reduktase disimilasi yang terlibat dalam konservasi energi dengan mereduksi sulfit. Genus *Desulfovibrio* merupakan bakteri pereduksi sulfat. *Desulfovibrio diazotrophica* sp. nov., *Desulfovibrio desulfuricans*, *Desulfovibrio gigas*, dan *Desulfovibrio vulgaris* merupakan spesies bakteri dari genus *Desulfovibrio* yang mampu memfiksasi nitrogen secara signifikan.

#### Media untuk Isolasi *Desulfovibrio desulfuricans*

Siapkan media agar seperti yang dijelaskan pada Tabel 3. Media diautoklaf pada 121°C dan tekanan 15 psi selama 15 menit untuk menghindari kontaminasi mikroba lainnya.

Tabel 3. Komposisi media untuk isolasi *Desulfovibrio desulfuricans*

No.	Bahan Kimia	Formula	Konsentrasi (g L <sup>-1</sup> atau mL L <sup>-1</sup> )
1	Dipotassium fosfat	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5
2	Ammonium klorida	NH <sub>4</sub> Cl	1,0
3	Natrium sulfat	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,0
4	Magnesium sulfat heptahidrat	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2,0
5	Kalsium klorida	CaCl <sub>2</sub>	0,1
6	Yeast extract	–	1,0
7	Besi sulfat heptahidrat	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,05
8	Asam askorbat	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>	0,1
9	Natrium tioglikolat	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>2</sub> S	0,1
10	0.1% Larutan Resazurin	C <sub>12</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>4</sub>	1,0 mL
11	Larutan <i>trace elements</i>	–	1,0 mL
12	60% natrium laktat	–	12,0 mL
13	Agar	–	16,0

Tambahkan akuades hingga volume 1.000 mL

### Bahan dan Alat

- Sampel tanah
- Sarung tangan
- Botol sampel steril
- Conical flasks
- Wire loop
- Petri dish steril
- Glass spreader
- 70% etanol
- Shaker
- BOD incubator (28°C + 1°C)

### Prosedur

- Untuk isolasi *Desulfovibrio*, sampel tanah sawah dapat diambil dari kedalaman 15-20 cm.
- Kumpulkan sampel tanah padi selama tahap pertumbuhan padi dalam wa-

- dah pengumpulan sampel steril dengan menggunakan spatula steril.
- Sampel harus segera dibawa ke laboratorium dan disimpan pada suhu 4°C sampai digunakan lebih lanjut.
  - Suspensikan 1 g sampel tanah ke dalam 9 mL akuades steril yang terkandung dalam labu berbentuk kerucut untuk mendapatkan 10<sup>-1</sup> suspensi tanah.
  - Kemudian kocok perlahan suspensi tanah selama 5-10 menit.
  - Gunakan akuades steril untuk mendapatkan berbagai pengenceran suspensi tanah.
  - Inokulasikan 100 µL suspensi tanah masing-masing pengenceran ke dalam cawan Petri steril berisi media agar.
  - Sebarkan inokulum dengan bantuan glass spreader yang steril.
  - Inkubasi semua cawan pada suhu 35 ± 1°C dalam inkubator BOD selama 3 minggu.
  - Pindahkan koloni individu hitam ke media agar yang disuplementasi dengan 0,25% ekstrak ragi, 0,25% pepton, 0,25% kaldu nutrisi, dan 0,25% glukosa atau 0,25% fruktosa untuk mendapatkan biakan murni.

### Identifikasi *Desulfovibrio*

- Lakukan pewarnaan Gram isolat sesuai protokol standar dan amati slide di bawah perbesaran 100x di mikroskop.
- Lakukan uji biokimia isolat sesuai protokol standar (Tabel 4).

Tabel 4. Uji biokimia *Desulfovibrio*

Bakteri	Resistensi antibiotik			Katalase	Indol	Nitrat	Growth on Bile	Urea	Motilitas	Desulfoviridin	H <sub>2</sub> S
	K	V	C								
<i>Desulfovibrio gigas</i>	S	R	R	—	—	—	+	—	—	+	+
<i>D. desulfuricans</i>	S	R	R	—	—	+	—	+	+	+	+
<i>D. vulgaris</i>	S	R	R	—	+	—	+	—	+	+	+

Keterangan:

+ = reaksi positif, — = reaksi negatif.

Resisten (R) atau suseptibel (S) terhadap kanamycin (K), vancomycin (V), colostin (C).

Data dari Warren *et al.* (2005).

## Isolasi dan Penapisan *Azoarcus* (Thakor *et al.* 2022)

*Azoarcus* merupakan bakteri Gram-negatif, diklasifikasikan Rhodocyclaceae dari ordo Rhodocyclales di kelas Betaproteobacteria. *Azoarcus* berasosiasi dengan akar *Leptochloa fusca* (rumput jukut). Sel-selnya berpigmen kuning, lurus hingga melengkung, batang. Selain mampu menambat nitrogen, bakteri ini dapat mendegradasi toluena.

*Azoarcus* mengandung butiran poli- $\beta$ -hidroksibutirat (PHB), yang memfasilitasi kelangsungan hidup mikroba tanpa adanya sumber karbon. Mereka adalah kemoorganoheterotrof dan oksidase positif di alam. *Azoarcus* dijumpai secara luas di lingkungan yang beragam. Beberapa spesies genus *Azoarcus* yang diketahui adalah *Azoarcus communis*, *A. indigens*, *A. tolulyticus*, *A. anaerobius*, *A. evansii*, *A. toluvorans*, *A. buckelii*, *A. nasutitermitis*, *A. rhizosphaerae*, dan *A. czosphaerae*.

### Bahan

Media pada Tabel 5 dan Tabel 6 dapat digunakan untuk mengisolasi *Azoarcus*. Media harus diautoklaf pada suhu 121°C dan 15 psi selama 15 menit, didinginkan hingga 50°C, dan dituangkan ke cawan Petri.

### Alat dan Bahan

- Contoh tanah rhizosfer atau contoh tanah tercemar
- Botol vial
- Akuades steril
- Cawan Petri steril
- Etanol 70%
- Penyebar kaca
- Wire loop
- Shaker

### Isolasi Bakteri dari Sampel Tanah

- Sampel tanah seperti tanah rhizosfer diambil dari kedalaman 15-20 cm
- Gunakan spatula steril untuk mengumpulkan sampel tanah dalam wadah steril.
- Segera bawa sampel ke laboratorium dan simpan pada suhu 4°C hingga digunakan lebih lanjut.
- Siapkan larutan stok dengan menambahkan 1 g sampel tanah ke dalam 100 mL akuades steril dalam botol vial. Kocok dengan kecepatan 120 rpm selama 30 menit hingga 1 jam.
- Tambahkan 1 mL campuran stok dalam 9 mL akuades steril dalam tabung vial untuk memperoleh  $10^{-1}$  suspensi tanah.
- Gunakan akuades steril untuk pengenceran suspensi tanah  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ , dan  $10^{-5}$ .

Tabel 5. Komposisi Media Padat Bebas N

No.	Senyawa	Formula	Dosis (g L <sup>-1</sup> )
1	Sukrosa	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	20,0
2	Natrium klorida	NaCl	0,2
3	Dipotassium fosfat	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,2
4	Magnesium sulfat	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,2
5	Potassium sulfat	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,1
6	Kalsium karbonat	CaCO <sub>3</sub>	5,0
7	Agar	-	20,0

Tabel 6. Komposisi Media Congo red–yeast extract manitol agar (CR-YEMA)

No.	Senyawa	Formula	Dosis (g L <sup>-1</sup> )
1	Yeast extract	-	0,4
2	Manitol	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	10,0
3	Dipotassium hidrogen fosfat	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5
4	Magnesium sulfat	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,2
5	Natrium klorida	NaCl	0,1
6	Congo red	C <sub>32</sub> H <sub>22</sub> N <sub>6</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>6</sub> S <sub>2</sub>	0,025
7	Agar	-	15

- Inokulasikan 100 mL suspensi tanah masing-masing pengenceran ke dalam cawan Petri steril berisi media agar bebas N.
- Sebarkan inokulum dengan bantuan glass spreader steril.
- Inkubasi semua cawan pada 28 + 1°C di inkubator BOD selama 5-7 hari.
- Pindahkan koloni bakteri ke media padat bebas N baru untuk mendapatkan kultur murni.

### Morfologi Umum *Azoarcus* sp. pada Media Padat

- Genus *Azoarcus* termasuk Gram negatif berbentuk batang
- Terdapat flagella
- Katalase positif, dan aktivitas oksidase positif
- Sebagian besar *Azoarcus* merupakan bakteri aerob

Tabel 7. Karakteristik *Azoarcus*

No.	Uji	<i>Azoarcus indigens</i>	<i>Azoarcus communis</i>
1	Pewarnaan Gram	—	—
2	Motilitas	+	+
3	Katalase	+	+
4	Reduksi nitrat	+	—
5	Voges-Proskauer	+	—
6	Urease	+	—
7	Sumber C utama untuk pertumbuhan		
	a. L-Aspartat	+	—
	b. D-Malat	+	+
	c. Glutarat	—	+
	d. L-Prolina	—	—
	e. Fenillasetat	+	
8	Kandungan G+C (mol%)	66,6	62,4

Sel *Azoarcus* terlihat berpasangan, berukuran lebar 0,4 – 1,0 µm dan panjang 1,1 - 4 µm, serta berbentuk huruf S (Reinhold *et al.* 1993).

### Isolasi dan Identifikasi *Derxia* (sinonim: *Burkholderia*) (Gamit & Amaesan 2022)

*Derxia* termasuk dalam famili Alcaligenaceae dari ordo Burkholderiales dan kelas Betaproteobacteria. *Derxia* merupakan bakteri pengikat nitrogen dalam kondisi aerobik atau mikroaerobik. Dalam genus *Derxia*, hanya dua spesies yang dikenali: *Derxia gummosa* yang diisolasi dari sampel tanah dan *Derxia lacustris* yang diisolasi dari air tawar. *D. gummosa* biasanya ditemukan di daerah tropis. Sel *Derxia* termasuk Gram-negatif, berbentuk batang dengan ujung bulat, lebar 1,0-1,2 µm, oksidatif positif, katalase-negatif, motil melalui flagel kutub pendek, pleomorfik tergantung pada usia dan media pertumbuhan. Strain *Derxia* toleran terhadap asam dan telah diisolasi menggunakan media glukosa bebas nitrogen asam cair dari kultur yang dirancang untuk memperkaya *Beijerinckia*. Genus *Derxia* dianggap memiliki hubungan dengan genus diazotrofik lainnya (*Beijerinckia*, *Pseudomonas*, *Azotobacter*, dan *Azomonas*) berdasarkan sifat fisiologis, morfologis, dan kemitaksonominya; tetapi berdasarkan metode kesamaan cistron rRNA mereka sangat berbeda satu sama lain. Kapasitas fiksasi nitrogen *D. gummosa* lebih kecil daripada *Azotobacter* atau *Beijerinckia*.

Isolasi *Derxia* umumnya dilakukan menggunakan metode sieved soil pada

media agar manitol bebas nitrogen. *Derxia* sangat sensitif terhadap kloramfenikol, aureomisin, streptomisin, tetramisin, penisilin, dan sensitif terhadap polimiksin dan oleandomisin.

### Alat dan Bahan

- Sampel tanah
- Sarungan
- Media manitol bebas nitrogen
- Cawan Petri
- Inkubator

### Isolasi *Derxia* dari Sampel Tanah

- Gunakan metode tanah yang diayak untuk isolasi *Derxia*.
- Saring sampel tanah yang terkumpul dan distribusikan secara merata di atas permukaan media manitol bebas nitrogen.
- Media berikut dapat digunakan untuk isolasi *Derxia*:
  - Media IAM B-1: 3,0 g ekstrak daging sapi, 3,0 g pepton, 5,0 g NaCl, akuades hingga 1000 mL, pH 7,0.
  - LMG media 10: 10,0 g glukosa, 0,1 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,1 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,9 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 10,0 mg  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5,0 g  $\text{CaCO}_3$ , 5,0 mg  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 1 l akuades pH 7,3.
  - Media isolasi *Derxia*: 20,0 g pati, 0,05 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,15 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,02 g  $\text{CaCl}_2$ , 0,1 g  $\text{NaHCO}_3$ , 1 tetes  $\text{FeCl}_3$  (10%), 0,002 g  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 5 mL Bromotimol biru (0,5%, agar larutan etanol), 20,0 g agar, 1 l akuades.
- Inkubasi cawan Petri pada suhu kamar selama 4-5 hari.
- Setelah masa inkubasi, amati koloni (koloni berwarna kuning di sekitar partikel tanah berangsur-angsur bertambah besar dan akhirnya dianggap berwarna coklat karat).
- Murnikan koloni melalui penggosokan berulang pada media agar bebas nitrogen.
- Media berikut dapat digunakan untuk penyimpanan *Derxia*:
  - Media agar glukosa mineral bebas nitrogen: 10,0 g glukosa, 0,5 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,25 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,25 g NaCl, 0,1 g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,1 g  $\text{CaCl}_2$  atau  $\text{CaCO}_3$ , 0,005 g  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 15,0 g agar dalam 1 L akuades, pH 6,9.
  - Media agar pati mineral bebas nitrogen: 0,05 g pati, 0,15 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,2 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,02 g  $\text{CaCl}_2$ , 0,1 g  $\text{NaHCO}_3$ , 1 tetes larutan  $\text{FeCl}_3$  (larutan encer 10%), 0,002 g  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 5,0 mL larutan biru bromotimol (dalam larutan etanol 0,5%), 20,0 g agar dalam 1 L air akuades.
  - Media agar manitol mineral bebas nitrogen: 10,0 g manitol, 0,5 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,2 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,1 g  $\text{CaCl}_2$ , 5,0 g  $\text{CaCO}_3$ , 0,0005 g  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , sekulimit  $\text{FeCl}_3$  dan  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , agar, 15,0 g, dalam 1 L akuades, pH 6,9

Tabel 8. Karakteristik fisiologi *Derxia gummosa*

Karakteristik	Reaksi	Karakteristik	Reaksi
Motilitas	+	Hidrolisis urea	+
Warna koloni pada umur tua	coklat	Produksi H <sub>2</sub> S dari sisteina	—
Ketahanan terhadap 1% pepton	+	Tween 20 terhidrolisis	+
Hidrolisis starch	—	Produksi indol	+
Pertumbuhan pada asparagina sebagai sumber C dan N	+	Reaksi antagonis terhadap organisme Gram positif	+
<b>Karakteristik morfologi <i>D. gummosa</i></b>			
Bentuk sel	Berbentuk batang dengan ujung bulat	pH optimum	5.5
Ukuran sel	1.0–1.2 µm × 3.0–6.0 µm	Koloni pada media agar	Mulanya berlendir semi transparan, kemudian masif dan buram, permukaan berkerut, warna berangsur-angsur menjadi coklat tua
Motilitas	Flagela polar pendek dan motil	Aktivitas katalase	Negatif
Fiksasi N <sub>2</sub>	Kondisi aerob dan mikroaerob	Pewarnaan Gram	Gram-negatif
Suhu optimum	25°C - 35°C	Kandungan %GC DNA	69,2–72,6%
<b>Penggunaan senyawa karbon pada <i>D. gummosa</i></b>			
Arabinosa	—	Oksaloasetat	+
Galaktosa	—	Fumarat	+
Fruktosa	+	Malat	—
Melibiosa	—	Malonat	+
Maltosa	—	Glikolat	+
Manosa	—	Benzoat	—
Sorbose	—	L-askorbat	—
Rafinosa	—	Aspartat	+
Xilosa	—	Glutamat	+
Butanol	+	Etilamin	+
Propanol	+	Manitol	D
Gliserol	+	Asetat	+
Sorbitol	D	Sitrat	+

- *Derxia* dapat disimpan pada suhu 4°C selama 25 bulan dan pada - 4°C selama 20 bulan.

### Identifikasi *Derxia*

- Lakukan teknik pewarnaan dan uji biokimia lainnya sesuai prosedur standar.
- Menyimpulkan hasil dengan hasil *Derxia* yang sudah tersedia (Tabel 8).

### Daftar Pustaka

- Becking JH 1961. Studies on nitrogen-fixing bacteria of the genus *Beijerinckia*: Geographical and ecological distribution in soils. *Plant Soil* 14:49–81.
- Calvante VA, Dobereiner J. 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.
- Gamit HA, Amaesan N. 2022. Isolation and Identification of *Derxia* Species from the Soil Sample. p. 57-62. In: Amaesan N., P. Patel, D. Amin (Eds.). *Practical Handbook on Agricultural Microbiology*. Springer Protocols Handbooks. Humana, New York, NY. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1724-3\\_30](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1724-3_30).
- Gillis M, Dobereiner J, Pot B, Goor M, Falsen E, Hoste B, Reinhold B, Kersters K. 1991. p 291-292. *Herbaspirillum seropedicae* and (*Aquaspirillum*) *autotrophicum*. In M. Polsinelli & R. Materassi (Eds.) *Nitrogen Fixation*. Kluwer Acad. Publishers. Amsterdam.
- Gillis M, Kersters K, Hoste B, Jenssens D, Kroppenstedt RM, Stephan MP, Teixeira KRS, Dobereiner J, De Ley J. 1989. *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov., a nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. *Int. J. System. Bacteriol.* 39: 361-364.
- Jiménez DJ, Montaña JS, Martínez MM. 2011. Characterization of free nitrogen fixing bacteria of the genus *Azotobacter* in organic vegetable-grown Colombian soils. *Braz. J. Microbiol.* 42:846-58.
- Khammas KM, Ageron E, Grimont PAD, Kaiser P. 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 (2<sup>nd</sup> edition).
- Krieg NR, Dobereiner J. 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.
- Li Q, Chen S. 2020. Transfer of nitrogen fixation (nif) genes to non-diazotrophic hosts. *Chembiochem.* 21:1717-1722.
- Mistry H, Thakor R, Himanshu. 2022. Isolation and Identification of Associative Symbiotic N<sub>2</sub> Fixing Microbes: *Desulfovibrio*. p.77-84. In N. Amaesan, P. Patel, D. Amin (Eds.). *Practical Handbook on Agricultural Microbiology*. Springer Protocols Handbooks.

- Humana, New York, NY. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1724-3\\_30](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1724-3_30).
- Okon Y, Phouchins J, Albrecht SL, Burris RH. 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, Albrecht SL, Burris RH. 1977b. Methods for growing *Spirillum lipoferum* and for counting it in pure culture and in association with plants. *Appl. Environ Microbiol* 33 :85-88.
- Pimentel JP, Olivares FL, Pitaed RM, Urquiaga S, Akiba F, Dobereiner J. 1991. Dinitrogen fixation and infection of grass leaves by *Pseudomonas rubrisubalbicans* and *Herbaspirillum seropedicae*. *Plant Soil* 137: 61-65.
- Rao HC, Savalgi VP. 2017. Isolation and screening of nitrogen fixing endophytic bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* GdS25. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 6(3):1364–1373.
- Reinhold B, Hurek T, Fendrik I, Pot B, Gillis M, Kersters K, Thielemans S, De Ley J. 1987. *Azospirillum halopraeferans* sp.nov., a nitrogen fixing organism associated with roots of Kallar grass (*Leptochloa fusca* L.). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 37: 43-51.
- Sowmiya K, Mahadevaswamy. 2022. Isolation and Identification of *Gluconacetobacter diazotrophicus*. p. 41-46. *In* N. Amaresan, P. Patel, D. Amin (Eds.). *Practical Handbook on Agricultural Microbiology*. Springer Protocols Handbooks. Humana, New York, NY. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1724-3\\_30](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1724-3_30).
- Thakor R, Mistry H, Bariya H. 2022. Isolation and Identification of Nitrogen Fixing Bacteria: *Azoarcus* Species. p. 47-56. *In* Amaresan N, Patel P, Amin D (Eds.). *Practical Handbook on Agricultural Microbiology*. Springer Protocols Handbooks. Humana, New York, NY. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1724-3\\_30](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1724-3_30).
- Warren YA, Citron DM, Merriam CV, Goldstein EJ. 2005. Biochemical differentiation and comparison of *Desulfovibrio* species and other phenotypically similar genera. *J. Clin. Microbiol.* 43:4041–4045.
- Young JPW. 1992. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms, p. 43-86. *In* G. Stacey, R. H. Burris, and H. J. Evans (Eds.), *Biological nitrogen fixation*. Chapman and Hall, New York, N.Y.

*Which we think about the relationship between prokaryotes and eukaryotes  
.... and will influence strongly the view we develop of the ancestor that gave rise  
to all extant life*

C. R. Woese and R. S. Wolfe

## 2.4

# BAKTERI PEMBENTUK BINTIL AKAR

Erny Yuniarti, Rasti Saraswati

Bakteri bintil akar atau rhizobia merupakan bakteri yang mampu menginduksi pembentukan bintil akar, bersimbiosis, dan melakukan penambatan nitrogen udara pada akar tanaman kacang-kacangan. Secara genetik, bakteri bintil akar sangat beragam dan secara fisiologi merupakan kelompok mikroorganisme yang heterogen. Pertama kali bakteri bintil akar 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 (Somasegaran & Hoben 1994).

Berdasarkan sekuen 16S ribosomal DNA (16S rDNA), rhizobia dikelompokkan ke dalam tiga genus, yaitu *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* dan *Azorhizobium* (Young *et al.* 1991, Willems & Collins 1993, Yanagi & Yamasato 1993). Selanjutnya Young dan Haukka (1996) mengelompokkan rhizobia menjadi lima genus, yaitu *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Sinorhizobium* dan *Mesorhizobium*. De Lajudie *et al.* (1998) menambahkan 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  $\mu\text{m}$ , bersifat aerobik, Gram negatif, serta tidak membentuk spora. Selnnya 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 buldar, 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, *translucent* (agak transparan) hingga *opaque* (buram); tipe LW berdiameter lebih dari 1 mm, berair, datar, *translusens*, cenderung granular dengan tepian tidak teratur; tipe SD berdiameter <1 mm, cembung, *translucent* hingga hampir *opaque*. 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 terkuster 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*. Bakteri *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  $\mu\text{m}$ , 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 *opaque* 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).

Seiring kemajuan teknik sekuensing gen memungkinkan dilakukan analisis sekuen selain 16S rDNA. Berdasarkan analisis sekuen 16S rDNA, genom, gen housekeeping seperti *recA* dan *atpD*, *recA* dan *atpD*, multilokus (MLSA atau MLST) sebagai gen inti dalam klasifikasi genus dan spesies serta sekuen gen tambahan (*nod*, terutama *nodC*) dalam klasifikasi simbiovar (sebelumnya biovar pada klasifikasi berdasarkan konsep inokulasi silang), rhizobia terdiri atas genus *Rhizobium*, *Ensifer* (sebelumnya *Sinorrhizobium*), *Neorhizobium*, *Allorhizobium*, *Pararhizobium* (Rhizobiaceae), *Mesorhizobium* (Phyllobacteriaceae), *Bradyrhizobium* (Nitrobacteriaceae/Bradyrhizobiaceae), dan *Azorhizobium* (Hyphomicrobiaceae). Rhizobia yang ditemukan pada bintil akar tanaman kedelai (*Glycine max*) terdiri atas spesies *Ensifer fredii*, *E. glycinis*, *E. sojae*, *M. tianshanense* (*Glycine* spp.), *B. daqingense*, *B. diazoefficiens*, *B. elkanii*, *B. huanghuaihaiense*, *B. japonicum*, *B. liaoningense*, dan *B. ottawaense*. Rhizobia yang ditemukan pada bintil akar tanaman kacang tanah (*Arachis hypogaea*) meliputi spesies *R. hainanense*, *R. pakistanensis*, *B. guangdongense*, *B. guangxiense*, *B. kavangense*, *B. lablabi*, *B. subterraneum*, *B. vignae*, serta pada tanaman kacang merah (*Phaseolus vulgaris*) yaitu *R. acidisoli*, *R. ecuadorensis*, *R. etli*, *R. freirei*, *R. gallicum*, *R. hidalgonense*, *R. leucaenae*, *R. lusitanum*, *R. mesoamericanum*, *R. paranaense*, *R. phaseoli*, *R. tropici*, *R. vallis*, *P. giardinii*, *B. icense* (*P. lunatus*), dan *B. paxllaeri*. Sedangkan spesies bakteri bintil akar yang ditemukan dari tanah adalah *E. Adhaerens*. Untuk genus rhizobia lainnya ditemukan pada tanaman legum lain atau tanaman lainnya (Velázquez et al. 2017).

Dalam subbab ini diuraikan teknik koleksi, isolasi, dan karakterisasi kekerabatannya dengan analisis genom DNA. Evaluasi efektivitas rhizobia dalam menodulasi, bersimbiosis, dan menambat N udara pada tanaman legum dapat ditetapkan dengan metode perbedaan serapan N antara tanaman yang diinokulasi rhizobia dan tanaman yang tidak diinokulasi rhizobia, metode reduksi asetiilen (ARA), metode analisis ureide dalam cairan xilem, serta metode pengenceran isotop <sup>15</sup>N (Cathey et al. 2010). Selain itu juga diuraikan penentuan efektivitas rhizobia menambat N udara menggunakan metode ARA.

## Koleksi dan Isolasi *Bradyrhizobium* (Somageran & Hoben 1994)

### Alat

- Cawan Petri
- Oven

- Tabung reaksi
- Neraca analitik ketelitian tiga desimal
- Beaker glass
- 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  $K_2HPO_4$ ; 0,2 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 0,1 g NaCl; 10 g manitol; 0,5 g sari khamir; 15 g agar Bacto; dan 10 ml merah kongo (MK), 0,25% atau 5 mL bromtimol biru (BTB), 0,5% atau 1 mL brilliant hijau (BH) 125 ppm dalam akuades 1.000 ml.
- Larutan stok MK: larutkan 250 mg MK dalam 100 mL akuades.
- Larutan stok BTB: larutkan 0,5 g BTB dalam 100 mL etanol.
- Larutan stok BH: Larutkan 125 µg BH dalam 100 mL etanol.

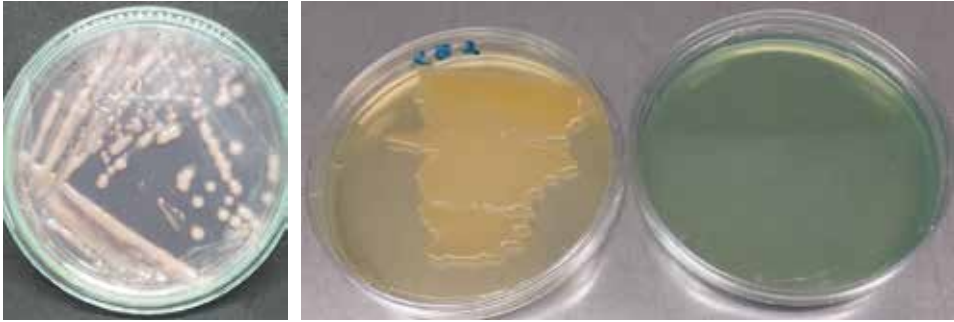
### Prosedur

Koleksi bintil akar dilakukan dengan cara mencabut akar tanaman secara hati-hati. Buat lingkaran pada tanaman dengan radius 15 cm menggunakan sendok tanah. Lalu tanaman dicabut dengan memasukkan sendok tanah pada 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 bertutup ulir berisi lapisan bawah berupa desikan seperti silika gel atau  $CaCl_2$  anhidrat lalu kapas sebagai lapisan atas. 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.

#### 1. Isolasi *Bradyrhizobium*

- Untuk isolasi dari bintil akar, ambil 10 bintil akar, taruh dalam labu Erlenmeyer 125 mL, cuci permukaan bintil akar dengan 95% etanol selama 1 menit, lalu pindahkan ke dalam cawan Petri steril dan sterilisasi dengan natrium 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 menggunakan batang gelas dalam tabung reaksi. Suspensi bintil diambil dengan ose lalu digoreskan ke medium seleksi sari khamir manitol (SKM) agar yang dibubuhi MK.



Gambar 1. Koloni *Rhizobium* sp. RB 2 diisolasi dari *Glycine max* dan pada medium SKM+MK (kiri) dan pada media SKM+BTB (kanan) menghasilkan reaksi asam sehingga merubah warna medium dari hijau menjadi kuning

- Untuk isolasi dari tanah, suspensikan 10 g contoh dalam 90 ml larutan garam fisiologis steril. Lakukan seri pengenceran menggunakan 9 mL garam fisiologis steril hingga  $10^5$ . Inokulasikan suspensi tanah (0,1 mL) ke dalam medium SKM agar yang dibubuhi MK atau ke dalam SKM agar yang dibubuhi BH. Lalu dilakukan *spread-plate* menggunakan batang penyebar yang telah disterilkan.
  - Cawan Petri diinkubasi hingga 10 hari pada keadaan gelap pada suhu 25 – 30°C. MK. Amati pertumbuhannya, koloni *Bradyrhizobium* biasanya disertai dengan pembentukan lendir polisakarida ekstraseluler dalam jumlah yang cukup banyak. Pewarna MK membantu membedakan bakteri bintil akar dengan kontaminan, bakteri ini tidak menyerap warna MK jika diinkubasi pada kondisi gelap sedangkan kontaminan dapat menyerap warna MK. Koloni tunggal ditumbuhkan pada SKM agar miring. Kultur murni disimpan pada suhu 4°C untuk digunakan uji berikutnya seperti uji pewarnaan Gram dan respon pertumbuhan pada media SKM agar + BTB, dan uji kemampuan membentuk bintil akar pada inang legum (otentikasi) sebagai karakter yang dapat mengkonfirmasi kultur adalah bakteri bintil akar. Bakteri bintil akar tumbuh cepat menghasilkan reaksi asam pada SKM agar mengandung BTB sehingga warna media menjadi kuning sedangkan rhizobium tumbuh lambat menghasilkan reaksi alkalin sehingga mengubah warna medium menjadi biru.
2. Isolasi *Rhizobium*
- Isolasi *Rhizobium* dari sampel tanah dengan metode *spread-plate* tersebut di atas dapat menyediakan data populasi *Rhizobium* pada sample tanah, atau untuk menghitung jumlah koloni yang tumbuh.

## Menghitung Populasi Rhizobia dengan Metode Infeksi Tanaman/MPN (Somasegaran & Hoben 1994)

### Prinsip

Metode infeksi tanaman, juga dikenal sebagai metode *most-probable number* (MPN), digunakan untuk menentukan jumlah rhizobia yang hidup dan infeksi pada sampel pupuk hayati dengan bahan pembawa yang tidak disterilasi atau pupuk hayati majemuk, atau sampel tanah. Tanaman legum yang dipilih dalam metode MPN harus termasuk dalam kelompok inokulasi silang yang sama dari legum yang dinodulasi oleh rhizobia target. Sampel dibuat seri pengenceran dan masing-masing suspensi pengenceran diinokulasikan pada perakaran kecambah tanaman. Setiap satu sel dari suspensi sampel mampu menghasilkan bintil akar mengikuti distribusi Poisson.

### Prosedur

1. Penentuan populasi *Bradyrhizobium* tanah dengan metode MPN.
  - Siapkan tanaman kedelai liar siratro (*Macroptilium atropurpureum*) atau tanaman legum lain yang menjadi target rhizobia tertentu.
  - Toreh benih siratro menggunakan pisau silet, lalu dilakukan sterilisasi permukaan dengan alkohol 95% selama 1 menit dan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 atau media pasir dalam botol selai yang ditambah larutan hara bebas N Ahmad & Evans yang dimodifikasi (Somasegaran & Hoben 1994).
2. Pengenceran contoh tanah
  - Suspensikan 10 g contoh dalam 90 ml larutan garam fisiologis steril, lakukan seri pengenceran menggunakan 9 ml garam fisiologis steril hingga 10<sup>-9</sup>.
3. Inokulasi suspensi tanah ke kecambah siratro
  - Di sekitar perakaran kecambah siratro diinokulasi 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

$$\text{Populasi Rhizobium (g tanaman}^{-1}\text{)} = (m \times d) / V$$

- m = kemungkinan jumlah sel (Tabel MPN)\* untuk pengenceran terendah pada seri pengenceran.
- d = kebalikan pengenceran terendah
- V = volume suspensi yang diinokulasikan

Keterangan: \*berdasarkan data A (tipe pengenceran: 10 x, 4 x dst, n (ulangan), s (tahap pengenceran), dan total unit positif).

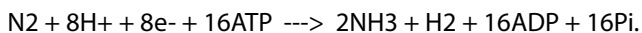
Catatan: Rentang transisi (ROT) adalah jumlah langkah pengenceran antara pengenceran seluruhnya positif dan pengenceran seluruhnya negatif. Ini adalah ukuran langsung dari kepatuhan eksperimental dengan asumsi utama yang mendasari prosedur MPN, yaitu, bahwa satu sel mampu menghasilkan bintil akar mengikuti distribusi Poisson.

Nilai ROT digunakan untuk menilai kualitas hasil MPN atau untuk menunjukkan penerimaan atau penolakan hasil MPN. Untuk menguji probabilitas kepatuhan satu seri pengenceran, ROT dibandingkan dengan nilai tabel yang berlaku untuk seri pengenceran/kombinasi ulangan. Misalnya, kode eksperimen 4-3-3-0-1-0 yang dikembangkan di bawah kondisi eksperimen serupa memiliki ROT 4 dan probabilitas 0,0036 (Dalam Tabel). Kami yakin untuk 0,9964 bahwa hasil dari seri pengenceran ini tidak sesuai dengan asumsi yang mendasari dan hasilnya dibuang/ditolak.

### **Aktivitas Nitrogenase Rhizobium dengan Asai Reduksi Asetilen (ARA) (Cathey *et al.* 2010)**

#### **Prinsip**

Fiksasi nitrogen simbiotik dikatalisis oleh enzim molibdenum nitrogenase, yang terdiri atas protein MoFe (NifDK) dan protein Fe (NifH). Kofaktor FeMo-co adalah kluster [Mo-7Fe-9S-C-homocitrate] pada protein MoFe berfungsi sebagai situs aktif pengikatan dan reduksi nitrogen. Sedangkan gugus P adalah gugus [8Fe-7S] pada protein MoFe berfungsi mengangkut elektron ke FeMo-Co. Protein Fe adalah homodimer  $\gamma_2$  yang dijembatani oleh kluster intersubunit [4Fe-4S] yang berfungsi sebagai donor elektron wajib untuk protein MoFe. Keseluruhan reaksi digambarkan dengan persamaan:



Dua molekul amonia dihasilkan dari satu molekul gas nitrogen menggunakan 16 molekul ATP dan pasokan elektron dan proton (ion hidrogen). Nitrogenase adalah enzim multifungsi yang mampu mengkatalisis reduksi beberapa substrat selain nitrogen udara seperti asetilena, azida, dinitrogen oksida, nitril, dan isonitril yang memiliki ikatan rangkap tiga. Asetilen biasa digunakan sebagai substrat untuk pengukuran aktivitas nitrogenase. Etilen yang dihasilkan akibat reduksi asetilen oleh nitrogenase diukur dengan menggunakan kromatografi gas.

**Alat**

- Autoklaf
- Cawan Petri
- Oven
- Tabung reaksi
- Neraca analitik ketelitian 3 desimal
- Gelas Beaker
- Penangas air
- Pengaduk magnetik
- Ose
- Pipet mikro
- Tip mikro 1 ml dan 200  $\mu$ L
- Gas kromatografi
- Alat suntik 1 ml, 10 mL

**Bahan**

- Gas asetilen (100%)
- Gas etilen (99,5%)

**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 dengan penutup Suba kedap udara (suba-seal septa, sigma-Aldrich). Setelah itu udara di dalam botol inkubasi dikeluarkan sebanyak 10% dari volume botol inkubasi dengan alat suntik dan kemudian disuntikkan lagi gas asetilen 100% (konsentrasi akhir 10%) untuk menggantikan udara yang telah dikeluarkan tersebut. Kemudian, bintil akar pada perakaran 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 menggunakan alat suntik sebanyak 1 mL untuk kemudian disuntikkan pada kromatografi gas Hewlett Packard 5890 (detektor FID, panjang kolom 1,83 m, 0,318 cm) yang disetel pada suhu oven kolom 90°C, suhu detektor dan ruang injeksi 110°C dan tekanan gas 90 kPa. Gas etilen yang terbentuk kemudian dihitung mengacu pada grafik kurva standar, yaitu hubungan konsentrasi etilen standar dengan luas area yang tampak pada kertas kromatogram. Tabel 1 menunjukkan cara melakukan pengenceran etilen standar untuk memperoleh data untuk pembuatan grafik kurva standar etilen.

$$\text{Aktivitas Nitrogenase} = A / B$$

$$A = \text{mmol Etilen} \times \text{Volume wadah (mL)}$$

$$B = \text{Waktu (jam)} \times \text{jumlah tanaman} \times \text{volume yang diinjeksikan (mL)}$$

Tabel 1. Pembuatan standar etilen berbagai konsentrasi

No.	Volume Erlenmeyer bertutup karet (mL)	Etilen (ppm)	Volume etilen yang ditambahkan (mL)
1.	Etilen 99,5%	995 000	
2.	500	2000	1,0 dari no.1
3.	25	80	1,0 dari no.2
4.	10	8	1,0 dari no.3
5.	10	1	1,3 dari no.4
6.	10	0,8	1,0 dari no.4
7.	10	0,6	0,8 dari no.4
8.	10	0,4	0,5 dari no.4
9.	10	0,2	0,3 dari no.4

### Karakterisasi Kekekabatan dengan Analisis Genom DNA (Susilowati *et al.* 2000)

#### Alat

- Pipet mikro
- Tip mikro 1 mL dan 200  $\mu$ 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<sup>-1</sup> 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  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> proteinase-K),
- Larutan penyangga TE
- Larutan perendaman (1,5  $\mu$ L bovine serum albumin 100x; 15  $\mu$ L larutan penyangga enzim restriksi 10x; 133,5  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O)
- Agarosa (HMA 1%)
- Larutan penyangga 0,5 x tris borat EDTA (TBE) (45 mM trisma basa; 45 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 1,25 mM EDTA (pH 8,0))

## Prosedur

### 1. Preparasi DNA genom in situ

- Tumbuhkan isolat uji pada medium dan suhu pertumbuhan optimum hingga populasi sel mencapai 10<sup>9</sup> 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 disentrifus. Larutkan kembali pelet dengan 0,45 mL larutan PIV lalu tambah 0,9 mL LMA 1,5 % di dalam larutan penyangga 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% polioksi-etilen-2-cetil-eter; 0,2% natrium deoksikolat; 0,5% natrium lauril sarkosin; 1 mg mL<sup>-1</sup> 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<sup>-1</sup> 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 1x TE. Sisipan gel tersebut dapat disimpan pada suhu 4°C hingga siap dilarikan pada elektroforesis dengan cara direndam di dalam larutan penyangga 1x 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 TBE (45 mM trisma base; 45 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 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<sup>-1</sup>) 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.

## **Analisis Kemampuan Pembentukan Bintil Akar *Rhizobium* dengan Marka Gen gus (Akao et al. 1999)**

### **Prinsip**

DNA genom pada *Bradyrhizobium* diintegrasikan dengan gen gus (mengkode β-Glucoronidase) dari transposon tmTn5SSgusA20 yang dibawa oleh plasmid mobil E. coli S17-1. Enzim β-Glucoronidase mampu menghidrolisi substrat 5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide (X-Gluc) menghasilkan produk tak berwarna yang dapat berdifusi ke dalam dan di antara sel. Produk ini pada keadaan oksidatif membentuk dimer yang berwarna biru sehingga *Bradyrhizobium* yang telah ditandai gen gus dapat diamati keberadaannya dalam bintil akar.

### **Alat dan bahan**

- Pipet mikro
- Strain bakteri, plasmid, dan media.
  - Strain *Bradyrhizobium* dan *Escherichia coli* S17-1 yang mengandung transposon mTn5SSgusA20
  - Media untuk donor *E. coli* adalah medium LB yang disuplementasi dengan



Gambar 2. (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 aktivitas  $\beta$ -glucoronidase dalam jaringan bintil akar

spektinomisin ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Untuk resipien adalah medium YM (Vincent 1970) dan medium minimal umum yang mengandung spektinomisin ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) untuk menumbuhkan transkonjugan.

## Prosedur

### 1. Introduksi transposon ke dalam resipien rhizobia

- Kulturkan resipien strain *Bradyrhizobium* ke dalam media cair YM pada suhu  $30^\circ\text{C}$  selama 3 hari dan kulturkan bakteri donor *E. coli* S17-1 yang mengandung mTn5SSgusA20 ke dalam media cair LB pada suhu  $30^\circ\text{C}$  selama semalam.
- Lakukan *plate mating* sesuai Wilson *et al.* (1994) pada media agar cawan YM pada suhu  $30^\circ\text{C}$ .
- Seleksi transkonjugan pada medium GM yang disuplementasi dengan spektinomisin ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) untuk menyeleksi insersi transposon.

### 2. Kemampuan membentuk bintil akar.

- Sterilisasi permukaan benih siratro (*Macroptilium artropurpureum*) dan kedelai (*Glycine max*) cv. Enrei dengan etanol 70% selama 5 menit, lalu 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  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  $\mu$ L X-gluc; and 20  $\mu$ L 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.
- Pada Gambar 2 disajikan contoh dari ekspresi GUS

### Daftar Pustaka

- Akao S, Minakawa Y, Taki H, Khan MK, Yuhashi KI, Nakayama Y, Asis Jr CA, Chebotar V, Kang UG, Minamisawa K, Ridge RW. Use of lacZ and gusA Reporter Genes to Trace the Infection Process of Nitrogen-Fixing Bacteria. 1999. JARQ. 33: 77-84.
- Akao S, Kouchi H. 1984. Light microscopic observation of root hair curling of soybean induced by *Rhizobium* infection. Jpn.J. Soil Sci. Plant Nutr 60: 53-55.
- Allen ON, Allen EA. 1981. The Leguminosae. A source book of characteristic, uses and nodulation. The University of Wisconsin Press, Wisconsin.
- Barbour WM, Wang SH, Stacey G. 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.
- Cathey SE, Boring LR, Sinclair TR. 2010. Assessment of N<sub>2</sub> fixation capability of native legumes from the longleaf pine–wiregrass ecosystem. Environmental and Experimental Botany. 67: 444–450.
- Chen WX, Yan GH, Li JL. 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, Laurent-Fulele E, Willems A, Torck U, Coopman R, Collins MD, Kersters K, Dreyfus B, Gilles M. 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 DC. 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 DC. 1984. Famili III. Rhizobiaceae Conn 1938, 321AL, p. 234-256. In Krieg NR, Holt JE (Eds.) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 1. The William and Wilkins Co., Baltimore.

- Keyser HH, Bohlool BB, Hu TS, Weber DF. 1982. Fast-growing rhizobia isolated from root nodules of soybeans. *Science*. 215: 1631-1632.
- Kundig C, Hennecke H, Gottfert M. 1993. Correlated physical and genetic map of *Bradyrhizobium japonicum* 110 genome. *J. bacteriol.* 175: 613-622.
- Kuykendall LD, Saxena B, Devine TE, Udell SE. 1992. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. *Canadian J. Microbiol.* 38: 501-505.
- Masterson RV, Russel PR, Atherly AG. 1982. Nitrogen fixation (nif) genes and large plasmid of *Rhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* 152: 928-931.
- McClelland M, Jones R, Patel Y, Nelson M. 1987. Restriction nucleases for pulse-field mapping of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* 15: 5985-6005.
- Scholla MH, Elkan GH. 1984. *Rhizobium fredii* sp. nov. a fast-growing species that effectively nodulates soybeans. *Int. J. Sys. bacteriol.* 34: 484-486.
- Somasegaran P, Hoben HJ. 1994. Handbook for Rhizobia. Springer-Verlag, New York.
- Susilowati DN, Saraswati R, Suwanto A, Tjahjoleksono A. 2000. Skisotipe bakteri bintil akar kedelai berdasarkan analisis Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). *Jurnal Bioteknologi Pertanian.* 5 (2): 70-76.
- Suwanto A, Kaplan S. 1989. Physical and genetic mapping of *Rhodobacter spaeroides* 2.4.2. genome: present of two unique circular chromosomes. *J. Bacteriol.* 17: 5850-5859.
- Vincen JM. 1970. A Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria. IBP Handbook 15. Blackwell Scientific Publication. Oxford.
- Willems A, Collins MD. 1993. Phylogenetic analysis of rhizobia and agrobacteria based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *Int. J. Sys. Bacteriol.* 43: 305-313.
- Wilson KJ, Sessitsch A, Akkermans ADL. 1994. Molecular marker as tools to study the ecology of microorganisms. p. 149-156. *In* Ritz K, Dighton J, Giller KE (Eds.) *Beyond the Biomass: Compositioned and Functional Analysis of Microbial Communities*. Chickchester. John Willey. New York.
- Xu LM, Ge C, Cui Z, Li J, Fan H. 1995. *Bradyrhizobium liaoningensis* sp. nov. isolated from the root nodules of soybean. *Int. J. Sys. bacteriol.* 45: 706-711.
- Velázquez E, García-Fraile P, Ramírez-Bahena MH, Rivas R, Martínez-Molina E. 2017. P1-43. Current Status of the Taxonomy of Bacteria Able to Establish Nitrogen-Fixing Legume Symbiosis. *In* Zaidi et al. (Eds.), *Microbes for Legume Improvement*, DOI 10.1007/978-3-319-59174-2\_1. © Springer International Publishing AG 2017 1.
- Yanagi M, Yamasato K. 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 JPW, Downer HL, Eardly BD. 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 JPW, Haukka KE. 1996. Diversity and phylogeny of rhizobia. *New Phytol.* 133: 87-94.

## 2.5

# SIANOBAKTERI

Jati Purwani

Sianobakteri (*Cyanobacteria*) yang dulu dikenal dengan ganggang hijau-biru (*blue green algae*, BGA) adalah prokariotik fotosintetik, mengandung klorofil dan menghasilkan oksigen sebagai produk dari hasil fotosintesis (Wim 2001). Sianobakteri mampu menambat nitrogen karena mengandung enzim nitrogenase, sehingga penting untuk kesuburan tanah. Sianobakteri mampu meningkatkan fungsi tanah diantaranya meningkatkan kandungan karbon dan nitrogen, agregasi dan stabilitas tanah, serta status air tanah (Mager *et al.* 2011, Chamizo *et al.* 2012). Fungsi tersebut terkait dengan kemampuannya untuk mensekresi eksopolisakarida (EPS) dalam jumlah besar (Mazor *et al.* 1996, Rossi *et al.* 2018). Sianobakteri banyak digunakan dalam revitalisasi tanah dan sebagai pupuk hayati khususnya untuk padi sawah, namun demikian Eginarta *et al.* (2021) mengungkapkan bahwa pupuk hayati sianobakteri mampu meningkatkan hasil padi gogo. Hal ini menjadi harapan bahwa penggunaan pupuk hayati sianobakteri tidak terbatas hanya di lingkungan sawah saja.

Sianobakteri ada di tanah dan lingkungan perairan (air tawar dan laut), berbentuk sel tunggal, koloni atau menyerupai benang/serabut, dan beberapa bersimbiosis dengan tanaman pakis air *Azolla*. Ukuran sel berkisar 1-6  $\mu\text{m}$ . Lingkungan padi sawah mendukung pertumbuhan sianobakteri. Selain itu beberapa faktor luar juga sangat mempengaruhi pertumbuhannya, antara lain cahaya, suhu, pengeringan dan pembasahan tanah, dan kandungan hara tanah. Studi mengenai ekologi sianobakteri pada tanah sangat sedikit karena masalah metodologi, utamanya untuk menghitung biomasnya baik secara kualitatif maupun kuantitatif. Isolasi dari habitat alami bertujuan untuk memindahkannya ke kondisi buatan yang kondusif untuk mendapatkan biakan murni. Metode isolasi yang biasa digunakan sama seperti bakteri atau cendawan (Venkataraman 1969).

### Isolasi, Pemurnian, dan Pemeliharaan

#### Prinsip

Sianobakteri dapat diisolasi dari tanah baik di atas permukaan maupun di bawah permukaan tanah sampai pada kedalaman 10 cm. Sianobakteri yang dapat menambat nitrogen adalah yang mampu tumbuh pada kondisi media bebas nitrogen. Beberapa metode kultur media telah diketahui efektif untuk menumbuhkan sianobakteri berbentuk sel tunggal, serabut, maupun multiseluler. Media padat untuk isolasi lebih disukai dan telah terbukti lebih berhasil daripada dengan media cair meskipun beberapa spesies lebih mudah dipelihara dengan menggunakan media cair.

**Alat**

- Cawan Petri
- Tabung reaksi
- Pipet mikro 1 mL
- Pinset
- Alat pengocok (vortex)
- Labu Erlenmeyer
- Inkubator
- Lampu fluoresen
- Autoclave

**Media Fogg's (media bebas nitrogen)**

- Siapkan 0,2 g  $K_2HPO_4$ ; 0,2 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; dan 0,1 g  $CaCl_2 \cdot 7H_2O$
- Siapkan larutan A5 1,0 mL
  - Timbang 2,5 g  $H_3BO_3$ ; 1,8 g  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ ; 0,2 g  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ; dan 0,05 g  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ . Larutkan bahan-bahan tersebut ke dalam 1.000 mL akuades.
- Siapkan larutan Fe-EDTA 1,0 mL
  - Larutkan 26,1 g ethylenediaminetetra-acetic acid (EDTA) dalam larutan KOH 1 M, kemudian tambahkan 24,9 g  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , jadikan volume menjadi 1 L. Aerasikan larutan semalam untuk menghasilkan kompleks stabil yang ditandai oleh perubahan warna menjadi coklat (Satu mL larutan ini dalam 1 L media cair memberikan  $5 \mu g mL^{-1}$  besi).
- Larutkan semua bahan yang disiapkan di atas dengan akuades sampai volume 1.000 mL. Atur pH media hingga 7,5 dengan HCl atau NaOH.
- Untuk membuat media Fogg's padat, tambahkan 10-15 g agar ke dalam 1.000 mL media cair.

**Prosedur**

## 1. Isolasi

- Siapkan tabung reaksi untuk beberapa tingkat pengenceran.
- Sebanyak 10 g contoh tanah disuspensikan ke dalam 100 mL media Fogg's cair yang sudah steril. Selanjutnya dikocok untuk mendapatkan suspensi yang merata.
- Buat pengenceran dengan memipet 1 mL suspensi ke dalam tabung reaksi berisi 9 mL media steril
- Pindahkan 1 mL dengan menggunakan pipet mikro pada masing-masing pengenceran ke cawan petri yang sudah disterilkan.
- Tuangkan 10 -15 mL media agar steril yang masih cair (suhu  $\pm 50^\circ C$  pada cawan Petri dan putar cawan untuk memperoleh penyebaran yang merata, selanjutnya inkubasi pada suhu kamar ( $\pm 30^\circ C$ ) di bawah cahaya terus menerus dengan lampu neon putih

- Media agar disterilisasi dengan autoklaf selama 20 menit pada suhu 120°C dan tekanan 0,1 MPa.
- Dengan metode ini koloni dapat dihitung. Amati, ambil segera satu koloni yang cepat tumbuh menggunakan pinset dan subkulturkan.

## 2. Pemurnian

- Ambil sedikit strain sianobakteri pada koloni dari kultur yang diperkaya pada cawan agar dengan jarum inokulasi steril ke cawan agar steril yang lain.
- Untuk perkembangan sianobakteri dari sel tunggal, pisahkan unit sianobakteri dari kontaminan (bakteri, sianobakteri lainnya, atau cendawan) dengan cara menggoresnya pada permukaan agar.
- Sel tunggal bebas kontaminan dapat dipindahkan 2-4 hari setelah inkubasi. Apabila diperlukan prosedur penggoresan kedua dapat dilakukan untuk mengurangi kontaminan.
- Setelah murni, kulturkan dan inkubasi kembali. Kemudian ambil kultur dengan pipet, amati di bawah mikroskop apakah sudah diperoleh kultur murni. Beberapa bentuk morfologi sianobakteri dapat dilihat pada Gambar lampiran.

## 3. Pemeliharaan

- Pemeliharaan sianobakteri bisa dilakukan dengan menggunakan 1-1,5% agar miring atau ditumbuhkan pada 250 mL botol yang mengandung 100 mL media Fogg's cair steril pada kondisi cahaya.
- Inkubasi pada suhu ruang dan kondisi cahaya terus menerus.

## **Enumerasi Populasi dengan MPN (Allen 1957, Oran 1995)**

### **Prinsip**

Metode MPN (most probable number) didasarkan pada penentuan ada atau tidak adanya sianobakteri dari tiap deret pengenceran baik yang diisolasi dari tanah ataupun dari bahan yang lain (Alexander 1982). Metode ini sesuai untuk keadaan dimana sianobakteri yang tumbuh adalah sebagai sel tunggal motil atau non-motil, seperti *Chlorococcum* (Shield 1982).

### **Alat**

- Inkubator
- Tabung Erlenmeyer 200 mL
- Tabung reaksi bertutup diameter 25 mm atau botol bertutup ulir 57-113 mL.
- Mikroskop
- Objek gelas (slide) dan penutupnya
- Manik-manik kaca (2 mm)
- Pengocok

## Bahan kimia dan larutan

Salah satu dari larutan berikut (Bristols atau Wilson)

- Larutan Bristols
  - Larutkan 1,0 g  $\text{NaNO}_3$ ; 1,0 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 0,3 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,1 g  $\text{NaCl}$ , dan sedikit  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ke dalam 800 mL akuades dan tambahkan hingga menjadi 1.000 mL.
- Larutan Wilson
  - Larutkan 1,0 g  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ; 0,25 g  $\text{KCl}$ ; 0,25 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,25 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; dan 0,3 g  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ke dalam 800 mL akuades dan tambahkan hingga menjadi 1.000 mL.
- Air blanko steril (Clarke 1965; Wollum 1982)
  - Botol bertutup ulir yang mengandung 36 manik-manik kaca (tujuan penggunaan manik-manik kaca adalah untuk memudahkan pemisahan agregat tanah) dan 95 mL air atau (190 mL air dan 72 manik-manik kaca).
  - Botol bertutup yang mengandung 90 mL air dan tanpa manik-manik kaca. Tutuplah semua botol, kemudian sterilisasi dengan autoklaf dengan suhu  $121^\circ\text{C}$  dan tekanan 0,1 Mpa selama 15 menit. Untuk sampel tanah tunggal, satu air blanko dengan manik-manik kaca, dan kira-kira tujuh tanpa manik-manik kaca.

## Prosedur

- Siapkan seri pengenceran.
- Untuk masing-masing contoh tanah, buat satu pengencer blanko yang mengandung 95 mL pengencer dan 15-20 manik-manik kaca.
- Buatlah 90 mL pengenceran blanko dengan pengencernya.
- Tutuplah botol, kemudian sterilisasi dengan autoklaf selama 20 menit dan dinginkan pada suhu ruang.
- Masukkan 10 g tanah lembap ke dalam blanko yang mengandung 95 mL air dengan manik-manik kaca (alternatif, 20 g tanah ke dalam 190 mL blanko dengan manik-manik kaca). Tutuplah botol dengan rapat dan goyang selama 10 menit pada posisi horizontal pada alat penggoyang.
- Setelah 10 menit ambil botol dari penggoyang, goyang botol dengan tangan untuk beberapa detik dan segera pindahkan 10 mL suspensi ke dalam 90 mL air blanko menggunakan pipet steril (pengenceran  $10^{-2}$ ). Buatlah pengenceran sampai  $10^{-7}$ .
- Dari masing-masing serial pengenceran, pindahkan 1 mL pada masing-masing botol yang mengandung media diperkaya steril.
- Inkubasi pada suhu  $22^\circ\text{C}$  selama 4 minggu pada kondisi cahaya (bisa menggunakan lampu fluoresen)
- Amati ada tidaknya pelikel (cincin) di permukaan tabung pada masing-

masing pengenceran. Catat tabung yang memiliki pelikel yang berarti positif ada sianobakteri.

- Hitung jumlah populasi dengan tabel MPN seperti terlampir.

### Perhitungan

Misalnya jumlah tabung yang digunakan untuk tiap pengenceran  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  adalah lima tabung. Pada akhir inkubasi jumlah tabung yang menunjukkan adanya pelikel adalah empat tabung pada pengenceran  $10^{-4}$ , dua tabung pada pengenceran  $10^{-5}$ , dan satu tabung pada pengenceran  $10^{-6}$ . Dari tabel MPN (pada lampiran), nilai MPN 4 2 1 ini adalah 2,6 yang berarti jumlah populasi sianobakteri  $2,6 \times 10^5$  sel per 1 mL suspensi. Apabila suspensi yang dibuat berasal dari 1 g tanah dalam 100 mL medium, maka jumlah sianobakteri per g tanah adalah  $2,6 \times 10^7$  sel  $g^{-1}$ .

## Enumerasi Populasi dengan Mikroskop (Allen 1957, Oran 1995)

### Prinsip

Enumerasi populasi dengan mikroskop adalah metode kuantitatif berdasarkan pengamatan langsung. Pendugaan sianobakteri adalah melalui cahaya berpendar pada pigmennya. Individu spesies dapat lebih cepat diidentifikasi dengan mikroskop transmisi cahaya (Shield 1982). Penggunaan Haemocytometer Neubour memiliki kelebihan, karena hemat biaya, dan cepat dalam menghasilkan data. Namun mempunyai kelemahan dikarenakan tidak dapat membedakan antara sel yang mati dan sel yang hidup secara keseluruhan, dan data yang dihasilkan tidak akurat karena setiap pengamat memiliki keterbatasan dalam melihat serta menghitung sel yang ada dalam kamar Haemocytometer Neubour berbeda-beda (Gandjar *et al.* 2006 cit Anonim 2021 <https://alponsin.wordpress.com/2019/01/05/counting-chamber/>).

### Alat

- Mikroskop fluoresen atau mikroskop transmisi cahaya biasa.
- Haemositometer chamber dengan tutup, kedalaman ruang 0,1 mm.

### Prosedur

- Tempatkan 20 g tanah ke dalam botol steril bertutup (225-450 mL) dan tambahkan air steril sampai volume 100 mL. Goyang botol selama 10 menit dengan alat penggoyang.
- Hal yang sama juga siapkan suspensi yang mengandung 10 g dan 5 g tanah, sehingga diperoleh suspensi perbandingan tanah/air adalah 1:5, 1:10, dan 1:20. Persiapan awal ini untuk pengamatan mikroskop.
- Fokuskan kondenser dari sumber cahaya untuk menghasilkan sinar yang paralel.
- Sisipkan filter biru di antara sumber cahaya dengan mikroskop.

- Tambahkan satu tetes minyak mineral di kondenser dan ruang hitung.
- Kurangi intensitas cahaya dan fokuskan, kemudian tingkatkan untuk mendapatkan tingkat yang optimum.

### Penghitungan:

- Contoh: Dengan menggunakan x 10 lensa objektif dan x 5 lensa okuler, jumlah sel 50 (sel berbentuk serabut terlihat sebagai garis merah).
- Konversi jumlah rata-rata dari jumlah hitungan pada mikroskop (ruang haemositometer/*counting chamber*) dengan jumlah per g tanah yaitu dengan membagi rata-rata jumlah sel dalam ruang haemositometer dengan tanah kering yang diwakili oleh volume larutan yang terdapat dalam satu daerah mikroskop atau haemositometer. *Counting chamber* merupakan objek glass yang tebal yang mempunyai 25 kotak besar dan setiap kotak besar memiliki 16 kotak kecil didalamnya. Adapun rumus yang digunakan yaitu :

$$\text{Rumus } \sum \text{ sel} = \frac{\sum(\text{kotak I} + \dots + \text{kotak V})}{5} \times \frac{25}{0,1 \text{ mm}^3}$$

### Daftar Pustaka

- Anonim 2021. <https://alponsin.wordpress.com/2019/01/05/counting-chamber/>.
- Alexander M. 1982. Most probable number method for microbial populations. p 815-820. *In* Page AL, Miller RH, Keeney DR (Eds.) *Methods of Soil Analysis, Part 2, Chemical and Microbiological Properties*. Agronomy Monograph 9.
- Allen ON. 1957. *Experiment in Soil Bacteriology*, 3rd ed. Burgess Publishing Co., Minneapolis, MN
- Allen MM. 1968. Simple conditions for growth of unicellular blue-green algae on plates. *J. Phycol.* 4: 1-4
- Castenholz RW. 1970. Laboratory Culture of thermophylic cyanophytes. *Shweiz Z Hydrol* 32: 538-551
- Chamizo S, Cantón Y, Miralles I, Domingo F. 2012. Biological soil crust development affects physicochemical characteristics of soil surface in semiarid ecosystems. *Soil. Biol. Biochem.* 49: 96–105
- Chu SP. 1942. The influence of the mineral composition of the medium on the growth of planktonic algae, methods and cultural media. p 284-325. *In* Schinner F, Ohlinger R, Kandeler E, Margesin R (Eds.) *Methods in Soil Biology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Clarke FE. 1965. Agar plate method for total microbial count. p 1460-1466. *In* Black CA, Evans DD, Ensminger EN, White JL, Clarke FE (Eds.) *Methods of Soil Analysis, Part 2: Chemical and Microbial Properties*. ASA-SSSA, Madison.

- De Man JC. 1983. MPN Tables, corrected. Eur. J. Appl, Microbiol. Biotechnol. 17: 301-305
- Eginarta WS, Nuraini Y, Purwani J. 2021. Efektivitas Berbagai Bahan Formula Pupuk Hayati Sianobakteri Terhadap Pertumbuhan Dan Hasil Padi Gogo Varietas Situ Bagendit. Jurnal Tanah dan Sumberdaya Lahan Pertanian Vol 8 No 2: 415-426, 2021 e-ISSN:2549-9793,
- FAO. 1981. Blue Green Algae for Rice Production. FAO Soil Bulletin 46.
- Hughes EO, Gorham PR, Zehnder A. 1958. Toxicity of a unialgal culture of *Microcystis aeruginosa*. Can. J. Microbiol. 4: 225-236
- Mager DM, Thomas AD. 2011. Extracellular polysaccharides from cyanobacterial soil crusts: a review of their role in dryland soil processes. J. Arid. Environ. 75: 91–97
- Mazor G, Kidron GJ, Vonshak A, Abeliovich A (1996) The role of cyanobacterial exopolysaccharides in structuring desert microbial crusts. FEMS. Microbiol. Ecol 21: 121–130
- Oran S. 1995. Isolation and counting of Cyanobacteria. p 191-185 In Alef K, Nannipieri P (Eds.) Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry. Academic Press. London.
- Rossi F, Mugnai G, De Philippis R (2018) Complex role of the polymeric matrix in biological soil crusts. Plant. Soil. 429:19–34
- Rippka R, Deruelles J, Waterbury J, Herdman M, Stanier R. 1979. Generic assignments, strain histories, and properties of pure cultures of cyanobacteria. J. Gen. Microbiol. 111: 1-61.
- Shield LM. 1982. Algae. p. 1093-1101. In Page AL, Miller RH, Keeney DR (Eds.) Methods of Soil Analysis, Part 2, Chemical and Microbiological Properties. Agronomy Monograph 9. Madison.
- Venkataraman GS. 1969. The Cultivation of Algae. Indian Council of Agric. Res., New Delhi. 319 p.
- Wim FJ M. 2001. Photosynthesis and respiration in *Cyanobacteria*. Encyclopedia of Life Sciences 2001, John Wiley & Sons, Ltd.
- Wollum AG. 1982. Cultural methods for soil microorganisms. p 781-802. In Methods of Soil Analysis, Part 2: Chemical and Microbial Properties, 2nd ed. Agronomy Monograph No. 9. ASA-SSSO, Madison

## Lampiran 1. Beberapa media yang diperkaya untuk penetapan Sianobakteri

Nama media	Kandungan
Medium Chu (1942) yang dimodifikasi	0,04 g Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ; 0,01 atau 0,005 mg K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 0,025 g MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O; 0,02 g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ; 0,025 g Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> ; 0,8 mg FeCl <sub>3</sub> ; 1.000 mL akuades
Medium Knop modifikasi	1 g KNO <sub>3</sub> ; 0,1 g Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ; 0,2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 0,1 g MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O; 1 mg FeCl <sub>3</sub> ; 1.000 mL akuades
Medium Detmer dimodifikasi oleh Venkataraman (1969)	1 g Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ; 0,25 g KCl; 0,25 g MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O; 0,25 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; tetes sedikit larutan 1% FeCl <sub>3</sub> ; 1.000 mL akuades
Medium A (Allen, 1968) dimodifikasi dari Hughes et al. (1968)	1,5 g NaNO <sub>3</sub> ; 0,039 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 0,075 g MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O, 0,02 g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ; 0,027 g CaCl <sub>2</sub> ; 0,058 g Na <sub>2</sub> SiO <sub>2</sub> .9H <sub>2</sub> O; 0,001 g EDTA, 0,006 g asam sitrat; 0,006 g <i>ferrous citrate</i> ; 1,0 mL larutan unsur mikro; 1.000 mL akuades; atur pH sampai 7,8. Untuk membuat media padat, tambahkan 1,5% agar <u>Larutan unsur mikro:</u> 2,86 g H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub> ; 1,81 g MnCl <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O; 0,222 g ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O; 0,391 g Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O; 0,079 g CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O; 0,0494 g Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O; 1.000 mL akuades.
Medium B (Castenholz, 1970)	0,1 g <i>nitrilotriacetic acid</i> ; 0,06 g CaSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O; 0,1 g MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O; 0,008 g NaCl; 0,103 g KNO <sub>3</sub> ; 0,689 g NaNO <sub>3</sub> ; 0,111 g NaHPO <sub>4</sub> ; 1 mL FeCl <sub>3</sub> ; 0,5 mL larutan unsur mikro; 1.000 mL akuades. Atur pH sampai 8,2 dengan NaOH 1M yang akan memberikan pH akhir 7,5-7,6. <u>Larutan unsur mikro</u> 2,28 g MnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O; 0,5 g ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O; 0,5 g H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ; 0,025 g CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O; 0,025 g Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O; 0,045 g CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O; 0,5 mL H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; 1.000 mL akuades.
Rippka et al, 1979	Media BG11 <u>Larutan Stok 1</u> 0,1 Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O, 0,6 g ferric ammonium citrate 0,6 g, citric acid 0,6 g, 3,6 g CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O, 1000 mL akuades <u>Larutan Stok 2</u> 7,5 g MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O, 1000 mL akuades <u>Larutan stok 3</u> 4,0 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .3H <sub>2</sub> O atau 3,05 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1000 mL akuades <u>Larutan stok 4 (mikroelemen)</u> 2,86 g H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> , 1,81 g MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O, 1,81 g MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O, 0,222 g ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O, 0,079 g CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O, 0,050 g CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O, 0,390 g Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O, 1000 mL akuades <u>BG11-media</u> 10 mL stok 1. 10 mL stok 2, 10 mL stok 3, 0,02 g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , 1 ml stok 5, 1,5 g NaNO <sub>3</sub> (dihilangkan untuk sianobakteri heterosistus)

Lampiran 2. Morfologi beberapa Sianobakteri

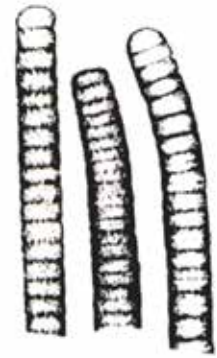
Kebanyakan dari spesies Sianobakteri yang dapat menambat nitrogen terdiri dari genus, Gloeocapsa, Lyngbya, Oscillatoria, Plectonema, Anabaena, Anabaenopsis, Aulosira, Calothrix, Chlorogloea, Cylindrica spermum, Fischerella, Haplosiphon, Nostoc, Scytonema, Stigonema, Tolypothrix, Westielopsis (FAO 1981). Beberapa jenis dapat dibedakan sebagai berikut:



*Gloeocapsa*



*Lyngbya*



*Oscillatoria*



*Anabaena*



*Nostoc*



*Anabaenopsis*



*Cylindrospermum*



*Chlorogloea*



*Plectonema*



*Gloeotrichia*



*Nodularia*



*Tolypothrix*



*Scytonematopsis*



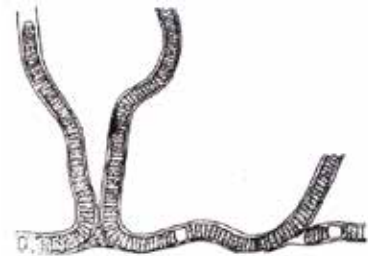
*Calothrix*



*Rivularia*



*Aulosira*



*Scytonema*

Lampiran 3. Tabel MPN untuk penghitungan populasi (De Man, 1983)

3 x 1; 3 x 0,1; 3 x 0,01				5 x 1; 5 x 0,1; 5 x 0,01							
Tabung pengenceran positif			MPN	Tabung pengenceran positif			MPN	Tabung pengenceran positif			MPN
0	0	0	<30	0	0	0	<0,18	4	0	3	2,50
0	0	1	0,30	0	0	1	0,18	4	1	0	1,70
0	1	0	0,30	0	1	0	0,18	4	1	1	2,10
0	1	1	0,61	0	1	1	0,36	4	1	2	2,60
0	2	0	0,62	0	2	0	0,37	4	1	3	3,10
0	3	0	0,94	0	2	1	0,55	4	2	0	2,20
1	0	0	0,36	0	3	0	0,56	4	2	1	2,60
1	0	1	0,72	1	0	0	0,20	4	2	2	3,20
1	0	2	1,10	1	0	1	0,40	4	2	3	3,80
1	1	0	0,74	1	0	2	0,60	4	3	0	2,70
1	1	1	1,10	1	1	0	0,40	4	3	1	3,30
1	2	0	1,10	1	1	1	0,61	4	3	2	3,90
1	2	1	1,50	1	1	2	0,81	4	4	0	3,40
1	3	0	1,60	1	2	0	0,61	4	4	1	4,00
2	0	0	0,92	1	2	1	0,82	4	4	2	4,70
2	0	1	1,40	1	3	0	0,83	4	4	0	4,10
2	0	2	2,00	1	3	1	1,00	4	5	1	4,80
2	1	0	1,50	1	4	0	1,10	5	5	0	2,30
2	1	1	2,00	2	0	0	0,45	5	0	1	3,10
2	1	2	2,70	2	0	1	0,68	5	0	2	4,30
2	2	0	2,10	2	0	2	0,91	5	0	3	5,8
2	2	1	2,80	2	1	0	0,68	5	0	0	3,30
2	2	2	3,50	2	1	1	0,92	5	1	1	4,60
2	3	0	2,90	2	1	2	1,20	5	1	2	6,30
2	3	1	3,60	2	2	0	0,93	5	1	3	8,40
3	0	0	2,30	2	2	1	1,20	5	1	0	4,90
3	0	1	3,80	2	2	2	1,40	5	2	1	7,00
3	0	2	6,40	2	3	0	1,20	5	2	2	9,40
3	1	0	4,30	2	3	1	1,40	5	2	3	12,00
3	1	1	7,50	2	4	0	1,50	5	2	4	15,00
3	1	2	12,00	3	0	0	0,78	5	2	0	7,90
3	1	3	16,00	3	0	1	1,10	5	3	1	11,00
3	2	0	9,30	3	0	2	1,30	5	3	2	14,00
3	2	1	15,00	3	1	0	1,10	5	3	3	17,00
3	2	2	21,00	3	1	1	1,40	5	3	4	21,00
3	2	3	29,00	3	1	2	1,70	5	3	0	13,00
3	3	0	24,00	3	2	0	1,40	5	4	1	17,00
3	3	1	46,00	3	2	1	1,70	5	4	2	22,00
3	3	2	110,00	3	2	2	2,00	5	4	3	28,00
3	3	3	>110	3	3	0	1,70	5	4	4	35,00
				3	3	1	2,10	5	4	5	43,00
				3	3	2	2,40	5	5	0	24,00
				3	4	0	2,10	5	5	1	35,00
				3	4	1	2,40	5	5	2	54,00
				3	5	0	2,50	5	5	3	92,00
				4	0	0	1,30	5	5	4	160,00
				4	0	1	1,70	5	5	5	>160
				4	0	2	2,10				

*The paramount evolutionary accomplishment of bacteria as a group is rapid, efficient cell growth in many environments.*

J. L. Ingraham, O. Maaloe, and F. C. Neidhardt

## 2.6

# MIKROBA PELARUT FOSFAT

*Edi Santosa, Etty Pratiwi*

Fosfor merupakan hara makro terpenting kedua yang dibutuhkan oleh tanaman, setelah nitrogen (Nursyamsi & Setyorini 2009). Namun ketersediaan bentuk P terlarut untuk tanaman di dalam tanah terbatas karena fiksasinya sebagai fosfat tak larut dari besi, aluminium, dan kalsium di dalam tanah (Buckman & Brady 1974). Sebagian besar tanah memiliki jumlah P yang cukup tinggi, tetapi sebagian besar berada dalam bentuk tidak tersedia bagi tanaman. Tanah dengan P total rendah dapat dilengkapi dengan pupuk P. Sekitar 75–90% dari pupuk P kimia yang ditambahkan diendapkan oleh kompleks kation logam dan dengan cepat menjadi terfiksasi di dalam tanah dan memiliki efek jangka panjang yang berdampak terhadap lingkungan dalam hal eutrofikasi, penipisan kesuburan tanah, dan jejak karbon (Sharma *et al.* 2013).

Mikroba tanah merupakan bagian integral dalam siklus fosfor alami. Penggunaan mikroba pelarut fosfat (MPF) sebagai pupuk hayati untuk peningkatan pertanian telah menjadi subjek penelitian selama bertahun-tahun. Kajian ini dimaksudkan untuk memberikan gambaran singkat tentang ketersediaan P tanah dan keanekaragaman MPF, mekanisme pelarutan P, dan isolasi dan penapisan MPF sebagai komponen pupuk hayati.

### **Ketersediaan Fosfor dalam Tanah**

Fosfor adalah unsur reaktif dan tidak ada sebagai bentuk unsur di dalam tanah. Fosfor di dalam tanah berada sebagai fosfor anorganik yang tidak larut dan fosfor organik yang tidak larut (Sharma *et al.* 2013). Akibatnya, defisiensi fosfor sangat membatasi pertumbuhan dan hasil tanaman.

Tanaman dapat mengambil P dalam beberapa bentuk, tetapi sebagian besar diserap dalam bentuk anion fosfat terutama  $\text{HPO}_4^{2-}$  atau  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  tergantung pada pH tanah (Kumar *et al.* 2018). Masukan utama P anorganik pada tanah pertanian adalah pemberian pupuk fosfor. Hampir 70-90% pupuk fosfor yang diaplikasikan ke tanah difiksasi oleh kation dan mengubah P anorganik (Walpola & Yoon 2012). P diimobilisasi oleh kation seperti  $\text{Ca}^{2+}$  di tanah berkapur atau tanah normal untuk membentuk kompleks kalsium fosfat ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) dan dengan  $\text{Al}^{3+}$  dan  $\text{Fe}^{3+}$  di tanah asam untuk membentuk aluminium fosfat (AlPO) dan besi fosfat (FePO). Kompleks P dan kation atau anion ini menjadikan P berada dalam bentuk yang tidak larut dan akibatnya tidak tersedia.

Tabel 1. Keanekaragaman MPF (Sumber: Sharma et al. 2013)

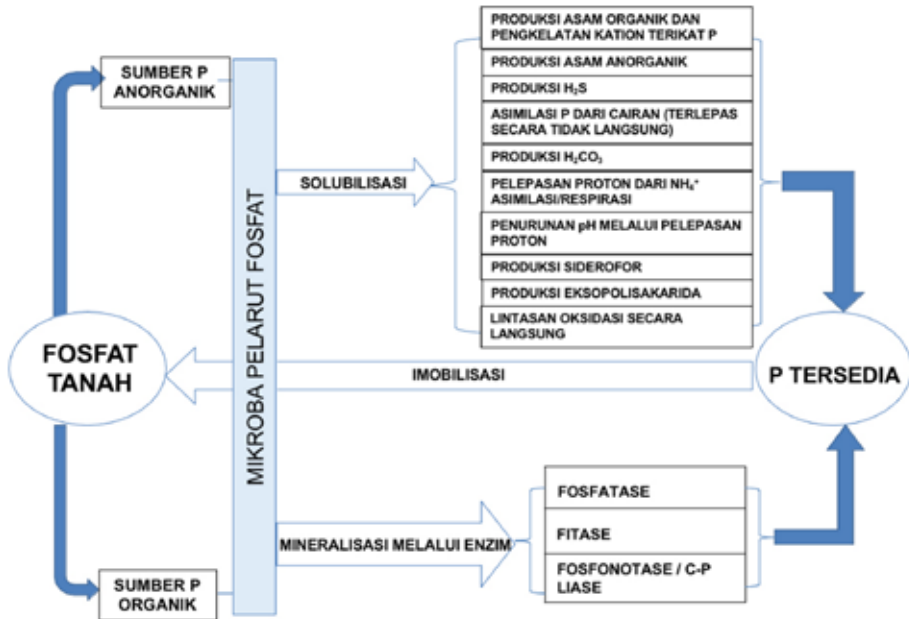
Bakteri	<i>Alcaligenes</i> sp., <i>Aerobacter aerogenes</i> , <i>Achromobacter</i> sp., <i>Actinomadura oligospora</i> , <i>Agrobacterium</i> sp., <i>Azospirillum brasilense</i> , <i>Bacillus</i> sp., <i>Bacillus circulans</i> , <i>B. cereus</i> , <i>B. fusiformis</i> , <i>B. pumils</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>B. mycoides</i> , <i>B. polymyxa</i> , <i>B. coagulans</i> , <i>B. chitinolyticus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>Bradyrhizobium</i> sp., <i>Brevibacterium</i> sp., <i>Citrobacter</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp., <i>P. putida</i> , <i>P. striata</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>P. calcis</i> , <i>Flavobacterium</i> sp., <i>Nitrosomonas</i> sp., <i>Erwinia</i> sp., <i>Micrococcus</i> sp., <i>Escherichia intermedia</i> , <i>Enterobacter asburiae</i> , <i>Serratia phosphoticum</i> , <i>Nitrobacter</i> sp., <i>Thiobacillus ferrooxidans</i> , <i>T. thiooxidans</i> , <i>Rhizobium meliloti</i> , <i>Xanthomonas</i> sp.
Fungi	<i>Aspergillus awamori</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. terreus</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. nidulans</i> , <i>A. foetidus</i> , <i>A. wentii</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Alternaria teneius</i> , <i>Achrothcium</i> sp., <i>Penicillium digitatum</i> , <i>P. lilacinium</i> , <i>P. balaji</i> , <i>P. funiculosum</i> , <i>Cephalosporium</i> sp., <i>Cladosporium</i> sp., <i>Curvularia lunata</i> , <i>Cunninghamella</i> , <i>Candida</i> sp., <i>Chaetomium globosum</i> , <i>Humicola insolens</i> , <i>Humicola lanuginosa</i> , <i>Helminthosporium</i> sp., <i>Paecilomyces fusisporous</i> , <i>Pythium</i> sp., <i>Phoma</i> sp., <i>Populospora mytilina</i> , <i>Myrothecium roridum</i> , <i>Mortierella</i> sp., <i>Micromonospora</i> sp., <i>Oideodendron</i> sp., <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Rhizopus</i> sp., <i>Mucor</i> sp., <i>Trichoderma viridae</i> , <i>Torula thermophila</i> , <i>Schwanniomyces occidentalis</i> , <i>Sclerotium rolfsii</i> .
Actinomycetes	<i>Actinomyces</i> sp., <i>Streptomyces</i> sp.
Cyanobacteria	<i>Anabaena</i> sp., <i>Calothrix braunii</i> , <i>Nostoc</i> sp., <i>Scytonema</i> sp.,
Mikoriza	<i>Glomus fasciculatum</i>

### Keanekaragaman Mikroba Pelarut Fosfat

Mikroba pelarut fosfat (MPF) adalah kelompok mikroba menguntungkan yang mampu menghidrolisis senyawa fosfor organik dan fosfor anorganik dari senyawa yang tidak larut.

Sejumlah besar spesies mikroba menunjukkan kapasitas pelarutan P, meliputi bakteri, fungi, Actinomycetes dan bahkan Cyanobacteria (Tabel 1). Bakteri *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Escherichia*, dan *Xanthomonas*, serta fungi *Aspergillus*, *Penicillium*, dan *Culvularia* dan golongan Actinomycetes 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



Gambar 1. Skema pelepasan P tanah oleh mikroba pelarut P (Modifikasi dari Sharma et al. 2013)

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. Pada umumnya fungi pelarut P menghasilkan lebih banyak asam daripada bakteri dan akibatnya menunjukkan aktivitas pelarut P yang lebih besar (Venkateswarlu et al. 1984).

### Mekanisme Pelepasan P oleh Mikroba

Mekanisme pelepasan P tanah oleh mikroba disajikan pada Gambar 1. 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 tanaman sangat terbatas.

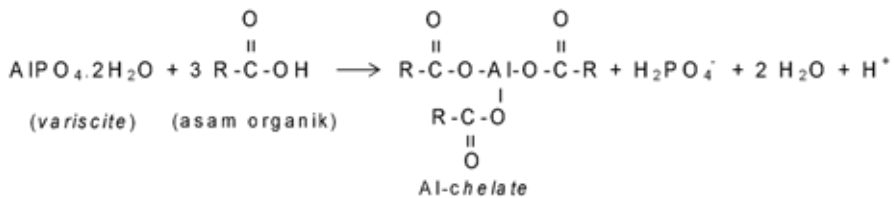
Mineral fosfat anorganik pada umumnya terikat sebagai  $\text{AlPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (*variscite*) dan  $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (*strengite*) pada tanah masam dan sebagai  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (trikalsium fosfat) pada tanah basa. Asam-asam organik sangat berperan 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 khelat (Wagner & Wolf 1998). Asam-asam organik mengkhelat 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.

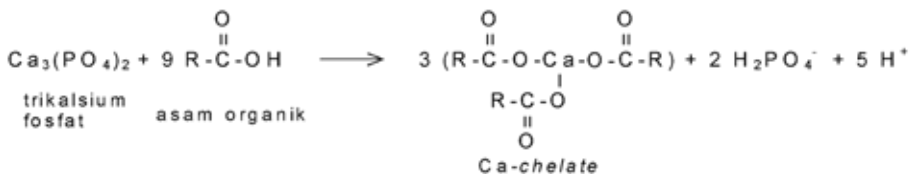
### 1. Menurunkan pH Tanah

Mekanisme utama pelarutan P tanah adalah menurunkan pH tanah melalui produksi mikroba asam organik atau pelepasan proton (Kalayu 2019). Pada tanah alkalin, fosfat dapat mengendap membentuk kalsium fosfat, termasuk fosfat batuan (*fluorapatite* dan *francolite*), yang tidak larut dalam tanah. MPF meningkatkan ketersediaan P dengan menghasilkan asam organik yang menurunkan pH tanah. Produksi asam organik ditambah dengan penurunan pH oleh aksi mikroba mengakibatkan pelarutan P (Aseri *et al.* 2009). Ketika pH tanah meningkat, bentuk divalen dan trivalen dari P anorganik,  $\text{HPO}_4^{-2}$  dan  $\text{HPO}_4^{-3}$  akan meningkat di dalam 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:



Asam organik merupakan produk metabolisme mikroba, sebagian besar melalui respirasi oksidatif atau fermentasi ketika glukosa digunakan sebagai sumber karbon. Jenis dan jumlah asam organik yang dihasilkan oleh mikroba yang berbeda akan berbeda pula. Efisiensi kelarutan tergantung pada kekuatan dan sifat asam. Selain itu, asam trikarboksilat dan dikarboksilat lebih efektif dibandingkan dengan asam monobasa dan aromatik, dan asam alifatik juga ditemukan lebih efektif dalam pelarutan fosfat dibandingkan dengan asam fenolik, sitrat, dan fumarat. Asam organik yang melarutkan fosfat terutama sitrat, laktat, glukonat, ketoglukonat, oksalat, glikonik, asetat, malat, fumarat, suksinat, tartarat, malonat, glutarat, propionat, butirat, glioksalat, dan asam adipat. Dari jumlah tersebut, asam glukonat dan asam ketoglukonat tampaknya menjadi agen pelarutan mineral fosfat yang paling sering. Asam glukonat dilaporkan sebagai asam organik utama yang dihasilkan oleh bakteri pelarut fosfat

seperti *Pseudomonas* sp., *Erwinia herbicola*, dan *Burkholderia cepacia* (Alam *et al.* 2002). Asam organik lain yang diidentifikasi dalam strain dengan kemampuan melarutkan fosfat adalah asam 2-ketoglukonat, yang terdapat dalam *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium meliloti*, dan *Bacillus firmus*. Strain *Bacillus licheniformis* dan *Bacillus amyloliquefaciens* ditemukan menghasilkan campuran asam laktat, isovaler, isobutirat, dan asetat. Dilaporkan bahwa bakteri Gram-negatif lebih efektif dalam melarutkan mineral fosfat daripada bakteri Gram-positif karena pelepasan beragam asam organik ke dalam tanah di sekitarnya (Kalayu 2019).

## 2. Pengkhelatan

Asam organik dan anorganik yang dihasilkan oleh MPF melarutkan fosfat tanah yang tidak larut melalui pengkhelatan kation dan bersaing dengan fosfat untuk tempat adsorpsi di dalam tanah (Kalayu 2019). Gugus hidroksil dan karboksil dari asam mengkhelat kation yang terikat pada fosfat, sehingga mengubahnya menjadi bentuk yang dapat larut. Asam-asam ini dapat melengkapi tempat fiksasi Al dan Fe oksida yang tidak larut, saat bereaksi dengannya, menstabilkannya, dan disebut khelat. Asam ketoglukonat adalah pengkhelat kuat kalsium. Produksi asam anorganik, seperti sulfida, nitrat, dan asam karbonat, telah dilaporkan. Asam nitrat dan asam sulfat bereaksi dengan kalsium fosfat dan mengubahnya menjadi bentuk larut.

## 3. Mineralisasi

Mekanisme lain untuk melarutkan P tanah adalah mineralisasi. Fosfat organik diubah menjadi bentuk yang dapat digunakan oleh PSM melalui proses mineralisasi, dan terjadi di tanah dengan mengorbankan sisa-sisa tumbuhan dan hewan, yang mengandung sejumlah besar senyawa fosfor organik seperti asam nukleat, fosfolipid, gula fosfat, asam fitat, polifosfat, dan fosfonat (Kalayu 2009). Mineralisasi dan imobilisasi P organik tanah memainkan peran penting dalam siklus fosfor tanah pertanian.

MPF memineralisasi P organik tanah melalui produksi fosfatase seperti fitase yang menghidrolisis bentuk organik senyawa fosfat, sehingga melepaskan fosfor anorganik yang akan diimobilisasi oleh tanaman. Fosfat basa dan asam menggunakan fosfat organik sebagai substrat untuk mengubahnya menjadi bentuk anorganik. Berikut ini adalah di antara jamur penghasil fitase yang sering dilaporkan: *Aspergillus candidus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus rugulosus*, *Aspergillus terreus*, *Penicillium rubrum*, *Penicillium simplicissimum*, *Pseudeurotium zonatum*, dan *Trichoderma harzianum*. *Bacillus* tanah dan *Streptomyces* spp. mampu memineralisasi fosfat organik kompleks melalui produksi enzim ekstraseluler seperti fosfoesterase, fosfodiesterase, fitase, dan fosfolipase (Walpola & Yoon 2012). Kultur campuran PSM (*Bacillus*, *Streptomyces*, dan *Pseudomonas*) paling efektif dalam mineralisasi fosfat organik (Khan *et al.* 2009).

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, penapisan, dan enumerasi mikroba pelarut fosfat anorganik tanah.

### **Isolasi dan Skrining Mikroba Pelarut Fosfat**

Berbagai media pertumbuhan sedang digunakan di laboratorium untuk isolasi dan karakterisasi PSM. Pendekatan yang dapat diandalkan yang digunakan untuk skrining awal dan isolasi PSM potensial pertama kali dijelaskan oleh Pikovskaya (Pikovskaya 1948). Ia bekerja dengan melapisi 0,1 mL atau 1 mL suspensi tanah rhizosfer yang diencerkan secara serial pada media Pikovskaya atau NBRIP yang disterilkan yang dilengkapi dengan trikalsium fosfat/hidroksiapatit yang tidak larut sebagai satu-satunya sumber P. Koloni yang membentuk zona halo bening di sekitar setiap koloni disaring sebagai PSM setelah inkubasi pada suhu yang sesuai. Kultur murni dari koloni tersebut diproses lebih lanjut untuk identifikasi melalui karakterisasi biokimia dan molekuler.

### **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 atau NBRIP. 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 atau NBRIP bisa dimodifikasi sesuai dengan tujuan isolasi. Sebagai contoh, untuk memperoleh strain MPF yang mampu melarutkan fosfat dari Al-P maka pada media digunakan  $\text{AlPO}_4$  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  $\text{FePO}_4$ ,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  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 atau NBRIP 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  $\text{AlPO}_4$ ,  $\text{FePO}_4$ , 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  $\text{MnSO}_4$ ; sedikit  $\text{FeSO}_4$ ; 0,5 g ekstrak ragi; dan 15 g agar. Larutkan dalam akuades sampai volume 1 L, lalu pH diatur mencapai 7,0.
- Media NBRIP (Patel *et al.* 2022)
- Timbang bahan kimia berikut ini masing-masing seberat 10 g Glukosa, 0,1 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,1 g KCl, 0,25 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,25 g  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , dan 5,0 g  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  atau 5,0 g hidroksiapatit. Larutkan dalam akuades sampai volume 1 L, lalu pH diatur mencapai 7,0.
- 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 sampai suhu mencapai  $\pm 45-50^\circ\text{C}$  atau hangat-hangat kuku.
- Tuang secara aseptik sebagian media ke dalam cawan-Petri steril ( $\pm 20$  ml media pada setiap cawan Petri), goyang/geser supaya permukaan media

- merata, dan diamankan sampai beku. Media ini merupakan media untuk penanaman/isolasi MPF.
- Tuang secara aseptik sebagian media ke dalam tabung reaksi steril ( $\pm$  5-15 mL media setiap tabung tergantung dari ukuran tabung reaksi), letakkan pada posisi miring dengan sudut  $30^\circ\text{C}$  dan diamankan sampai dingin. Media ini merupakan media agar 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 dari rhizosfer atau 1 mL suspensi contoh akar yang telah disterilisasi permukaan 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 atau NBRIP, lalu cawan Petri goyang 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, lalu goreskan pada media agar, dan inkubasi pada suhu kamar ( $28-30^\circ\text{C}$ ) selama 3-6 hari.
- Koloni yang tumbuh terpisah, ambil secara aseptik dengan ose dan goreskan ke permukaan media agar miring Pikovskaya atau NBRIP.
- Beri kode/nomor isolat pada setiap isolat MPF dan simpan di dalam alat pendingin (refrigerator) pada suhu  $5^\circ\text{C}$ . Tabung ini berisi biakan murni isolat MPF yang digunakan sebagai sumber inokulan.

## Penapisan

### 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 atau NBRIP cair. Di dalam media 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.

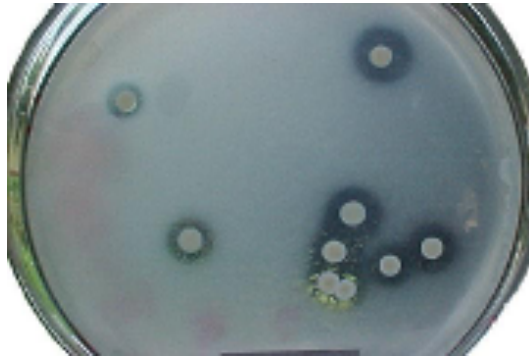
### Pengukuran Zona Bening

#### Bahan dan Alat

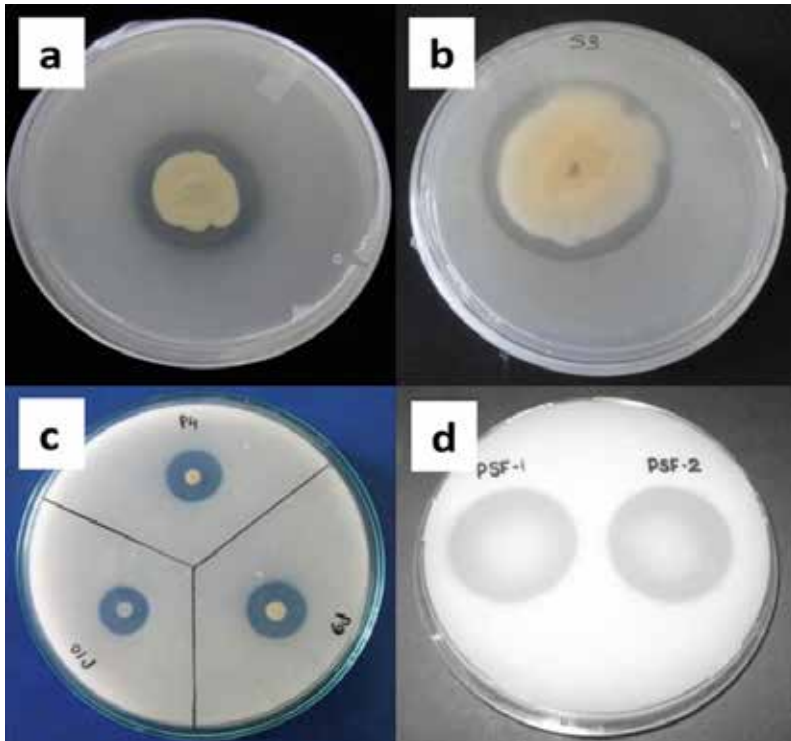
- Kaca pembesar
- Penggaris
- Hasil penanaman (koloni) MPF dalam cawan Petri

#### Prosedur

- Amati pertumbuhan koloni MPF dalam cawan Petri dari hasil penanaman (lihat Gambar 2 dan Gambar 3).
- 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 atau dimanfaatkan lebih lanjut.



Gambar 2. Beberapa koloni bakteri pelarut fosfat (BPF) tumbuh pada media selektif agar Pikovskaya yang membentuk zona bening dengan kejernihan dan diameter yang berbeda-beda



Gambar 3. Pelarutan fosfat sukar larut oleh isolat bakteri dan fungi pada media Pikovskaya (a dan b), media NBRIP (c dan d) (Gambar: Patel et al. 2022)

Kemampuan melarutkan P dari MPF tertentu dapat dinilai dari indeks solubilisasi (IS), rasio diameter total, yaitu zona bening dan diameter koloni. SI fosfat dapat ditentukan menggunakan rumus berikut (Afzal & Bano 2008, Sane & Mehta 2015):

$$IS = (\text{diameter koloni} + \text{diameter zona bening}) / \text{diameter koloni}$$

## 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 Whatman No. 42
- Pipet 5 mL
- Sentrifus
- Tabung plastik sentrifugasi ukuran 50 mL.
- Spektrofotometer UV-VIS

### Bahan

- Media cair Pikovskaya atau NBRIP
- 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  $\text{PO}_4^{3-}$  (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  $\text{PO}_4^{3-}$ .
  - Pipet 5 ml standar 1.000 ppm  $\text{PO}_4^{3-}$  ke dalam labu ukur 100 mL, tambah akuades sampai pada garis batas, dan kocok.
- Standar 2,5 ppm  $\text{PO}_4^{3-}$ .

- Pipet 5ml standar 50 ppm  $\text{PO}_4^{3-}$  ke dalam labu ukur 100 mL, tambah akuades sampai pada garis batas, dan kocok.
- Deret standar  $\text{PO}_4^{3-}$  (0-2,5 ppm).
  - Pipet berturut-turut 0; 0,5; 1; 2; 3; 4; dan 5 mL standar 2,5 ppm  $\text{PO}_4^{3-}$  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  $\text{PO}_4^{3-}$ .

### 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, lalu disteril menggunakan autoklaf.
- Secara aseptik tuang 10 mL akuades steril ke dalam tabung biakan murni hasil isolasi, lalu dikocok 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 shaker pada kecepatan 100 rpm selama 1-2 minggu. Dengan cara yang sama lakukan pada labu Erlenmeyer berisi Pikovskaya atau NBRIP 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 sentrifugasi, lalu disentrifugasi pada kecepatan 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  $\text{PO}_4$ . Tambahkan 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  $\text{PO}_4$ , encerkan filtrat dengan menambahkan akuades sampai intensitas warna pada kisaran warna larutan standar.

### Perhitungan

$$\text{Kadar PO}_4 \text{ (ppm)} = \text{ppm kurva} \times \text{fp}$$

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  $\text{PO}_4$  isolat MPF (ppm) = ppm kurva x fp – kadar  $\text{PO}_4$  kontrol

## Enumerasi

### Prinsip

Kepadatan populasi MPF di dalam tanah dipengaruhi oleh banyak faktor. Penghitungan populasi secara langsung dengan memakai mikroskop (menggunakan hemasitometer) 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 atau NBRIP (*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  $\text{g}^{-1}$  atau  $\text{mL}^{-1}$ . 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 (*cfu* = *colony forming unit* atau satuan pembentuk koloni).

### Alat dan Bahan

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

### Prosedur

- Timbang 1 g contoh tanah dalam pinggan aluminium, masukkan ke dalam oven pada suhu  $105^\circ\text{C}$  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 atau NBRIP (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.
  - Sebanyak 100 mL suspensi hasil pengenceran  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ , dan  $10^{-6}$  disebar pada media padat Pikovskaya atau NBRIP.
  - 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:

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

Keterangan:

C = jumlah koloni

fp = faktor pengenceran

bk = berat kering tanah

### 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, diketahui 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.

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 ASJ. 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. Disertasi untuk Memperoleh Gelar Doktor. Program Pascasarjana Universitas Padjadjaran Bandung.
- Afzal A, Bano A. 2008. *Rhizobium* and phosphate solubilizing bacteria improve the yield and phosphorus uptake in wheat (*Triticum aestivum* L.). International Int. J. Agric. Biol. 10: 85–88.
- Alam S, Khalil S, Ayub N, Rashid M. 2022, "In vitro solubilization of inorganic phosphate by phosphate solubilizing microorganism (PSM) from maize rhizosphere," Int. J. Agric, Biol. 4: 454–458.
- Aseri GK, Jain N, Tarafdar JC. 2009. Hydrolysis of organic phosphate forms by phosphatases and phytase producing fungi of arid and semi-arid soils of India," American-Eurasian J. Agric. Environ. Sci. 5: 564–570.
- Dodor DE, Tabatabai MA. 2003. Effect of cropping systems on phosphatases in soils. J. Plant Nutr. Soil. Sci., 166: 7–13.
- Kalayu G. 2019. Phosphate Solubilizing Microorganisms: Promising Approach as Biofertilizers. International Journal of Agronomy Vol. 2019, Article ID 4917256, 7 pages.
- Khan A, Jilani V, Akhtar MS, Naqvi SMS, Rasheed M. 2009. Phosphorus solubilizing bacteria: occurrence, mechanisms and their role in crop production. J. Agric. Biol. Sci. 1: 48–58.
- Kimura R, Nishio M, Katoh K. 1990. Utilization of Phosphorus by Plant After Solubilization by Phosphate Solubilizing Microorganisms in Soil. National Grassland Research Institute. Nasu, Japan and National Agriculture Research Center. Tsukuba, Japan.
- Mullen DM. 1998. Transformation of other elements. p. 369-386. In Silvia DM, Fuhrmann JJ, Hartel PG, Zuberer DA (Eds.) Principles and Applications of Soil Microbiology.

- Prentice Hall New Jersey 07458.
- Nautiyal SC. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Letters*. 170: 265 – 270.
- Patel S, Prajapati V, Patel P. 2022. Isolation and Screening of Mineeal Phosphate Solubulizing Microorganisms. p. 187-192. *In Practical Handbook on Agricultural Microbiology*. Natarajan Amaresan, Prittesh Patel, Dhruvi Amin (Eds.). Springer Protocol Handbooks. Humana Press. New York, U.S.A.
- Pikovskaya RI. 1948. Mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya*. 17: 362–370.
- Sane SA, Mehta SK. 2015. Isolation and evaluation of rock phosphate solubilizing fungi as potential bio-fertilizer. *J. Fertil. Pestic*. 6: 156.
- Selvi KB, Paul JJA, Vijaya V, Saraswathi K. 2017. Analyzing the efficacy of phosphate-solubilizing microorganisms by enrichment culture techniques. *Biochem. Mol. Biol. J*. 3:1
- Sharma SB, Sayyed RZ, Trivedi MH, Gobi TA. 2013. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *Springer Plus*. 2:587.
- Subba-Rao NS. 1981. *Biofertilizers in Agriculture*. Oxford & IBH Publishing Co. New Delhi, Bombay.
- Subba-Rao NS. 1982. Phosphate solubilization by Soil Microorganisms. p. 295-303. *In Subba-Rao NS (Ed.) Advances in Agricultural Microbiology*. Oxford & IBH Publishing Co. New Delhi, Bombay, Calcutta.
- Sulaeman, Suparto, Eviati. 2005. *Petunjuk Teknis: Analisis Kimia Tanah, Tanaman, Air dan Pupuk*. Balai Penelitian Tanah. Bogor.
- Venkateswarlu B, Rao AV, Raina P. 1984 Evaluation of phosphorus solubilization by microorganisms isolated from aridisols. *J. Indian Soc. Soil Sci*. 32: 273–277.
- Wagner HG, Wolf DC. 1998. Carbon transformation and soil organic matter formation. p. 218-257. *In Silvia DM, Fuhrmann JJ, Hartel PG, Zuberer DA (Eds.) Principles and Applications of Soil Microbiology*. Prentice Hall. New Jersey.
- Walpola BC, Yoon M. 2012. Prospectus of phosphate solubilizing microorganisms and phosphorus availability in agricultural soils: A Review. *African J. Microbiol. Res*. 6:6600-6605.

## 2.7

# CENDAWAN MIKORIZA ARBUSKULER

*Rohani Cinta Badia Ginting, 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 spora, 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 sentrifugasi dan penyaringan untuk memisahkan spora. Sentrifugasi 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-asam nukleat diamplifikasi dalam jumlah yang sangat sedikit, dipakai untuk mendeteksi dan mengidentifikasi cendawan MA dapat dilihat pada Simon *et al.* (1992, 1993), Wyss dan Bonfante (1993), Clapp *et al.* (1995), Zézé *et al.* (1996), dan Lanfranco *et al.* (1995).

## Isolasi Spora

### (1) Metode penyaringan basah dan dekantasi yang diadaptasi dari Gerdemann dan Nicolson (1963)

#### Prinsip

Saringan metal berbagai ukuran dipakai untuk dapat memisahkan spora. Saringan yang lebih kasar (500-2.000  $\mu\text{m}$ ) dipakai untuk memisahkan bahan-bahan organik dan partikel tanah yang kasar, sedangkan saringan halus (38-250  $\mu\text{m}$ ) dipakai untuk spora-spora yang berbeda ukuran.

#### Bahan dan alat:

- Contoh tanah
- Air keran
- Gelas Beaker/*Beaker glass*
- Cawan Petri
- Alat pengaduk/pengocok tanah
- Saringan berbagai ukuran (53, 100, 150, 250  $\mu\text{m}$ )
- Mesin 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  $\mu\text{m}$ ) untuk memisahkan bahan-bahan organik dan tampung cairan yang melalui saringan itu dalam gelas Beaker. Bilas saringan agar semua partikel kecil masuk ke dalam gelas Beaker.
- 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  $\mu\text{m}$  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) Metode sentrifugasi gula yang dimodifikasi dari Jenkins (1964)

### Prinsip

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

### Bahan dan alat

- Air keran
- Gelas Beaker/*Beaker glass*
- Larutan gula pasir (454 g L<sup>-1</sup> air)
- Kertas saring Whatman No. 42
- Ember plastik
- Saringan metal 20, 270, 325, dan 350 mesh
- Tabung sentrifus 50 mL
- Mesin 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 gelas Beaker agar semua spora dan partikel-partikel tanah yang ada pada saringan tercuci.
- Pindahkan suspensi ini ke dalam tabung sentrifus dan diproses 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.

## (3) Kuantifikasi Jumlah Spora

Spora dihitung pada perbesaran 40x di bawah mikroskop stereo dengan satuan jumlah total spora per g tanah yang diamati (<https://invam.wvu.edu/methods/spores/enumeration-of-spores>). Kepadatan spora dalam tanah dapat dikelompokkan menjadi 3 yaitu rendah, sedang, dan tinggi (Tabel 1).

Tabel 1. Kriteria kepadatan spora cendawan MA dalam tanah (<https://invam.ku.edu/enumeration-of-spores>).

Ukuran spora	Kepadatan spora (spora mL <sup>-1</sup> )		
	Tinggi	Sedang	Rendah
Kecil	>300	200-300	<100
Sedang	>200	100-200	<80
Besar	>100	25-50	<20

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

##### Prinsip

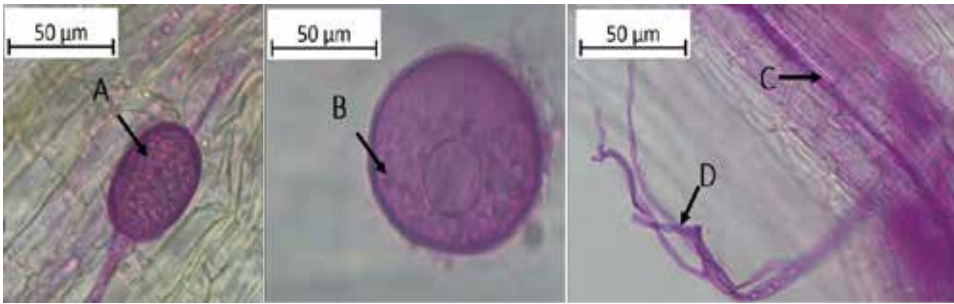
Simbiosis antara cendawan MA dan tanaman inang ditandai dengan terjadinya kolonisasi cendawan itu dalam akar tanaman inang. Kolonisasi ini baru terlihat dengan jelas kalau contoh akar itu dijernihkan dan diwarnai dengan zat warna tertentu dan dilihat di bawah mikroskop cahaya. Penjernihan dilakukan untuk melarutkan bagian-bagian sel sehingga yang terlihat hanya struktur-struktur cendawan MA (vesikel, hifa dan arbuskel) dalam akar (Gambar 1). 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



Gambar 1. Infeksi akar oleh FMA. A. Vesikel, B. Spora, C. Hifa internal, D. Hifa eksternal

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 *tryphan blue* (*cotton blue*): 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 *tryphan blue* di dalam laktofenol untuk membuat larutan *tryphan 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 (d 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  $H_2O_2$  basa (bila diperlukan untuk akar yang mengandung pigmen, seperti akar ubi kayu misalnya).
  - Tambahkan 3 mL  $NH_4OH$  (amonia rumah tangga dapat dipakai) ke dalam 30 mL  $H_2O_2$  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 masukkan ke dalam tabung reaksi.

### **Penjernihan dan pewarnaan dengan pemanasan**

- Tambahkan larutan KOH 10% ke dalam tiap tabung reaksi sebanyak tiga perempat 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 70°C, 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 70°C). 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dan bilas dengan air kran 3-4 kali untuk menghilangkan larutan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- 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 didaur ulang dengan cara yang tersebut pada pewarnaan dengan pemanasan di atas).

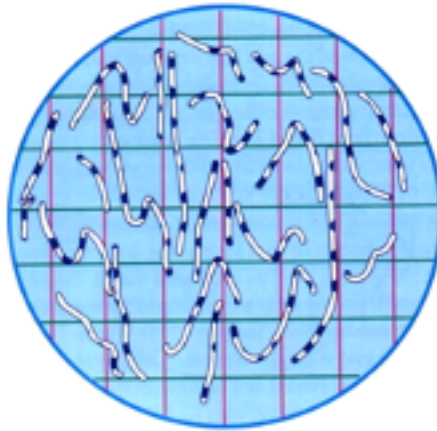
### **Mikroskopi dan penetapan % kolonisasi**

- 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 2).
- Nyatakan % kolonisasi akar dengan:

$(MGV + MGH) \times 100\% / \text{Jumlah akar yang diamati}$

MGV = Mikoriza yang memotong garis vertikal

MGH = Mikoriza yang memotong garis horizontal



Gambar 2. Segmen-segmen akar yang akan diamati dalam cawan Petri bergaris vertikal dan horizontal (Brundrett et al. 1996)

## Penetapan Jumlah Propagul

### Prinsip

Komponen yang infeksi dari cendawan MA tidak hanya spora saja tetapi juga miselinya 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).

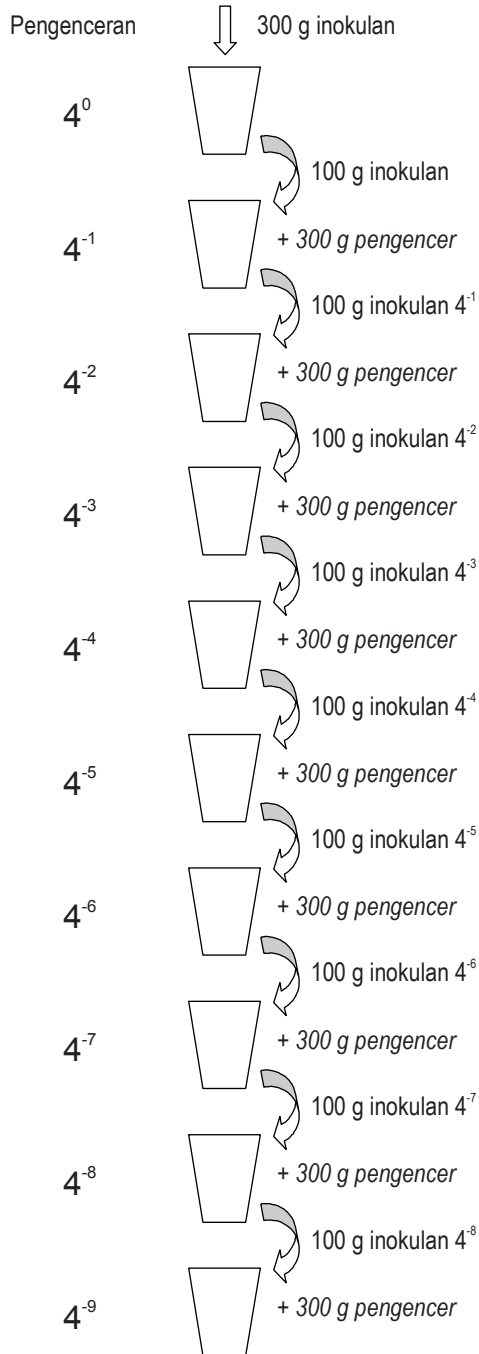
### Bahan dan alat

- 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<sup>0</sup>). 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<sup>1</sup>.
- Ambil 100 g hasil pengenceran 4<sup>1</sup> dan tempatkan dalam gelas plastik lain. Tambahkan 300 g pengencer, lalu aduk rata. Campuran ini menghasilkan pengenceran 4<sup>2</sup>.
- Ambil 100 g hasil pengenceran 4<sup>2</sup> dan tempatkan dalam gelas plastik lain. Tambahkan 300 pengencer, lalu campur rata. Campuran ini menghasilkan pengenceran 4<sup>3</sup>.
- Pengenceran tersebut terus dilakukan hingga menghasilkan pengenceran 4<sup>4</sup>, 4<sup>5</sup>, 4<sup>6</sup>, 4<sup>7</sup>, 4<sup>8</sup>, dan 4<sup>9</sup>. Diagram pengenceran dapat dilihat pada Gambar 3.
- Setiap pengenceran diulang 5x. Pengenceran dapat dilakukan sekaligus untuk lima ulangan.
- Setelah pengenceran selesai, medium diairi dengan air steril sampai kapasitas lapang.
- Pupukan dilakukan dengan menggunakan larutan hara Yoshida *et al.* (1976). Pembuatan tiap larutan stok dan campuran larutan (4 L) dapat dilihat pada halaman sebelumnya di 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 4.
- 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 3. Diagram kelipatan empat pada metode MPN



Gambar 4. MPN tanaman jagung menggunakan polibag (gambar atas) dan tanaman siratro menggunakan gelas plastik (gambar bawah)

Tabel 2. Contoh hasil pengamatan MPN

Taraf pengenceran	I	II	III	IV	V	Jumlah ulangan terinfeksi
40	+	+	+	+	+	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

Tabel 3. Nilai K untuk pengenceran kelipatan 4 (Fisher &amp; Yates (1963))

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

## Perhitungan

Cara perhitungan MPN

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

$\Omega$  = 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 dan Yates (1963)

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 :

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

$$\log \Omega = 5,4 \cdot \log 4 - 0,552$$

$$= 5,4 \cdot 0,6021 - 0,552$$

$$= 3,2513 - 0,552$$

$$= 2,6993$$

$$\Omega = 500,4$$

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% :

$$\log \Omega = \log \Omega \pm s/\sqrt{n} \cdot z \quad s = \sqrt{0,0201} \text{ untuk pengenceran kelipatan } 4$$

$n$  = jumlah ulangan per pengenceran

$z = 1,645$  untuk taraf 95%

$$\log \Omega_s = \log 556 \pm \sqrt{0,0201}/\sqrt{5} \cdot 1,645$$

$$= 2,7450 \pm 0,4483/2,2361 \cdot 1,645$$

$$= 2,7450 \pm 0,2005 \cdot 1,645$$

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

$$\Omega_s = 1188$$

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

$$\Omega_l = 260$$

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

## 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
- HgCl<sub>2</sub>

### Alat

- Gelas Beaker (sebagai wadah mencampur zeolit dan arang sekam)
- Saringan metal berukuran 38, 53, 100, dan 500  $\mu\text{m}$
- Blender
- Mesin sentrifus

### Prosedur

#### 1. Pertanaman pancingan

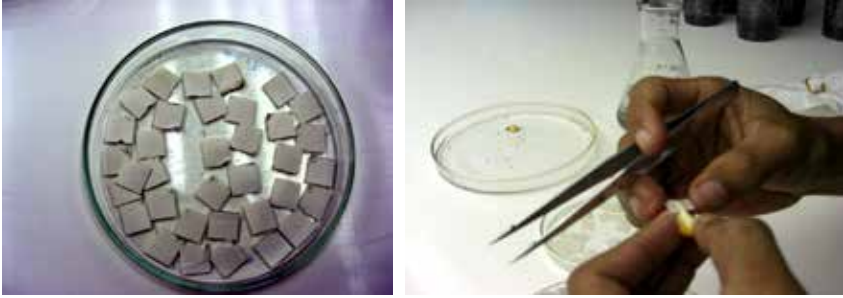
- Tempatkan  $\pm 2$  kg contoh tanah dalam pot (kalau contoh tanah ini kurang, tambahkan tanah pengencer yang sudah steril, agar volume tanah ini memadai untuk lama pertanaman pancingan 2-3 bulan).
- Airi hingga kapasitas lapang.
- Beri pupuk fosfat alam dan larutan Yoshida (lihat halaman tentang ini) 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.

## 2. 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 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 gelas Beaker. Bagi-bagikan suspensi ini ke dalam tabung-tabung sentrifus.
- Timbang tiap tabung agar seimbang sebelum dimasukkan ke dalam mesin sentrifus.
- Sentrifus 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 sentrifus dengan kecepatan 1.000 ppm selama 1 menit.
- Tuangkan supernatan ke dalam saringan metal ukuran 38  $\mu\text{m}$  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  $\mu\text{m}$ , dengan asumsi bahwa spora ini dari takson yang berbeda.

## 3. Inokulasi spora tunggal

- Kecambahkan benih jagung steril (disterilisasi dengan larutan  $\text{HgCl}_2$  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 1 cm x 1 cm, lalu tempelkan pada akar kecambah jagung (lihat Gambar 5).
- 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 6).
- Pupuk dengan larutan Yoshida (lihat halaman sebelumnya) 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. Lakukan penyiraman sesuai dengan kebutuhan tanaman.



Gambar 5. Cawan Petri dengan kertas saring berisi spora tunggal (gambar kiri) dan penempelan spora pada akar kecambah jagung



Gambar 6. Tanaman jagung yang diinokulasi spora tunggal di ruang tumbuh

- Panen tanaman setelah berumur kira-kira 2 bulan. Cek kolonisasi mikoriza pada akar sebelum dipanen sesuai dengan prosedur dijelaskan sebelumnya. 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.

## Identifikasi Cendawan Mikoriza Arbuskuler

### Prinsip

Identifikasi cendawan MA dapat dilakukan berdasarkan morfologi sporanya, ataupun dengan menggunakan teknik molekuler. Taksonomi cendawan MA

berdasarkan morfologi spora 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.

### (1) Identifikasi berdasarkan morfologi spora

#### 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

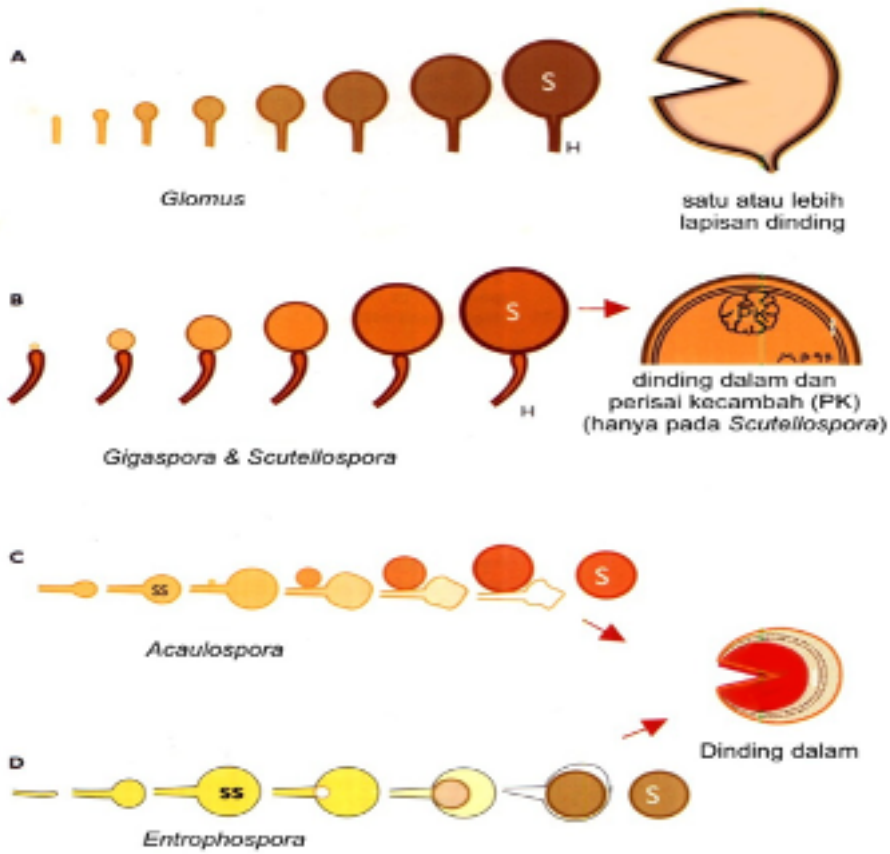
- Objek gelas dan kaca penutup (slip)
- Kaca arloji (*watch glass*) tempat spora-spora yang akan diamati
- Mikroskop binokuler yang baik (kualitas tinggi sehingga mampu melihat detail dari spora) dan dilengkapi kamera (bisa dipakai dengan *bright-field illumination* dan *Nomarski interference illumination*)
- 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 7.

#### Susunan spora

Spora cendawan Glomales dapat diproduksi tunggal atau berkelompok (agregat) yang disebut sebagai sporokarp (lihat Gambar 8). 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,

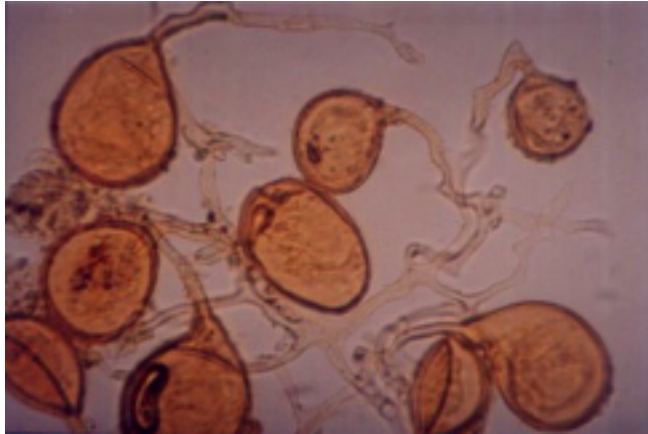


Gambar 7. Skema perkembangan spora cendawan (Brundrett et al. 1996)

tetapi mungkin mempunyai peridium (lapisan luar hifa). Genus *Sclerocystis* dibedakan dari *Glomus* berdasarkan susunan spora dalam sporokarp.

### 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, melebar menjadi bentuk kerucut, atau membengkak, dan beberapa spora mempunyai hifa ganda atau tangkai hifa bercabang. Tampak spora dari spora-spora dewasa dapat tersumbat oleh lapisan-lapisan dinding atau materi-materi lain (lihat Morton 1988).



Gambar 8. Agregat spora pada *Glomus microaggregatum*

### 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  $\mu\text{m}$ ) sampai sangat besar (200-1.000  $\mu\text{m}$ ). Spora endofit yang halus dapat berukuran sekecil 5  $\mu\text{m}$ , tetapi biasanya diabaikan saja.

### Warna spora

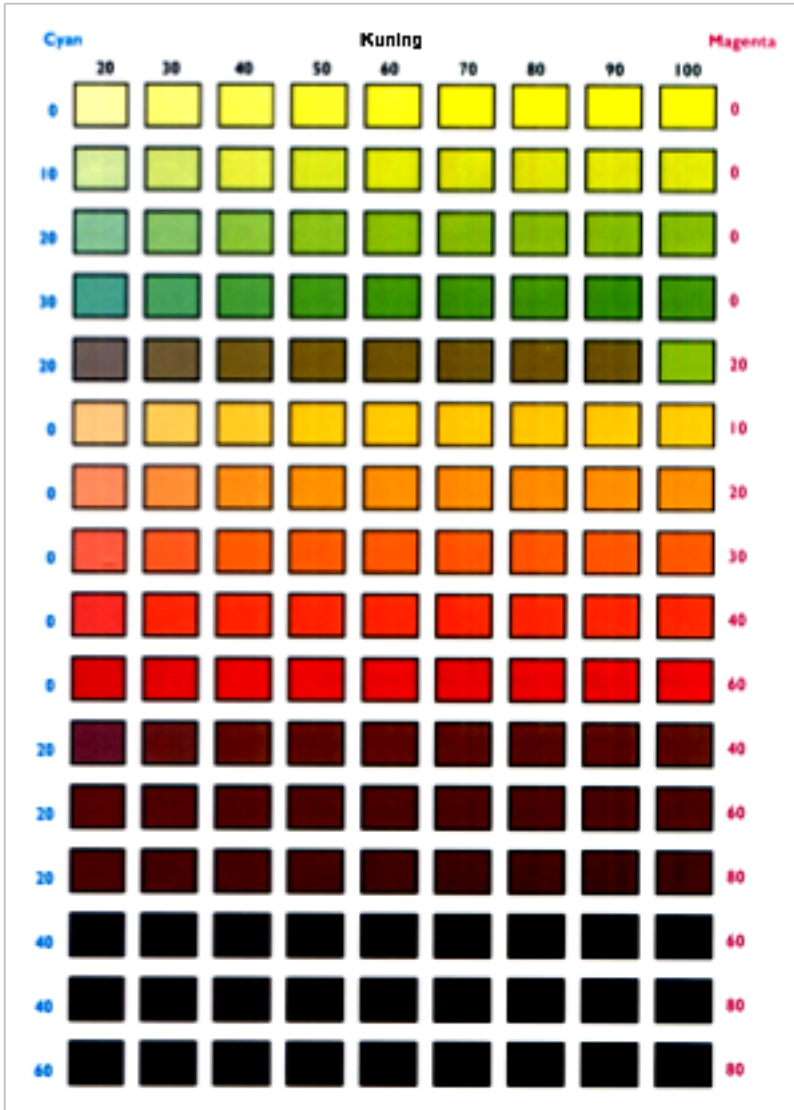
Warna spora beragam antara isolat maupun dalam isolat cendawan Glomales dan dapat dipakai untuk membantu identifikasi. Warna spora dapat diidentifikasi dengan menggunakan peta warna (Brundrett *et al.* 1996). Peta warna ini dapat dilihat pada Gambar 9.

### 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 10.

### Lapisan-lapisan dinding spora dan reaksi warnanya

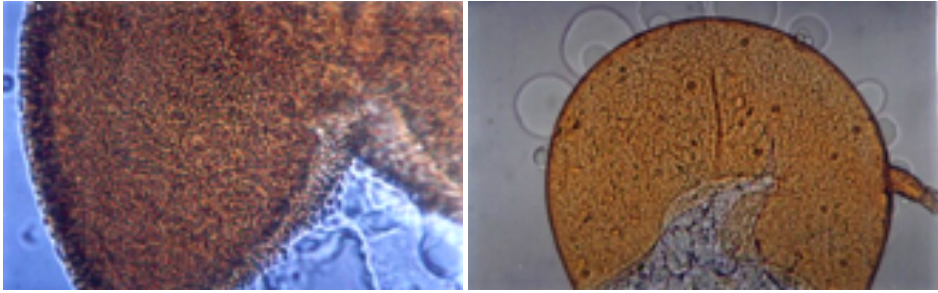
Dinding spora cendawan Glomales memiliki satu atau lebih lapisan yang berbeda tebal, struktur, penampilan dan reaksi warnanya. Ada delapan tipe lapisan



Gambar 9. Peta warna dapat digunakan untuk menggambarkan spora cendawan MA. Warnanya dapat digambarkan sebagai % CYM (cyan, kuning, magenta) (Brundrett et al. 1996)

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/concepts/convtrad.htm>).

Walker (1983) membagi dinding spora ini menjadi empat tipe, yaitu: satuan, laminated, evanescent, dan membran (Tabel 4). Spesies *Acaulospora*, *Entrophospora* dan *Scutellospora* secara khas memiliki struktur dinding yang kompleks, terdiri atas



Gambar 10. Contoh ornamentasi pada permukaan spora

Tabel 4. 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 kematangan yang sama dalam satu spesies	<i>Glomus caledonium</i> <i>Gigaspora gigantea</i> <i>Acaulospora trappei</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 gerdemannii</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>

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 11). 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 12.

### Isi spora

Spora mengandung lipid dan isi yang lain, yang bermacam-macam warnanya dan dapat berupa tetesan besar atau kecil (Gambar 13) 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)

### Perkecambahan spora

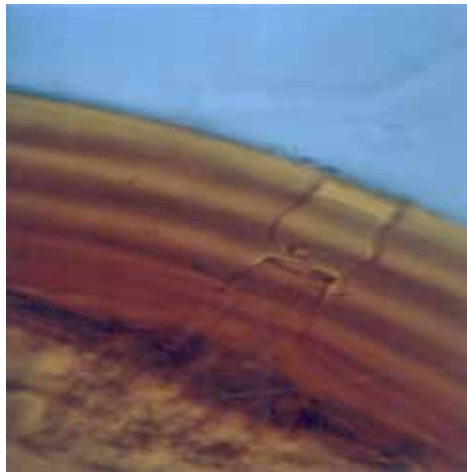
Mekanisme perkecambahan spora dapat juga dipakai untuk membedakan cendawan *Glomales*, terutama spesies *Scutellospora* mempunyai perisai (*shield*) kecambah (Gambar 14) dengan lipatan-lipatan yang kompleks pada dinding dalam. Ketika spora *Scutellospora* berkecambah, hifa muncul dengan perisai ini dari 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.

### Hifa tanah

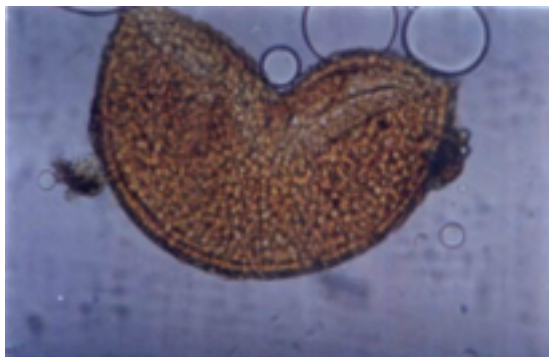
Isolat-isolat cendawan *Glomales* mempunyai perbedaan yang besar dalam penampilan sistem miselium tanah, misalnya ketebalan dinding, pewarnaan, struktur yang berkaitan, dan sebagainya. Hanya sayang gambaran-gambaran seperti ini jarang diperhatikan pada studi taksonomi. *Scutellospora* memiliki hifa *melanized* 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.



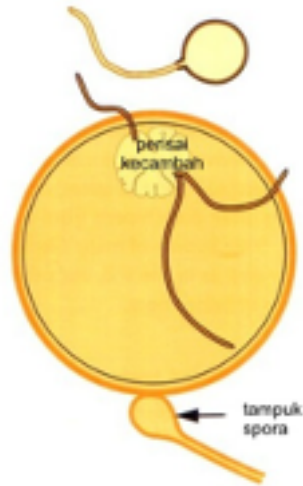
Gambar 11. Pewarnaan Melzer pada bagian dalam dinding spora (Brundrett et al. 1996)



Gambar 12. Berbagai lapisan dinding spora dan adanya tabung kecambah



Gambar 13. Tetesan lipid keluar ketika spora dipencet



Gambar 14. Skema tampuk spora dan perisai kecambah pada spora *Acaulospora* dan *Scutellospora* (Brundrett et al. 1996)

### 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 15). 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.

### 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 gelas objek 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.



Gambar 15. Auxiliary cell dalam tanah (Brundrett et al. 1996)

### Taksonomi

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

Kunci takson pada Glomales

- A. Hanya arbuskel terbentuk pada akar bermikoriza.  
 'Azygospora' terbentuk pada apex sel sporogenous pada  
 hifa fertil, membentuk sel tambahan (auxiliary cells)..... GIGASPORINEAE  
 Mempunyai satu famili saja..... Gigasporaceae (B)
- B. Tabung kecambah terbentuk langsung melalui dinding spora,  
 kelompok dinding dalam yang fleksibel tidak ada, sel  
 tambahan papillate atau echinulate halus..... Gigaspora
- 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..... ACAULOSPORACEAE (E)
- E. Spora keluar secara lateral dari leher sporiferous  
saccule..... Acaulospora
- EE. Spora terbentuk dalam leher  
sporiferous saccule..... Entrophospora

## (2) Identifikasi menggunakan teknik molekuler

### Bahan

- Spora tunggal yang utuh dan sehat (baik yang diisolasi dari lapang atau dari hasil pertanaman spora tunggal) seperti yang telah dijelaskan di atas.
- Siapkan 10 mL masing-masing larutan berikut (PCR-grade dan menggunakan pelarut air steril) sebagai berikut:
- 1 M HCl
- 0.1 M NaOH
- 0.5 M Tris HCl pH 8 (sterilisasi menggunakan kertas saring)
- Air suling ganda steril
- bufer PCR (optional)

### Alat

- Mesin Elektroforesis
- Mesin pembersih ultrasonik
- Mesin Thermal Cycler (PCR)
- Pipet mikro volume 10–20 µL
- Tip pipet
- Mesin mikrosentrifus
- *Heating block*
- Mikroskop stereo
- Tabung Eppendorf ukuran 1.5 mL dan 0.5 mL atau 0,2 mL

### Prosedur

Pembersihan dan pemilihan spora cendawan MA (Kramadibrata *et al.* 2000, Brundrett *et al.* 1996, Schwarzott & Schüßler 2001)

- Bersihkan sekitar 10 spora tunggal cendawan MA dengan cara dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf 0,5 mL yang berisi 200  $\mu$ L SDS 1% steril (pengenceran menggunakan air suling ganda) dan disonikasi pada 35 kHz selama 10-30 detik dengan daya disetel ke 100% dan fungsi degas aktif. Waktu sonikasi tergantung kondisi spora. Surfaktan SDS 1% dapat diganti dengan bahan alternatif 0,05% Tween 20 (Rini *et al.* 2021).
- Bersihkan spora dengan air suling ganda steril melalui sonikasi selama 10 detik, lalu dibilas. Proses pembilasan spora diulangi tiga kali untuk memastikan bahwa spora yang diperoleh benar-benar dalam keadaan bersih.
- Amati spora di bawah mikroskop, pilih satu spora yang sehat dan utuh. Jika pengotor masih menempel, langkah sonikasi diulang, setelah itu spora dibilas kembali.
- Pindahkan spora ke tabung Eppendorf 1,5 mL yang berisi 1,5  $\mu$ L air suling ganda steril dan letakkan spora di dinding tabung. Tabung eppendorf diletakkan di atas es, diinkubasi selama 1 jam, dan digunakan untuk ekstraksi DNA. Spora bisa juga dibekukan dan disimpan pada suhu  $-80^{\circ}\text{C}$  untuk pemakaian yang agak lama.

#### **Ekstraksi DNA dengan menggunakan metode NaOH–HCl–Tris HCl (Redecker *et al.* 1997)**

- Sebelum dimulai, panaskan penangas (*heat block*) pada suhu  $95^{\circ}\text{C}$ .
- Ambil 2  $\mu$ L 0.1 M NaOH menggunakan tip pipet dan masukkan ke tabung yang berisi spora.
- Hancurkan spora menggunakan ujung pipet yang ditekankan ke arah dinding tabung (Gambar 16).
- Teteskan bufer dari tip pipet untuk mengalirkan spora yang sudah hancur.
- Masukkan tabung mikro dalam penangas air selama 1 menit, dan sentrifus sebentar untuk menurunkan cairan yang ada dalam dinding tabung.
- Tambahkan 2  $\mu$ L 1 M HCl dan 1  $\mu$ L 0.5 M bufer Tris–HCl.
- Panaskan kembali selama 1 menit dan sentrifus sebentar. Sebelum digunakan, tabung disimpan dalam es.

#### **Ekstraksi DNA alternatif menggunakan bufer PCR Instagene Matrix (Rini *et al.* 2021)**

- Masukkan spora yang sudah bersih ke dalam tabung Eppendorf 0,2 mL steril, letakkan pada dinding tabung.
- Ambil 20  $\mu$ L *Instagene Matrix* (BIO-RAD) atau 200  $\mu$ L larutan Dynabeads menggunakan pipet tumpul steril.
- Hancurkan spora menggunakan ujung pipet tumpul steril dengan cara menekan spora ke dinding tabung.



Gambar 16. Ekstraksi DNA dari spora tunggal cendawan MA

- Alirkan spora yang sudah hancur dengan larutan Matrix yang sudah ada dalam pipet.
- Masukkan sampel ke dalam *Thermal Cycler*, panaskan pada suhu 56°C selama 30 menit, dilanjutkan pada suhu 95°C selama 10 menit.
- Ambil sampel DNA dengan cara dipintal, pindahkan sebanyak 15 µL ke tabung mikro steril baru, dan digunakan sebagai template untuk analisis DNA.
- Letakkan sampel di atas es sebelum digunakan.

### Amplifikasi PCR

Fragmen 18S rRNA parsial cendawan MA diamplifikasi melalui reaksi rantai polimerase (*Polymerase chain reaction*, PCR) menggunakan mesin Thermal Cycler. Proses PCR dilakukan dua kali, pertama menggunakan primer universal untuk cendawan yaitu primer forward NS1 (5'-GTAGTCATATGCTTGCTC-3') dan primer reverse NS4 (5'-CTCCGTCAATTCCTTTAAG-3'), kedua menggunakan primer spesifik cendawan MA yaitu AML1 (5'-ATCAACTTTCGATGGTAGGATAGA-3') dan AML2 (5'-GAACCCAAACACTTTGGTTTC C-3'). DNA template untuk proses PCR pertama adalah hasil isolasi DNA dari spora, sementara DNA template untuk proses PCR kedua adalah produk PCR pertama.

### Prosedur

Untuk reaksi PCR pertama dengan volume total 25 µL

- Masukkan 1 µL DNA template, 12,5 µL MyTaq™ Red Mix (Bioline, USA), dan masing-masing 1,25 µL primer universal untuk cendawan yaitu 10 µM NS1 dan 10 µM NS4 ke dalam tabung PCR.
- Tera volume reaksi menjadi 25 µL dengan menambahkan 9 µL air suling ganda steril.

- Masukkan suspensi dalam mesin PCR, amplifikasi DNA dilakukan dengan kondisi sebagai berikut: satu siklus denaturasi awal pada 95°C selama 4 menit, diikuti oleh 30 siklus yang berisi denaturasi pada 95°C selama 1 menit, annealing pada 50°C selama 1 menit, ekstensi pada 72°C selama 1 menit, dan satu siklus untuk ekstensi akhir pada 72°C selama 5 menit.

Untuk reaksi PCR kedua dengan volume total 25 µL

- Masukkan 1 µL DNA template (produk PCR pertama), 12,5 µL MyTaq™ Red Mix (Bioline, USA), dan masing-masing 1,25 µL primer spesifik cendawan MA yaitu 10 µM AML1 dan 10 µM AML2 dalam tabung PCR.
- Tera volume reaksi menjadi 25 µL dengan menambahkan 9 µL air suling steril.
- Masukkan dalam mesin PCR, amplifikasi DNA dilakukan dengan kondisi sebagai berikut: satu siklus denaturasi awal pada 95°C selama 5 menit, diikuti oleh 30 siklus yang berisi denaturasi pada 95°C selama 1 menit, annealing pada 58°C selama 1 menit, ekstensi pada 72°C selama 1 menit, dan satu siklus untuk ekstensi akhir pada 72°C selama 5 menit.

### Visualisasi DNA cendawan MA dengan cara elektroforesis

- Homogenkan 2 µL produk PCR kedua dengan 1 tetes Loading Dye.
- Masukkan ke dalam lubang sumur gel agarosa 0,8%.
- Lakukan proses elektroforesis pada 55 V selama 60 menit.
- Rendam gel dalam larutan Etidium Bromida selama 5 menit lalu bilas dalam air suling steril.
- Visualisasi DNA cendawan di bawah UV transiluminator DigiDoc.
  - Catatan: larutan 1 µL (10 mg mL<sup>-1</sup>) Etidium Bromida dapat juga dicampurkan dalam gel agarosa 0,8% dan hasil elektroforesis langsung divisualisasi di bawah UV transiluminator.
- Produk PCR ini kemudian dimurnikan dan disekuensing (Lee *et al.* 2008).

### Analisis sekuen

Edit sekuen DNA menggunakan perangkat lunak *CodonCode Aligner* atau BioEdit untuk memastikan keakuratan DNA yang dihasilkan. Setiap sekuen DNA ditentukan ke takson tertentu dengan membandingkan sekuen tersebut dengan sekuen nukleotida dalam database GenBank NCBI menggunakan *Basic Local Alignment Search Tools* (BLAST) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) dan MycoBank (<https://www.mycobank.org>). Penjajaran sekuen dilakukan menggunakan program ClustalW (Thompson *et al.* 1994). Berdasarkan sekuen yang disejajarkan, pohon filogenetik direkonstruksi menggunakan program MEGAX (Kumar *et al.* 2018) dengan algoritma neighbor-joining (NJ). Sebagai outgroup gunakan sekuen dari anggota Paraglomerales (Walker *et al.* 2007).

## Daftar Pustaka

- Brundrett M, Bougher N, Dell B, Grove T, Malajczuk N. 1996. Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture. ACIAR Monograph 32. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra.
- Clapp JP, Young JPW, Merryweather J, Fitter AH. 1995. Diversity of fungal symbionts in arbuscular mycorrhizas from a natural community. *New Phytol.* 130: 259-265.
- Fisher RA, Yates F. 1963. Statistical tables for biological, agricultural and medical research. Oliver and Boyd. Edinburgh.
- Gerdermann JW, Nicolson TH. 1963. Spore of mycorrhizal Endogons species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 46: 235-244.
- Jenkins WR. 1964. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant Dis. Rep.* 48: 692
- Kormanik PP, McGraw AC. 1982. Quantification of vesicular-arbuscular mycorrhizae in plant roots. p. 37-45. In Schenck NC (Ed.) *Methods and Principles of Mycorrhizal Research*. The American Phytopathological Society, St. Paul.
- Koske RE, Gemma JN. 1989. A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. *Mycol. Res.* 92: 486-505.
- Kramadibrata K, Walker C, Schwarzott D, Schuëüler A. 2000. A new species of *Scutellospora* with a coiled germination shield. *Ann. Bot.* 86:21-27.
- Kumar S, Stecher G, Li M., Knyaz C, Tamura K. 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35(6): 1547-1549.
- Lanfranco L, Wyss P, Marzaki C, Bonfante P. 1995. Generation of RAPD-PCR primers for identification of isolates of *Glomus mosseae*, and arbuscular mycorrhizal fungus. *Mol. Ecol.* 4: 61-68.
- Lee J, Lee S, Young JP. 2008. Improved PCR primers for the detection and identification of arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiol. Ecol.* 65(2): 339-349.
- Lee P-J, Koske RE. 1994. *Gigaspora gigantea*: parasitism of spores by fungi and actinomycetes. *Mycol. Res.* 98: 458-466.
- Morton JB. 1988. Taxonomy of VA mycorrhizal fungi classification, nomenclature, and identification. *Mycotaxon* 32: 267-324.
- Morton JB, Benny GL. 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 WM. 1979. The "Most Probable Number" method for enumerating infective propagules of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in soil. *Aust. J. Soil. Res.* 17: 515-519.
- Redecker D, Thierfelder H, Walker C, Werner D. 1997. Restriction analysis of PCR-amplified internal transcribed spacers of ribosomal DNA as a tool for species identification in different genera of the order Glomales. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 1756-1761.
- Rini MV, Yelli F, Tambunan DL, Damayanti I. 2021. Morphological and molecular identifications of three native arbuscular mycorrhizal fungi isolated from the rhizosphere of *Elaeis guineensis* and *Jatropha curcas* in Indonesia. *Biodiversitas* 22(11): 4940-4947.

- Schwarzott D, Schüßler A. 2001. A simple and reliable method for SSU rRNA gene DNA extraction, amplification, and cloning from single AM fungal spores. *Mycorrhiza* 10: 203-207.
- Sieverding E. 1991. Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Management in Tropical Ecosystems. Technical Cooperation, Federal Republic of Germany, Eschborn.
- Simon L, Lalonde L, Bruns T. 1992. Specific amplification of 18S ribosomal genes from vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 291-295.
- Simon L, Lévesque RC, Lalonde M. 1993. Identification of endomycorrhizal fungi colonizing roots by fluorescent single strand conformation polymorphism-polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 4211-4215.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30(12): 2725-2729.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22(22): 4673-4680.
- Walker C. 1983. Taxonomic concepts in the Endogonaceae: spore wall characteristics in species descriptions. *Mycotaxon* 18: 443-455.
- Walker C, Vestberg M, Demircik F, Stockinger H, Saito M, Sawaki H, Nishimura I, Schußler A. 2007. Molecular phylogeny and new taxa in the Archaeosporales (Glomeromycota): *Ambispora fennica* gen. sp. nov., *Ambisporaceae* fam. nov., and emendation of Archaeospora and Archaeosporaceae. *Mycol. Res.* 111: 137-153.
- Wyss P, Bonfante P. 1993. Amplification of genomic DNA of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi by PCR using short arbitrary primers. *Mycol. Res.* 97: 1351-1357.
- Yoshida DD, Forno DA, Cock JH, Gomez KA. 1976. Laboratory Manual for Physiological Studies of Rice. 3rd Edition. International Rice Research Institute, Los Baños.
- Zézé A, Hosny M, Gianinazzi-Pearson V, Dulieu H. 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.
- <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- <https://invam.caf.wvu.edu/fungi/taxonomy/concepts/convtrad.htm>. Integration of conventional and developmental definitions of morphological characters. Diakses tanggal 24 Oktober 2022.
- <https://mycobank.org>

*The specimen is the beginning. All diagnostic information from the laboratory depends upon the knowledge by which specimens are being chosen and the care with which they are collected and transported.*

Cynthia A. Needham

## 2.8

# CENDAWAN DARK SEPTATE ENDOPHYTES

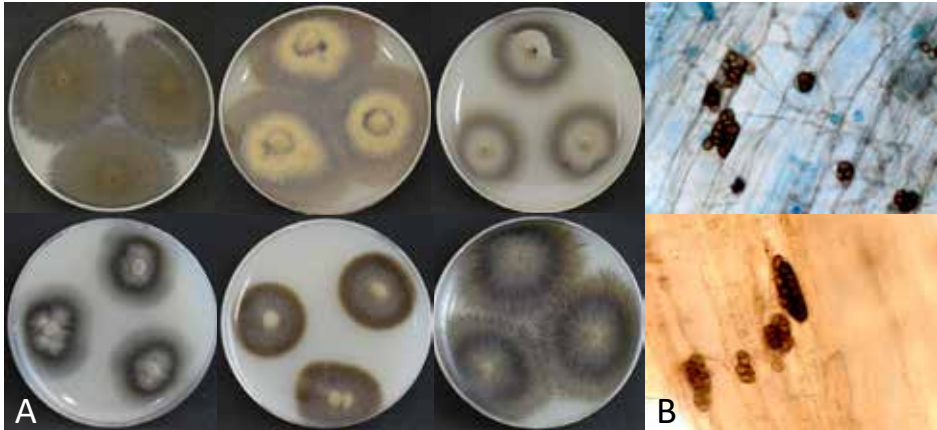
*Surono, Nicho Nurdebyandaru*

Salah satu kelompok cendawan endofit yang sekarang ini telah banyak dilaporkan memiliki kemampuan dalam memacu produktivitas berbagai tanaman pada kondisi cekaman baik abiotik maupun biotik adalah kelompok cendawan dark septate endophytes (DSE) (Diene *et al.* 2013, Khastini *et al.* 2014, Surono & Nariswa 2017, Surono & Narisawa 2018, Surono & Narisawa 2020). Surono dan Narisawa (2017) melaporkan bahwa spesies cendawan DSE, *Phialocephala fortinii*, berperan penting dalam memacu pertumbuhan tanaman pada kondisi nutrisi yang terbatas dengan mendegradasi senyawa karbon dan nitrogen organik sehingga menjadi tersedia sebagai sumber nutrisi bagi tanaman inangnya.

Cendawan DSE sesuai dengan namanya dapat diartikan sebagai cendawan endofit dengan hifa bersekat gelap. Cendawan ini merupakan kelompok cendawan yang hidup pada jaringan tanaman dengan karakteristik khas yang mudah diamati secara visual yaitu membentuk koloni kehitaman bila ditumbuhkan pada media agar. Dengan bantuan mikroskop, cendawan ini teramati dengan ciri hifa berwarna gelap karena mengandung melanin, dan umumnya membentuk kumpulan massa hifa berukuran kecil (mikrosklerotia) (Gambar 1). Cendawan ini mampu mengkolonisasi akar tanaman baik inter- maupun intraseluler tanpa menyebabkan gejala penyakit pada tanaman inangnya (Jumpponen & Trappe 1998, Diene *et al.* 2013; Surono & Narisawa 2017). Cendawan DSE dilaporkan bersimbiosis dengan 600 spesies tanaman seperti tanaman kehutanan dan pertanian (Jumpponen & Trappe 1998, Andrade-Linares *et al.* 2011, Mahmoud & Narisawa 2013).

Surono (2014) melaporkan bahwa species cendawan DSE, *Leptodontidium orchidichola*, secara nyata mampu memacu pertumbuhan tanaman tomat pada kondisi keasaman dan konsentrasi aluminium tinggi. Cendawan DSE juga mampu memacu pertumbuhan tanaman karet (Dalimunthe *et al.* 2019), tanaman tomat (Zaffan *et al.* 2019), tanaman cabai (Manalu *et al.* 2020), tanaman strawberry (Harsonowati *et al.* 2020). Akan tetapi, penelitian dan pengembangan potensi cendawan DSE di daerah tropis, khususnya Indonesia, masih terbatas, baik dari keanakeragaman, fungsi maupun peran cendawan DSE secara ekologi dalam mendukung produksi tanaman di bawah cekaman biotik dan abiotik serta untuk rehabilitasi lahan-lahan yang terdegradasi.

Penelitian peran dan manfaat cendawan DSE di Indonesia masih terbatas, oleh karena itu eksplorasi dan pemanfaatannya untuk pupuk hayati, biopestisida, agen remediasi dan fungsi lainnya secara berkelanjutan juga belum banyak dilakukan dan dilaporkan. Perlu dilakukan usaha untuk mengisolasi dan menyeleksi cendawan



Gambar 1. (A) Beberapa koloni cendawan DSE pada media Oatmeal Agar (OMA). (B) Hifa dan mikrosklerotia yang berwarna gelap teramati di mikroskop (Sumber: Nurdebyandaru 2013)

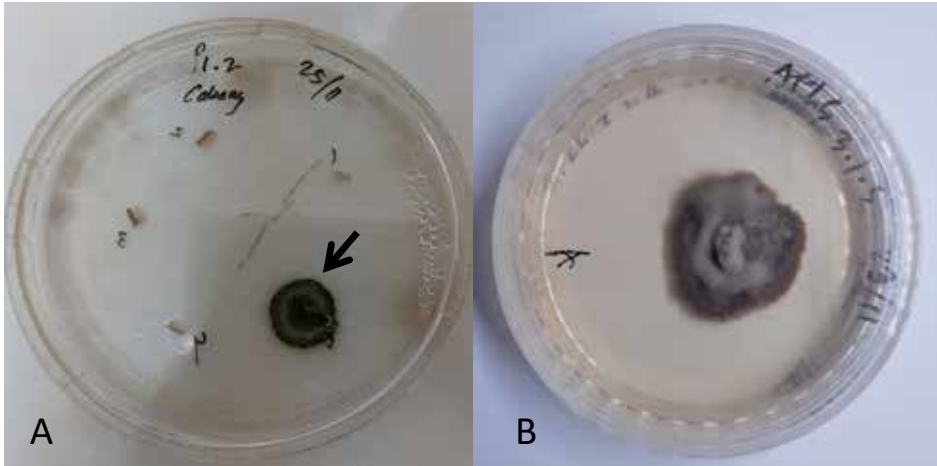
DSE asli Indonesia yang bisa dimanfaatkan sebagai agensia hayati terutama untuk mendukung pertumbuhan berbagai tanaman pada kondisi cekaman keasaman dan penyakit tanaman serta untuk mitigasi perubahan iklim, karena selama ini sebagian besar penelitian dan pengembangan cendawan DSE dilakukan di negara subtropik seperti Jepang, Jerman, Inggris, Amerika Serikat dan Kanada.

### Isolasi dan seleksi cendawan DSE

Ada dua metode isolasi cendawan DSE yang selama ini telah digunakan yaitu: 1) isolasi cendawan DSE dari akar tanaman yang langsung dikoleksi dari lingkungan alami dan 2) isolasi cendawan DSE dengan pengumpanan tanah (*soil baiting*).

#### Isolasi cendawan DSE dari akar tanaman yang langsung dikoleksi dari lingkungan alami

Dalam metode ini, sampel akar tanaman target diambil di areal pertanian, perkebunan, perhutanan, pertambangan, dan lokasi lainnya, terutama pada kondisi yang tercekam biotik dan abiotik atau lingkungan dengan karakteristik tertentu. Isolasi cendawan DSE dari akar tanaman merujuk pada metode Surono dan Narisawa (2017). Sampel akar tanaman yang telah diambil dari lapangan, yang tidak menunjukkan gejala terserang penyakit dicuci di bawah air mengalir dan disterilisasi tiga kali dengan 0.005% larutan tween 20 steril, kemudian dibilas tiga kali dengan aquades steril, dilanjut dibilas dengan 1% NaOCl 1 kali, dibilas kembali dengan aquades steril sebanyak tiga kali dan dikeringanginkan secara steril dengan menggunakan kertas tisu steril di dalam cawan Petri. Sampel akar yang telah disterilisasi dipotong kurang lebih 1-2 cm per segmen dan ditumbuhkan pada 50% media corn meal agar (CM; 8,5



Gambar 2. (A) Koloni gelap cendawan DSE yang keluar dari segmen sampel akar yang ditumbuhkan di media CMA (tanda panah). (B) isolat DSE yang berhasil dimurnikan, koloni berwarna gelap di media CMMYA

g corn meal, 7,5 g bacto agar, 1000 mL air distilasi) dalam ruang gelap selama >7 hari. Selama kultivasi, sampel akar diperiksa setiap 7 hari dan hanya koloni cendawan yang bermelanin atau berwarna gelap yang tumbuh lambat dari jaringan tanaman tersebut dipindahkan atau dimurnikan ke media 50% corn meal malt yeast agar (CMMY; 8,5 g corn meal, 7,5 g bacto agar, 10 g malt extract, 1.0 g yeast extract, 1000 mL air distilasi). Umumnya Cendawan DSE tumbuh lambat (pertumbuhan rata-rata < 3 mm per hari) dan terlihat setelah di atas 7 atau 14 hari.

### **Isolasi cendawan DSE menggunakan metode pengumpanan tanah (*soil baiting*)**

Isolasi cendawan DSE menggunakan metode pengumpanan tanah merujuk pada metode Narisawa (2008). Sampel tanah diambil dari areal pertanian, perkebunan, perhutanan, pertambangan, dan lokasi lainnya secara komposit. Sampel tanah diambil pada kedalaman 0-20 cm secara komposit selanjutnya disimpan pada kantong *polyethylene* dan disimpan pada suhu 4°C dengan maksimal penyimpanan 7 hari sebelum dimanfaatkan. Sampel tanah dicampurkan kompos yang telah disterilkan dengan perbandingan 1/3 (v/v) sebagai media tumbuh untuk pengumpanan DSE.

Tanaman yang digunakan untuk mengumpan cendawan DSE adalah tanaman yang mudah bersimbiosis dengan DSE yaitu tanaman non-mikoriza seperti tanaman kubis-kubisan (sawi putih (Chinese cabbage), caisim, pakcoi) dan tanaman mikoriza seperti tanaman tomat yang dilaporkan mudah bersimbiosis dengan cendawan DSE (Andrade-Linares *et al.* 2011; Zaffan *et al.* 2019; Surono 2014).

Benih sawi putih atau tomat disterilisasi permukaan dan dikeringanginkan semalam, setelahnya ditanam ke polybag berukuran 10 cm yang mengandung kira-

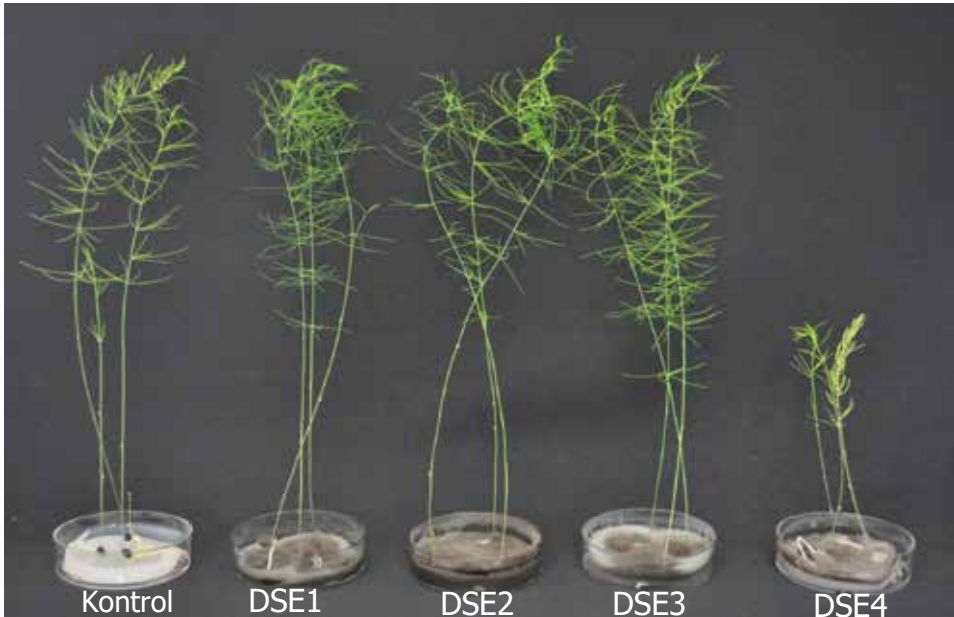
kira 200 mL tanah komposit yang telah disiapkan sebelumnya. Metode sterilisasi benih mengacu pada Surono dan Nariswa (2017) yaitu benih disterilasi permukaan dengan cara dibilas dengan 70% etanol menggunakan vortex mixer selama 1,5 menit, setelah itu dibilas natrium hipoklorit (1% klorin yang tersedia) selama 3 menit. Kemudian benih dibilas tiga kali dengan air distilasi steril, kemudian dikeringanginkan semalaman, dan ditempatkan pada 1,5% agar air (15 g Bacto agar per 1 L H<sub>2</sub>O) dalam cawan Petri. Setelah 5 – 7 hari, benih yang tumbuh baik dipindahkan ke media tumbuh yaitu 200 mL tanah komposit yang telah disiapkan.

Empat minggu setelah tanam, akar tanaman sawi putih dan tomat muda dikumpulkan dan dibersihkan dengan air mengalir dan dipilih 15 fragmen dari akar tanaman dan dari masing-masing fragmen dipotong kira-kira 1 cm persegmen. lalu dicuci tiga kali dengan 0.005% larutan tween 20 lalu bilas tiga kali dengan akuades steril dilanjutkan dengan 1% NaOCl datu kali dan bilas kembali dengan akuades steril tiga kali. Segmen akar dikeringanginkan dan ditempatkan pada petri berukuran 9 cm (tiga segmen per petri dengan pengulangan 3 kali) dengan media 50% CM. Inkubasi pada suhu 23°C, untuk identifikasi maka koloni cendawan tunggal diisolasi dan ditumbuhkan pada media OMA dan *Potato Dextrose Agar* (PDA).

### Uji patogenitas cendawan DSE

Untuk mengetahui apakah isolat yang berhasil dimurnikan bersifat pathogen atau non-pathogen dilakukan uji patogenitas. Uji patogenitas DSE dilakukan terhadap tanaman dengan menggunakan tanaman yang sangat sentitif/rentan terhadap cendawan pathogen seperti tanaman sawi putih atau caisim pada seleksi awal secara invitro di laboratorium mengacu pada metode yang dilakukan Surono dan Narisawa (2017). Pengamatan gejala penyakit yang timbul dilakukan pada 14 hari setelah inokulasi (HSI). Uji patogenitas negatif apabila isolate cendawan DSE tidak menimbulkan gejala penyakit pada bibit tanaman sawi putih atau caisim. Isolat-isolat cendawan DSE yang tidak menimbulkan gejala penyakit akan digunakan pada percobaan selanjutnya.

Inokulasikan isolat DSE pada media oatmeal agar (OMA; 10 g *oatmeal*, 18 g bacto agar, 1 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1.5 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g NaNO<sub>3</sub>, 1000 mL air distilasi) di cawan Petri dengan Kontrol yaitu media OMA tanpa diinoklasikan dengan isolat DSE. Setelah isolat yang ditumbuhkan di OMA tumbuh, kurang lebih 7- 14 hari setelah inkubasi, benih sawi putih steril diletakan di atas koloni isolat yang tumbuh kemudian dimasukan ke dalam botol plastik steril (Gambar 2), kemudian inkubasi selama 2 – 3 minggu di ruang tumbuh (growth chamber) dengan kondisi pencahayaan 12 jam: 12 jam (gelap: terang) pada suhu ruang (23°C). Benih yang tumbuh dievaluasi pertumbuhannya dan gejala penyakit yang muncul dengan indek dari 0 sampai 3, yaitu 0= tanpa gejala penyakit yang muncul, 1= muncul gejala penyakit dengan warna kekuningan pada tanaman, 2= tanaman menguning dan tumbuh lambat, 3= tanaman busuk atau mati. Setelah 2 – 3 minggu inkubasi, tanaman kemudian dipanen dan diukur berat keringnya. Berat



*Gambar 3. Uji patogenisitas tanaman dengan isolat-isolat target untuk mendapatkan isolat DSE terpilih. Isolat DSE1, DSE2, dan DSE3 tidak menunjukkan potensi sebagai pathogen pada tanaman inang (asparagus), sedangkan isolat DSE4 berpotensi sebagai pathogen karena tanaman asparagus yang diinokulasi isolat ini menunjukkan gejala penyakit tanaman yaitu tumbuh kerdil dan kekuningan (Surono & Narisawa 2015)*

kering tanaman yang diinokulasi dengan isolat DSE dibandingkan dengan berat kering tanaman kontrol (tanpa diinokulasi dengan DSE). Isolat DSE yang tidak menyebabkan munculnya gejala penyakit atau mati pada tanaman target serta berat keringnya tidak berbeda nyata atau lebih tinggi berbeda nyata dengan kontrol digunakan untuk penelitian selanjutnya (Narisawa & Diene, 2006).

### **Identifikasi morfologi dan molekuler cendawan DSE terpilih**

#### **1. Identifikasi morfologi.**

Isolat cendawan DSE dikulturkan pada media PDA untuk pengamatan morfologi dan karakter sporulasi pada setiap isolat. Prosedur untuk identifikasi morfologi sesuai dengan Diene *et al.* (2013) dengan menggunakan kultur slide yang terdiri dari potongan agar PDA untuk kultivasi isolat jamur DSE terpilih dan mikroskop. Sel diamati di bawah mikroskop cahaya. Isolat steril diidentifikasi sebagai miselia steril dan sporulasi isolat diidentifikasi berdasarkan pada morfologi dan karakteristik spora.

Selain itu, merujuk pada Surono dan Narisawa (2017), untuk menyelidiki tingkat pertumbuhan dan karakteristik koloni, cendawan DSE terpilih ditumbuhkan di media

yang berbeda seperti 50% CMMY, 2% MEA, OMA, dan 1.5% water agar, lalu disimpan pada suhu ruang dan pada suhu 13°C dan 4°C untuk beberapa jenis cendawan DSE yang sulit bersporulasi seperti *P. fortinii* complex. Untuk cendawan DSE yang sulit bersporulasi maka inkubasi pada suhu 13°C dan atau 4°C selama >4 bulan.

## 2. Identifikasi molekuler.

Metode identifikasi molekuler merujuk pada metode Mahmoud dan Narisawa (2013). Biomassa miselium segar berumur seminggu pada media MEA atau PDA dijadikan sebagai sumber DNA. Ekstraksi DNA menggunakan kit DNA (PrepMan™ Ultra Extraction Kit dari Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) sesuai dengan protokol dari pabrikan. Ekstrak DNA kemudian diamplifikasi menggunakan primer universal berupa ITS1F (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G- 3') dan ITS4R (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC- 3') dengan target DNA pada wilayah ITS pada operon RNA ribosomal dalam mesin PCR. Untuk setiap sampel, amplifikasi dilakukan pada tabung mikro yang terdiri atas: 2.5µL untuk setiap primer dengan konsentrasi 0.2 µM, 4µL deoksinukleosida triphospat (0.2 mM), 5µL 10 x Ex Taq buffer, 0.15µL Ex Taq DNA polymerase (0.25 U), dan 0.5 µL DNA cetakan (*template*) dan ditambahkan dengan air murni (MiliQ)/akuabides hingga volume mencapai 50µL. Kondisi PCR meliputi *pre-denaturation* pada suhu 94oC selama 4 menit, dilanjutkan dengan *denaturation* pada suhu 94oC selama 35 detik, *annealing* pada suhu 52°C selama 55 detik, *extention* pada suhu 72°C selama 2 menit (yang diulang sebanyak 35 siklus), dan final extension pada suhu 72°C selama 10 menit. Sebanyak 5µL hasil amplifikasi dari mesin PCR kemudian dielektroforesis pada gel agarose 1% dalam buffer 1 X TAE pada tegangan 100 Volt selama 20 menit. Gel kemudian direndam dalam larutan etidium bromide (EtBr) atau GelRed (Wako Pure Chemical Japan) selama kurang lebih 20 menit dan divisualisasikan dibawah UV *transilluminator*.

Produk PCR kemudian akan disekuensing untuk diketahui urutan nukleotidanya. Di Indonesia proses sekuensing dilakukan dengan memanfaatkan dan mengirimkan produk PCR ke perusahaan jasa sekuensing untuk disekuensing dikarenakan masih terbatasnya institusi yang memiliki fasilitas mesin sekuensing. Namun proses sekuensing juga dapat dilakukan merujuk pada metode Nurdebyandaru (2013). Pertama-tama produk PCR dimurnikan dengan menambahkan 43,5µL larutan pemurnian PCR (12µL 3M CH3COONa pH 4,8, 30µL 40% PEG, dan 1,5µL 200 mM MgCl2) ke dalam masing-masing tabung produk PCR tersebut kemudian dihomogenisasi (*vortex*) dan diinkubasi pada suhu 4°C semalaman. Setelah waktu inkubasi, larutan tersebut disentrifugasi pada kecepatan 15000 rpm di suhu 4°C selama 15 menit. Fase supernatant dari proses sentrifugasi kemudian dibuang. Sekitar 180µL etanol 80% ditambahkan dan larutan disentrifugasi pada 15000 rpm, suhu 4°C selama 15 menit kemudian fase supernatan juga dibuang. Etanol absolut (100%) kemudian ditambahkan dan larutan disentrifugasi dengan kondisi yang sama seperti yang disebutkan di atas.

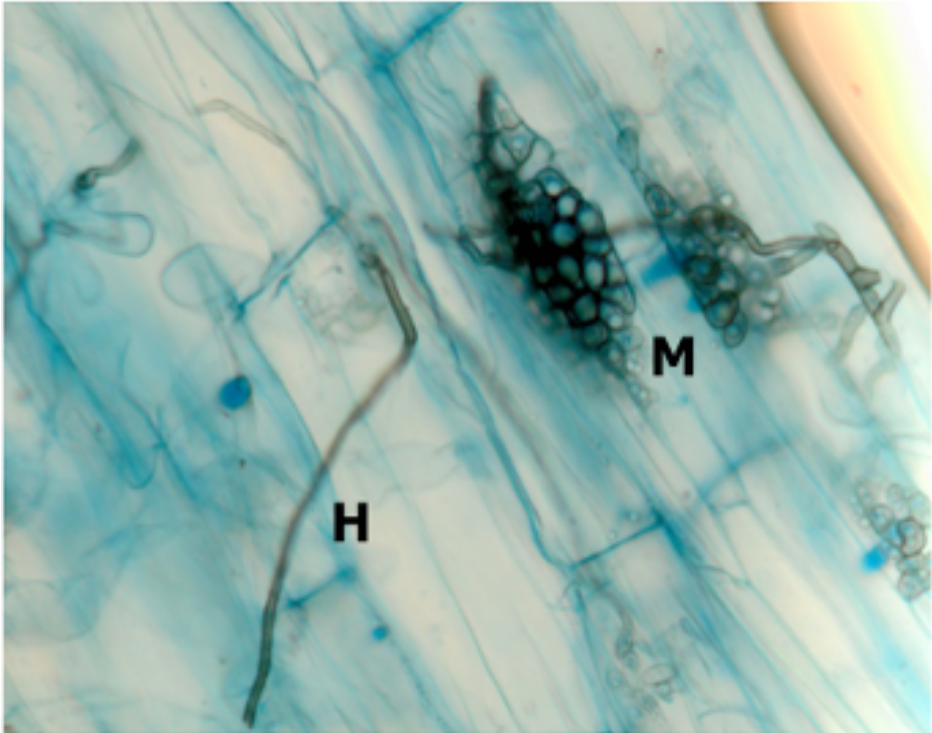
Produk PCR yang telah dimurnikan kemudian diamplifikasi (PCR-Sekuensing) dengan menambahkan 0,5 µL template DNA ke dalam larutan sistem yang terdiri atas



Gambar 4. Hifa bersekat gelap steril pada salah satu isolat cendawan DSE

1,5 $\mu$ L Buffer, 0,5 $\mu$ L BigDye, 0,32 $\mu$ L primer ITS1F, dan air murni (miliQ water) hingga volume mencapai 9,5 $\mu$ L dalam tabung PCR 0,2 ml. Siklus PCR-Sekuensing di-setting pada kondisi berikut: 2 menit untuk pre-denaturation pada suhu 96 $^{\circ}$ C, diikuti oleh 25 kali siklus *denaturation* 30 detik pada suhu 96 $^{\circ}$ C, 15 detik primer *annealing* pada suhu 50 $^{\circ}$ C, dan 3 menit *extension* pada suhu 60 $^{\circ}$ C. Hasil dari PCR-Sekuensing kemudian dimurnikan dengan menambahkan larutan: 12 $\mu$ L 3M CH<sub>3</sub>COONa pH 4.8, 30 $\mu$ L 40% PEG, and 1.5 $\mu$ L 200 mM MgCl<sub>2</sub> dengan volume sebanyak 3x dari volume produk hasil PCR-Sekuensing. Larutan yang sudah ditambahkan dengan produk PCR-Sekuensing tersebut kemudian disentrifugasi pada kecepatan 15000 rpm selama 20 menit pada suhu 4 $^{\circ}$ C. Supernatan yang terbentuk kemudian dibuang dan ditambahkan dengan 50 $\mu$ L etanol 70% dan disentrifugasi kembali pada kondisi seperti di atas. Fase supernatan dibuang dan menyisakan fase pellet yang dikeringkan di dalam kertas tisu steril (tertutupi kertas tisu) selama semalaman pada kondisi suhu ruang. Sebanyak 20 $\mu$ L larutan sekuensing (HIDI) kemudian ditambahkan pada masing-masing sampel (pellet) dan dihomogenasi pada kecepatan 2000 rpm selama 2 menit. Larutan kemudian dipindahkan pada plat berisi 96 sel (96-cell-plate) untuk dimasukkan ke dalam mesin sekuensing ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystem).

Hasil dari mesin sekuensing berupa file dengan format ABI dan SEQ (format FASTA) yang menyajikan informasi terkait urutan basa nitrogen pada wilayah sekuen ITS 5.8rDNA. Sekuen ini kemudian dianalisis dan dibandingkan dengan sekuens DNA dari database pada National Center for Biotechnology Information (NCBI). Sekuen yang homolog kemudian diambil untuk di-align atau disejajarkan dengan sekuen yang sedang dianalisis (sekuen sampel) dengan menggunakan program MEGA versi



Gambar 5. Kolonisasi cendawan DSE pada akar tanaman tomat berupa hifa gelap (H) dan membentuk mikrosklerotia (M)

terbaru (Tamura *et al.* 2011). Sekuen ITS juga bisa di-align secara *online* pada website seperti MAFFT versi 7 (<http://mafft.cbrc.jp/>). Analisis filogenetik dan pohon filogenetik dibangun dengan metode *Maximum likelihood* (ML) dengan mencari model dan perlakuan terbaik pada program MEGA dengan ulangan bootstrap sebanyak 1000 kali. Pohon filogenetik ini berguna untuk mengetahui hubungan kekerabatan sekuen sampel dengan sekuen spesies-spesies DSE lainnya yang telah teridentifikasi secara molekuler.

### **Pengamatan kolonisasi DSE pada tanaman target**

Untuk membuktikan apakah isolat yang diuji menunjukkan karakter sebagai DSE maka perlu dianalisis kemampuan kolonisasinya pada akar tanaman yang diinokulasikan dengan isolat tersebut. Kolonisasi DSE pada akar tanaman inang baik inter- maupun intraseluler serta beberapa species DSE menunjukkan bentuk mikrosklerotia di dalam jaringan akar tanaman.

Kolonisasi DSE pada akar diamati dengan metode pewarnaan akar menggunakan protokol Zhang *et al.* (2015). Sampel akar dicuci dengan air steril mengalir dan dipotong sekitar 2 cm. Potongan akar direndam dengan KOH 10% pada suhu 90°C selama

90 menit di waterbath. Potongan akar dibilas dengan aquades 3-5 kali kemudian direndam HCl 1N selama 24 jam. Selanjutnya akar diwarnai dengan fuchisine acid 20-30 menit dan disimpan dalam gliserol 50% dan dibuat preparat. Preparat tersebut diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 400x.

Selain menggunakan protokol Zhang *et al.* (2015), teknik pewarnaan kolonisasi DSE bisa juga mengacu pada Narisawa dan Diene (2011) yaitu akar tanaman target umur 2 atau 3 minggu dicuci, kemudian dipotong melintang menggunakan alat Microtome, dan diwarnai dengan larutan asam asetat 50% yang mengandung 0,005% cotton blue, kemudian diperiksa menggunakan mikroskop cahaya (BX51; Olympus, Tokyo, Jepang).

### Daftar Pustaka

- Andrade-Linares DR, Grosch R, Franken P, Rexer KH, Kost G, Restrepo S, Cepero de Garcia MC, Maximova E. 2011. Colonization of roots of cultivated *Solanum lycopersicum* by dark septate and other ascomycetous endophytes. *Mycologia* 103, 710e721.
- Dalimunte CI, Soekarno BPW, Munif A, Surono. 2019. Seleksi dan Uji Potensi Cendawan Dark Septate Endophyte sebagai Agen Hayati Penyakit Jamur Akar Putih (*Rigidoporus Microporus*) pada Tanaman Karet (Selection and Potential Test of Dark Septate Endophytes Fungus as Biological Agent of White Root Rot Disease (*Rigidoporus microporus*) on the Rubber Plant). *Jurnal Penelitian Karet*, 2019, 37 (1) : 11 – 20 (Indonesian J. Nat. Rubb. Res. 2019, 37 (1) : 11 – 20). Doi : <https://doi.org/10.22302/ppk.jpk.v37i1.624>.
- Diene O, Wang W, Narisawa K. 2013. *Pseudosigmoidea ibarakiensis* sp. nov., a dark septate endophytic fungus from a cedar forest in Ibaraki, Japan. *Micr. Envir.* 28, 381-387.
- Harsonowati W, Marian M, Surono, Narisawa K. 2020. The Effectiveness of a Dark Septate Endophytic Fungus, *Cladophialophora chaetospora* SK51, to Mitigate Strawberry Fusarium Wilt Disease and With Growth Promotion Activities. *Front. Microbiol.* 11:585. doi: 10.3389/fmicb.2020.00585.
- Jumpponen A, Trappe JM. 1998. Dark septate endophytes: a review of facultative biotrophic root-colonizing fungi. *New Phytol.* 140:295-310.
- Kazuhiko N, Diene O. 2011. Isolation and selection of fungal endophytes for the suppression of soil-borne diseases, *In: Prospects and Applications for Plant-Associated Microbes: A laboratory Manual*. BioBien Innovations, Paimio, Finland
- Khastini RO, Ogawara T, Sato Y, Narisawa K. 2014. Control of *Fusarium* wilt in melon by the fungal endophyte, *Cadophora* sp. *Euro. J. Plant Pathol.* 139, 339-348.
- Mahmoud RS, Narisawa K. 2013. A New Fungal Endophyte, *Scolecobasidium humicola*, promotes tomato growth under organic nitrogen conditions. *PLoS ONE* 8 (11), e78746.
- Manalu JN, Soekarno BPW, Tondok ET, Surono. 2020. Isolation and Capability of Dark Septate Endophyte Against Mancozeb Fungicide. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*

- (JIPI), Vol. 25 (2): 193-198. DOI: 10.18343/jipi.25.2.193.
- Narisawa K. 2008. Collection of dark septate endophytic fungi from forest soil at the southwest subtropics in Japan. Annual report on exploration and introduction of microbial genetic resources. Ann. Rep. Natl. Inst. Agrobiol. Res. 21, 1-6.
- Nurdebyandaru N. 2013. Effect of Dark Septate Endophyte (DSE) Treatment on Chili and Lettuce Plant under High Temperature Condition. Thesis. Japan: Ibaraki University.
- Surono, Narisawa K. 2015. Isolation and selection of cellulolytic dark septate endophytic fungi that able to promote asparagus plant growth. The 7th Japan-Taiwan-Korea International Symposium on Microbial Ecology, Tsuchiura, Japan.
- Surono, Narisawa K. 2020. The cellulolytic activity and symbiotic potential of dark septate endophytic fungus *Phialocephala fortinii* to promote non-mycorrhizal plants growth. IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci. 648 012165.
- Surono, Narisawa K. 2017. The dark septate endophytic fungus *Phialocephala fortinii* is a potential decomposer of soil organic compounds and a promoter of *Asparagus officinalis* growth. Fungal Ecol. 28, 1–10. doi: 10.1016/j.funeco.2017.04.001.
- Surono, Narisawa K. 2018. The inhibitory role of dark septate endophytic fungus *Phialocephala fortinii* against *Fusarium* disease on the *Asparagus officinalis* growth in organic source conditions. Biological Control 121: 159-167. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.02.017>.
- Surono. 2014. Isolation and selection of dark septate endophytic fungi for cellulose decomposition and plant growth promotion in different nitrogen sources and stress conditions . Master Thesis, Ibaraki University, Japan.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol Biol Evol. 28:2731-2739.
- Yuliani D, Soekarno BPW, Munif A, Surono. 2020. Antagonism potency of dark Septate endophytes against *Pyricularia oryzae* for improving health of rice plants. Jurnal Agro, 7(2), 134-147. <https://doi.org/10.15575/9589>
- Zaffan ZR, Soekarno BPW, Munif A, Surono. 2018. Potential of Indonesia's Indigenous Dark Septate Endophytic Fungi To Control *Fusarium* Wilt *In Vitro*. In: Fernandez JC, Wibowo C, editors. Proceedings of the SEAMEO BIOTROP Third International Conference on Tropical Biology Ecological Restoration in Southeast Asia: "Conservation, Enhancement and Sustainable Use of Indigenous Tropical Flora and Fauna". Proceedings: 2018 Sept 21-20; Bogor. Bogor (ID): SEAMEO BIOTROP. P. 143-148.
- Zhang FJ, Zhang KK, Du CZ, Li J, Xing YX, Yang LT, Li YR. 2015. Effect of drought stress on anatomical structure and chloroplast ultrastructure in leaves of sugarcane. Sugar Tech, 17, 41–48.

## 2.9

# BAKTERI SIDEROFOR

Edi Husen

Saat ini, pemanfaatan bakteri siderofor (*siderophore*) semakin berkembang. Hal ini terkait dengan perannya yang penting dalam menyediakan besi untuk tanaman dan mengurangi penggunaan besi oleh mikroba patogen untuk menekan berkembangnya penyakit tanaman. Siderofor merupakan suatu senyawa pengompleks  $\text{Fe}^{3+}$  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  $\text{Fe}^{3+}$  rendah. Namun dalam beberapa kasus, pengkhelatan  $\text{Fe}^{3+}$  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 penelitian terkini memperlihatkan peran bakteri ini dalam meningkatkan pertumbuhan tanaman bahkan pada lahan salin yang kandungan besinya rendah (Sultana *et al.* 2021)

Beberapa jenis rhizobakteri 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 dan Neilands (1987) lebih populer dipakai karena kemudahannya mendeteksi koloni bakteri penghasil siderofor yang berwarna kuning (orange) 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 dan Neilands (1987) yang dimodifikasi oleh Alexander dan Zuberer (1991).

### 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 bakteri siderofor dapat melepaskan Fe dari media dan menyembunyikannya yang ditandai oleh koloni bakteri berwarna kuning (*orange*) yang sangat kontras dengan warna biru media agar Fe-CAS agar.

### Metode Pengujian

#### Bahan

- Suspensi sel bakteri (potential siderophore producing bacteria) yang akan diuji (dari tanah atau biakan murni)
- Cawan Petri
- Labu Erlenmeyer
- Gelas Beker
- 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 =  $C_{23}H_{13}C_{12}O_9SN_3$ ) adalah campuran dari 4 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  $50^\circ\text{C}$ .

- 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  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 g NaCl, dan 1 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . 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) --> 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  $\text{CaCl}_2$ ; 1,17 mg  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 1,4 mg  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ; 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%) --> 30 mL
  - Larutkan 3 g asam cassamino dalam 30 mL akuades (10%, berat volume), kemudian disterilisasi dengan saringan mikro (0,2  $\mu\text{m}$ ).

## Prosedur

### 1. Pembuatan Media Fe-CAS agar

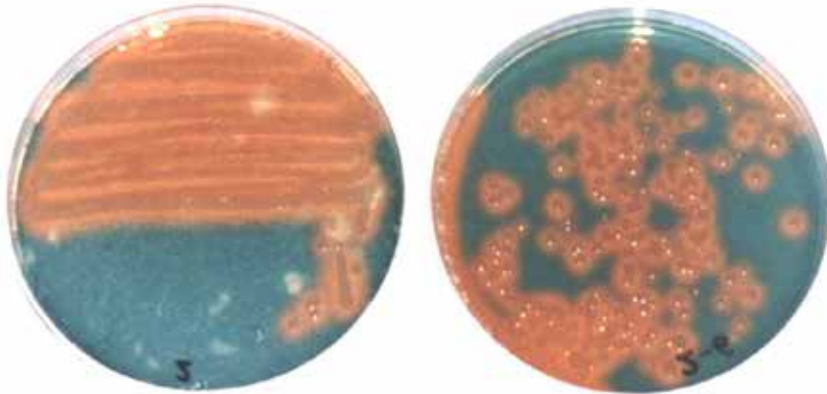
- Pada suhu larutan sekitar 50°C, tambahkan larutan III dan IV ke dalam Larutan II (larutan bufer + agar). Larutan I (larutan indikator) ditambahkan terakhir dengan mengaduk secara perlahan sampai keempat larutan tercampur rata (hindari terbentuknya gelembung). Campuran ini menghasilkan media kompleks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

### 2. Inokulasi dan Inkubasi

- Inokulasi Fe-CAS agar dengan suspensi sel bakteri dengan metode gores atau sebar. Untuk metode sebar, gunakan sebanyak 50  $\mu\text{L}$  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 (*orange*) yang kontras dengan warna biru media Fe-CAS agar seperti tampak pada Gambar 1.

## 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.



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)

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

### Daftar Pustaka

- Alexander DB, Zuberer DA, 1991. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biol. Fertil. Soils* 2: 39-45.
- Bakker PAHM, van der Sluis I, Verhagen B, de Jong M, van Loon LC. 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 JJ. 1994. Isolation of Microorganisms Producing Antibiotics, p 379-405 *In* Weaver RW, Angle S, Bottomley P, Bezdicek D, Smith S, Tabatabai A, Wollum A (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 JW. 1993. Plant growth promoting rhizobacteria as biological control agents. p. 255-274. *In* Meeting Jr JB. (Ed.) *Soil Microbial Ecology, Applications in Agricultural and Environmental Management*. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Mullen MD. 1998. Transformation of other elements. p 369-386. *In* Silvia DM, Fuhrmann JJ, Hartel PG, Zuberer DA (Eds.) *Principles and Application of Soil Microbiology*. Prentice Hall. New Jersey.
- Neilands JB. 1982. Microbial envelope proteins related to iron. *Annu Rev. Microbiol* 36: 285-309

- Reid R K, Reid CPP, Szaniszlo PJ. 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, Neilands JB. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* 160: 47-56
- Subba-Rao NS. 1999. *Soil Microbiology* (4th Edition of *Soil Microorganisms and Plant Growth*). Science Publishers, Inc. USA.
- Sultana S, Alam S, Karim MM 2021. Screening of siderophore-producing salt-tolerant rhizobacteria suitable for supporting plant growth in saline soils with iron limitation. *J. Agriculture and Food Research* 4 (2021) 100150: 1-5

*Water is very good servant, but it is a cruel master*

John Bullein

## 2.10

# MIKROBA PEROMBAK BAHAN ORGANIK

*Selly Salma, Erny Yuniarti, Rosmimik*

Mikroba perombak bahan organik (dekomposer) adalah organisme yang mengurai organisme mati, atau senyawa organik di alam untuk kelangsungan siklus ekologi di alam (Jondhale *et al.* 2015). Dalam siklus hara alami, peranan dekomposer antara lain: (a) memecah rangkaian C rantai panjang (lignin, selulosa, hemiselulosa, lemak/lipid, kitin, keratin, dan lainnya) menjadi rangkaian C yang lebih pendek (Kanazawa & Miyashita 1987, Jondhale *et al.* 2015). Akibat dari proses ini terjadi mineralisasi/pelepasan hara (N, P, K, Ca, Mg, dan lainnya) yang semula dalam bentuk ikatan organik yang tidak bisa dipakai oleh tanaman menjadi hara dalam bentuk anorganik yang dapat diambil tanaman; (b) sebagian besar organisme pengurai (dekomposer) menghasilkan fitohormon sehingga secara tidak langsung membantu peningkatan pertumbuhan tanaman; (c) akibat dari adanya proses dekomposisi di dalam tanah, terjadi perbaikan sifat fisik tanah; dan (d) menyediakan sumber C-organik bagi hayati tanah lainnya yang tidak mampu menggunakan C-organik kompleks (C-rantai panjang). Mikroba perombak bahan organik terdiri atas kelompok bakteri, fungi, dan aktinomiset yang dapat melakukan penguraian bahan organik melalui aktivitas enzim-enzim ekstraseluler yang dihasilkan, baik enzim hidrolitik maupun oksidatif.

Selulosa merupakan komponen utama dari dinding sel tanaman, disamping hemiselulosa dan lignin. Ketiga komponen tersebut terikat secara kuat melalui ikatan kovalen dan nonkovalen. Di alam, karena keterikatan yang sangat kuat dari ketiga polimer tersebut menyebabkan lignoselulosa (kayu, limbah pertanian, kehutanan, dan lainnya) sulit untuk didegradasi. Selulosa merupakan polimer linier terdiri dari 100-14.000 unit glukosa yang terikat pada ikatan P<sub>1</sub>-4-glukosida (Beguin *et al.* 1987, Bisaria & Mishra 1989, Coughlan 1985). Pada serat tanaman, selulosa tersusun dari fibril-fibril yang terdiri dari beberapa molekul selulosa secara paralel. Di dalam serat selulosa, susunan ini membentuk bagian dengan susunan fibril yang sangat teratur, yang disebut dengan bagian kristal dan bagian dengan susunan fibril yang kurang teratur, yang disebut dengan bagian amorf (Enari 1983, Goksoyr & Eriksen 1980, Preston 1986). Tingkat kristanilitas dalam suatu serat selulosa bervariasi tergantung pada sumber selulosa dan perlakuan yang diberikan pada selulosa tersebut. Karena susunannya yang sangat teratur maka bagian kristal ini sulit untuk didegradasi. Senyawa lain yang berada bersama-sama lignoselulosa, misalnya pada limbah tandan kosong kelapa sawit adalah lemak. Demikian halnya dengan keratin dan karbohidrat tingkat tinggi yang sering kali terdapat pada limbah sampah kota. Tetapi kedua senyawa tersebut relatif mudah untuk didekomposisi.

## Peralatan

- Cawan Petri steril
- Mikropipet P-1000 dan P-200
- Mikrotip 1000  $\mu$ l dan 200  $\mu$ L
- Erlenmeyer 250 mL
- Tabung reaksi
- Inkubator
- Neraca Analitik ketelitian 2 desimal
- Autoklaf
- Pembakar bunsen
- pH Meter
- Sterile cabinet / Laminar Air Flow (LAF)
- Vortex
- Sprider/segi tiga penyebar
- Autoklaf
- Beaker glass 1 L

## Bahan

- Contoh sampel
- Medium CMC (*Carboxymethylcellulose*) untuk fungi
- Medium CMC untuk bakteri
- Medium *Pepton Yeast*
- *Congo Red*
- Na Cl
- Distilled water

## Prinsip dan Prosedur kerja

### (1) Isolasi mikroba perombak bahan organik

#### Prinsip

Sampel yang dikoleksi dari alam diasumsikan mengandung mikroba perombak bahan organik. Sampel tersebut ditumbuhkan pada media pertumbuhan mikroba yang mengandung selulosa sebagai satu-satunya sumber C sebagai contohnya adalah Medium CMC. Mikroba yang dapat tumbuh pada substrat berselulosa tersebut disebabkan kemampuannya menghasilkan enzim selulase, untuk mendekomposisi selulosa, yang digunakan sebagai sumber energi untuk kelangsungan hidup mikroba.

#### Prosedur kerja

- Media cair CMC
  - Komposisi media untuk menstimulasi pertumbuhan bakteri selulolitik

adalah : (g/100 mL) 0,05 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,23 g NaCl, 0,5 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,2 g Ekstrak Yeast dan 1 g CMC (Peristiwati *et al.* 2018), sedangkan komposisi media untuk menstimulasi pertumbuhan fungi selulolitik adalah (g/100 mL) 0,05 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,05 g KCl, 0,02 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,01 g  $\text{CaCl}_2$ , 0,05 g Ekstrak Yeast, 0,001 g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  dan 1 g CMC (Kusumawati *et al.* 2020).

- Pertumbuhan pada media isolasi
  - Sebanyak 10 g sampel dimasukkan ke 90 mL media cair CMC steril, atau perbandingan sample dan media 1: 10. Selanjutnya dishaker 150 rpm pada suhu ruang selama 3 sampai 5 hari untuk bakteri dan 5 sampai 7 hari untuk fungi.
- *Platting*
  - Setelah akhir masa inkubasi, suspensi media CMC dan sample tersebut diencerkan  $100\times (10^{-1})$  sampai dengan  $10.000.000\times (10^{-7})$ .
  - Setiap kali tahap pengenceran, sampel harus divortex dengan benar
  - Pipet sebanyak 100  $\mu\text{L}$  dari setiap seri pengenceran ke dalam medium padat CMC yang telah disiapkan di cawan petri steril.
  - Ratakan dengan batang penyebar (*spreader*) steril, dengan arah seperti terlihat pada Gambar 1.
  - Inkubasikan cawan di dalam inkubator pada suhu  $30^\circ\text{C} (\pm 2^\circ\text{C})$  dengan posisi cawan terbalik selama 5 sampai 7 hari untuk fungi dan 3 sampai 5 hari untuk bakteri.
  - Untuk memvisualisasikan zona bening di sekitar koloni, lakukan pewarnaan pada medium supaya zona bening tampak jelas di sekitar koloni dengan menggunakan larutan 0,1% *Congo Red* (Cabrera *et al.* 2013). Pewarnaan pada Sazci dan Erenle (1986) menggunakan 1% *Congo Red*, sedangkan Yoon *et al.* (2007) menggunakan 0,5% *Congo Red*.
  - Siram permukaan medium CMC yang telah dtumbuhi fungi atau bakteri dengan larutan Congo Red sampai semua permukaan tergenangi selama 15 menit, selanjutnya dicuci dengan 1M NaCl.
  - Amati koloni yang koloni fungi dan bakteri yang terdapat zona bening di sekitarnya. Koloni tersebut diisolasi dan ditumbuhkan pada media padat CMC yang sama (Ulrich & Wirth 1999). Tahapan ini diulangi sampai diperoleh koloni tunggal yang murni.
  - Koloni tunggal selanjutnya disimpan pada media cair *Pepton Yeast* dengan 20% gliserol (Cabrera *et al.* 2013).



Gambar 1. Pola teknik penyebaran di cawan Petri

## (2) Enumerasi mikroba perombak bahan organik

### Prinsip

Menghitung koloni fungi selulolitik dan bakteri selulolitik pada media spesifik dengan CMC sebagai satu-satunya sumber C.

### Prosedur kerja

- Media padat CMC
  - Komposisi media padat CMC sama dengan prosedur di atas dengan penambahan 1,5% agar.
- *Plating*
  - Masukkan contoh 10 g sampel atau 10 mL sampel ke dalam 90 mL larutan 0,85% garam fisiologis steril dalam erlenmeyer 250 ml atau botol selai (faktor pengenceran  $10\times$  atau  $10^{-1}$ )
  - Larutan tersebut dikocok pada shaker 100 rpm selama 20 menit pada suhu ruang atau dihomogenkan menggunakan stomacher
  - Larutan tersebut diencerkan  $100\times$  ( $10^{-2}$ ) sampai dengan  $10.000.000\times$  ( $10^{-7}$ )
  - Setiap kali tahap pengenceran, sampel harus divortex dengan benar
  - Pipet 100  $\mu\text{L}$  dari setiap seri pengenceran ke dalam medium CMC yang telah disiapkan di cawan Petri steril, lakukan duplo.
  - Ratakan dengan batang penyebar (sprider) steril, dengan pola seperti Gambar 1.
  - Inkubasikan cawan pada inkubator dengan suhu  $30^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) dengan posisi cawan terbalik selama 5 sampai 10 hari untuk fungi dan 3 sampai 7 hari untuk bakteri.
  - Untuk memvisualisasikan zona bening di sekitar koloni, lakukan pewarnaan menggunakan. Setelah akhir masa inkubasi, lakukan pewarnaan pada

Tabel 1. Formulir penghitungan colony forming unit (cfu)

Faktor Pengenceran	Jumlah koloni			Rata-rata Cfu mL <sup>-1</sup>
	Cawan I	Cawan II	Rata-rata	
1:10 <sup>-1</sup>				
1:10 <sup>-2</sup>				
1:10 <sup>-3</sup>				
1:10 <sup>-4</sup>				
1:10 <sup>-5</sup>				
1:10 <sup>-6</sup>				
Rata-rata				

medium supaya zona bening tampak jelas di sekitar koloni dengan menggunakan larutan 0,1% atau 1% atau 0,5% *Congo Red*.

- Siram permukaan medium CMC yang telah ditumbuhi fungi atau bakteri dengan larutan *Congo Red* sampai semua permukaan tergenangi selama 15 menit, selanjutnya dicuci dengan 1M NaCl.
- Lakukan penghitungan terhadap koloni fungi dan bakteri yang terdapat zona bening di sekitarnya pada setiap seri pengenceran
- Lakukan perhitungan dalam satuan *colony forming unit* (cfu) per gram sampel (cfu/g sampel kering) seperti pada Tabel 1.

Untuk menghitung jumlah bakteri/fungi per mL pada suatu pengenceran adalah sbb :

$$\text{Cfu/mL atau Cfu/g} = \frac{\text{Jumlah koloni pada cawan}}{\text{Vol sampel yang disebar (mL)}} \times \text{FP}$$

Sebagai contoh, apabila dengan menginokulasikan 0,1 ml sampel (100 µL) pada pengenceran 10<sup>-4</sup> yang ditemukan 45 koloni bakteri, maka perhitungannya sebagai berikut :

$$45 / (0,1 \text{ mL} \times 10^{-4}) = 45/10^{-5} = 4,5 \times 10^6 \text{ cfu bacteria per mL.}$$

### (3) Karakterisi mikroba perombak bahan organik

#### Prinsip

Karakterisasi dilakukan dengan mengukur aktivitas degradasi dari kultur murni atau solat tunggal.

#### Prosedur kerja

- Media padat Mineral Medium
  - Komposisi media padat Mineral Medium per L 7 g  $K_2HPO_4$ , 2 g  $KH_2PO_4$ , 0,1 g  $MgCl_2 \cdot 7H_2O$ ; 1 g  $NH_4Cl$ , 5 g NaCl, 10 g agar, 1L distilled water, 1 L, pH7,6, yang ditambahkan CMC dengan konsentrasi  $2 \text{ mg mL}^{-1}$
- Setiap isolat murni diinokulasikan tepat di tengah cawan Petri yang berisikan media tersebut, dengan ukuran 1 mm x 1 mm atau menggunakan ring dengan diameter 20 mm, inkubasikan pada incubator dengan suhu  $30^\circ\text{C} (\pm 2^\circ\text{C})$  selama 7 hari. Pengamatan dilakukan setiap hari.
- Apabila telah nampak pertumbuhan bakteri atau fungi dengan zona bening yang transparat, maka lakukan pewarnaan media menggunakan Congo Red seperti prosedur di atas.
- Selanjutnya lakukan pengukuran *Degradation Index* atau *Cellulolytic Index* dengan mengukur ratio diameter zona bening terhadap diameter (Lu et al. 2005)



Gambar 2. Penampakan zona bening yang dihasilkan dari hidrolisis enzim selulase yang dihasilkan oleh mikroba pada media CMC dengan pewarnaan Congo Red.

## Daftar Pustaka

- Beguín P, Gilkes NR, Kilburn DG, Miller RC, O'Neill GP, Warren RAJ. 1987. Cloning of cellulase genes. *Critical Reviews in Biotechnology*. Issue 2(6):129-162.
- Bisaria VS, Mishra S. 1989. Regulatory aspects of cellulase biosynthesis and secretion. *Critical Reviews in Biotechnology*. Issue 2(9):61-103.
- Coughlan MP. 1985. The Properties of fungal and bacterial cellulase with comment on their production and application. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*. 3:39-109.
- Enari TM. 1983. Microbial cellulases. *In Fogarty (Ed.)*. Microbial enzymes and biotechnology. Appl. Science Publisher. New York.:183-219.
- Ghosh A, Maity B, Cakrabarti K, Chattopadhyay D. 2007. Bacterial diversity of east Calcutta wet land area: possible identification of potential bacterial population for different biotechnological uses. *Microb Ecol* 54:452–459.
- Goksoyr J, Eriksen J. 1980. Cellulases. Rose (Ed.). *Microbial enzymes and bioconversion*. Acad. Press. London.: 283-320.
- Jondhale PS, Gaibhiye BR, Gourkhede PH. 2015. Influence of microbial decomposers on quality of compost using residue on major nutrient content. *National Academy of Agricultural Science (NAAS)*. 33 (4).
- Kanazawa S, Miyashita K. 1987. Cellulase activity in forest soils. *Soil. Sci. Plant Nutr.* 33 (3) : 399 - 406.
- Kusumawati N, Wardan AK, Zubaidah E, Sumarlan SH. 2020. Isolation, screening and identification of potential cellulolytic and xylanolytic mold from oil palm waste. *International Conference on Green Agro-industry and Bioeconomy*. IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science 475 (2020) 012083 doi:10.1088/1755-1315/475/1/012083.
- Lu WJ, Wang HT, Yang SJ, Wang ZC, Nie JF. 2005. Isolation and characterization of mesophilic cellulose-degrading bacteria from flower stalks-vegetable waste co composting system. *J Gen Appl Microbiol* 51:353–360.
- Preston, RD. 1986. Natural cellulose. *In Young dan Rowell (Eds.)*. Cellulose, Structure, Modification, and Hydrolysis. John Wiley and Sons. New York. Pp. 337-347.
- Peristiwati, Natamihardja YS, Herlini H. 2018. Isolation and identification of cellulolytic bacteria from termites gut (*Cryptotermes* sp.). 4th International Seminar of Mathematics, Science and Computer Science Education IOP Conf. Series: Journal of Physics: Conf. Series 410138012173 doi:10.1088/1742-6596/1013/1/012173 .
- Sazci AR, Erenle K. 1986. Detection of cellulolytic fungi by using Congo red as an indicator : a comparative study with the dinitrosalicylic acid reagent method. *Journal of Applied Bacteriology* 61, 559-562.
- Yoon JH, Lee JK, Jung SY, Kim JA, Kim HK, Oh TK. 2006. *Nocardioides kongjuensis* sp. nov., an N-acylhomoserine lactone-degrading bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* 56: 1783–1787.
- Yanelly TC, Alejandro PM, María SVM, Flor N, Rivera O, Wang ET. 2013. Diverse cellulolytic bacteria isolated from the high humus, alkaline-saline chinampa soils . *Ann. Microbiol.* 63:779–792 DOI 10.1007/s13213-012-0533-5

*In the field of observation, chance favors only prepared minds.*

L. Pasteur

## 2.11

# MIKROBA PENDEGRADASI POLUTAN

Rohani Cinta Badia Ginting, Erny Yuniarti

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 hidrolik, 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 antropogenik. 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 antropogenik. Senyawa-senyawa xenobiotik bersifat rekalsitran atau sulit mengalami biodegradasi seperti yang ditunjukkan oleh senyawa alamiah seperti lignin dan asam humat (Hickey 1998) dan beberapa komponen minyak bumi (Jain *et al.* 2005). Senyawa xenobiotik lingkungan termasuk hidrokarbon aromatik polisiklik (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAH), BTEX (*benzene, toluene, ethylbenzene* dan *xylene*), hidrokarbon minyak bumi, *polychlorinated biphenyls* (PCBs), pelarut berklor, *explosives*, pewarna, senyawa yang berkenaan dengan farmasi, produk perawatan, senyawa fenol dan pestisida (Dordia & Carvalho 2013).

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 memiliki sifat dapat didegradasi pada tingkat pertengahan tetapi perlu mendapat perhatian karena toksisitasnya dan kecenderungannya berakumulasi secara biologis (Jain *et al.* 2005). Senyawa PAH terdiri dari cincin aromatik yang menyatu dalam pengaturan linier, sudut, atau *cluster*. Secara umum, stabilitas elektrokimia, persistensi, ketahanan terhadap biodegradasi dan indeks karsinogenik PAH meningkat dengan meningkatnya jumlah cincin aromatik, angularitas (kekakuan) struktural, dan hidrofobitas, sedangkan volatilitas cenderung menurun dengan meningkatnya berat molekul. Persistensi PAH di lingkungan terjadi

karena hidrofobitasnya, kelarutan dalam air yang rendah dan kecenderungan yang kuat untuk terabsorpsi ke dalam matriks tanah. Semua faktor ini berkontribusi pada bioavailabilitas PAH yang rendah dan dengan demikian tingkat biodegradasi menjadi rendah (Shahsavari *et al.* 2019).

Mikroba merupakan pendaur ulang alamiah yang mampu mengubah senyawa organik toksik menjadi produk yang tak berbahaya, yang umumnya berbentuk CO<sub>2</sub> dan air (Jain *et al.* 2005). Beberapa mikroba pendegradasi hidrokarbon ditampilkan pada Tabel 1 (Kiyohara *et al.* 1982, Wrenn & Vennosa 1996, Supuka *et al.* 2001, Jain *et al.* 2005, Prenafeta-Boldú *et al.* 2019).

Degradasi PAH secara aerobik yang dilakukan bakteri awalnya oksidasi nukleus/cincin aromatik yang dikatalisis oleh enzim dioksigenase multikomponen (dioxygenase yang menghidroksilasi cincin/RHD) membentuk cis-dihydrodiol. Oksidasi cincin awal ini biasanya merupakan langkah pembatas laju biodegradasi PAH. Enzim cis-dihydrodiol dehydrogenase kemudian mengaromatik ulang cincin aromatik dari cis-dihydrodiol membentuk intermediet terhidroksilasi, oksidasi lebih lanjut dari intermediet mengarah pada pembentukan katekol. Langkah selanjutnya pembelahan cincin aromatik bergantung pada konformasinya. Jika gugus hidroksil dari intermediet yang terdehidroksilasi berada pada posisi orto (gugus berada pada posisi 1 dan 2 dari cincin aromatik), maka terjadi pemutusan oksigenolitik antara dua gugus hidroksil oleh dioksigenase yang membelah intradiol (orto) membentuk asam cis, cis-mukonat. Jika gugus hidroksil berada pada posisi meta (gugus berada pada posisi 1 dan 3), terjadi pembelahan berdekatan dengan gugus hidroksil yang dikatalisis oleh enzim dioxygenase yang membelah ekstradiol (meta) membentuk *2-hydroxymuconic semi-aldehyde*. Setelah cincin aromatik pertama dari molekul PAH terdegradasi (pada jalur katabolik atas degradasi PAH/pembelahan cincin), cincin kedua diserang dengan cara yang sama dan seterusnya. Degradasi melalui jalur degradasi atas menghasilkan produk asam suksinat, fumarat, piruvat dan asetat serta aldehida, dan produk sampingan dari reaksi ini adalah karbon dioksida dan air. Produk pembelahan digunakan oleh mikroorganisme untuk sintesis konstituen seluler dan energi. Degradasi anaerobik senyawa aromatik termasuk PAH terjadi pada kondisi sulfidogenik, metanogenik, dan kondisi yang mereduksi nitrat. Metabolisme PAH pada fungi sama seperti pada bakteri dimana pada tahap awal adalah introduksi oksigen atmosfer pada cincin aromatik. Fungi non-lignolitik menggunakan enzim monooksigenase sitokrom P-450. Enzim lainnya digunakan fungi lignolitik (Shahsavari *et al.* 2019). Fungi lignolitik memineralisasi PAH dengan kombinasi enzim ligninolitik, sitokrom P450 monooksigenase, dan epoksida hidrolase (Bezalel *et al.* 1997).

Dalam tulisan ini menjelaskan isolasi dan enumerasi mikroba pendegradasi polutan hidrokarbon polisiklik aromatik yang merupakan komponen minyak bumi. Selain itu dijelaskan juga isolasi mikroba pendegradasi pestisida, skrining dan uji aktivitasnya baik secara *in vitro* ataupun *in planta*.

Tabel 1. Berbagai mikroba pendegradasi polutan hidrokarbon (Sumber: Jain et al. 2005)

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. Species-spesies fungi: <i>Acremonium</i> , <i>Alternaria</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Aureobasidium</i> , <i>Botrytis</i> , <i>Candida</i> , <i>Cephalosporium</i> (=Acremonium), <i>Chaetomium</i> , <i>Chrysosporium</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Curvularia</i> , <i>Drechslera</i> , <i>Epicoccum</i> , <i>Geomyces</i> , <i>Geotrichum</i> , <i>Gliomastix</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Hansenula</i> , <i>Helminthosporium</i> (most probably = <i>Drechslera</i> ), <i>Humicola</i> , <i>Mucor</i> , <i>Paecilomyces</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Pestalotiopsis</i> , <i>Phialophora</i> , <i>Phoma</i> , <i>Phomopsis</i> , <i>Pseudallescheria</i> (=Scedosporium), <i>Rhinocladiella</i> , <i>Rhizopus</i> , <i>Rhodotorula</i> , <i>Saccharomyces</i> , <i>Sordaria</i> , <i>Stemphylium</i> , <i>Thielavia</i> , <i>Trichoderma</i> , <i>Trichosporon</i> , <i>Trichothecium</i> , <i>Tritirachium</i> , dan <i>Ulocladium</i>
Sikloalkana	<i>Pseudomonas citronellolis</i> , <i>Brevibacterium erythrogenes</i> , dan <i>Saccharomyces cerevisae</i>
Aromatik	<i>Pseudomonas</i> , <i>Ralstonia</i> , <i>Burkholderia</i> , <i>Sphingomonas</i> , <i>Flavobacterium</i> dan <i>Bacillus</i>

<p>PAH (hidrokarbon aromatik polisiklik)</p>	<p><b>Spesies bakteri</b> <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>, <i>Alcaligenes denitrificans</i>, <i>Mycobacterium sp.</i>, <i>Pseudomonas putida</i>, <i>P. fluorescens</i>, <i>P. versicularis</i>, <i>P. cepacia</i>, <i>P. paucimobilis</i>, <i>Rhodococcus sp.</i>, <i>Corynebacterium renale</i>, <i>Moraxella sp.</i>, <i>Bacillus cereus</i>, <i>Beijerinckia sp.</i>, <i>Micrococcus sp.</i>, dan <i>Sphingomonas sp</i></p> <p><b>Spesies aktinomisetes</b> <i>Gonlonia</i>, <i>Nocardia</i>, <i>Streptomyces</i></p> <p><b>Spesies fungi</b> <i>Phanerochaete sordida</i> <i>Aspergillus</i> <i>Cladosporium</i> <i>Cunninghamella</i> <i>Penicillium</i> <i>Plevrotzls</i> <i>Syncephalastrum</i></p> <p><b>Spesies Yeast</b> <i>Candida</i> <i>Rhodotorula</i> <i>Saccharomyces</i></p> <p><b>Yeasts</b> <i>Tomlopsis</i></p>
<p>Alifatik berunsur halogen (asam haloalkanoat, haloalkana, trikloroetana, dan etilena dibromida)</p>	<p><i>Pseudomonas</i>, <i>Alcaligenes</i></p>
<p>Aromatik berklor (asam benzoat, asam salisilat, asam fenoksiasetat, dan dibenzifurana, Pentaklorofenol (PCP))</p>	<p><i>Klebsiella pneumonia</i>, <i>Pseudomonas fluorescens</i>, <i>Pseudomonas mendocina</i>, <i>Pseudomonas cichhori</i> dan <i>Pseudomonas</i></p>

## 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 telah 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 ( $3 \text{ g L}^{-1}$ ) ditambahkan ke dalam masing-masing sumur/lubang kedua cawan. Dalam sumur/lubang positif, INT direduksi (oleh elektron yang dihasilkan pada oksidasi enzimatik senyawa PAH) 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.

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

#### Alat

- Inkubator dengan pengocok
- Pipet mikro (1 mL, 200  $\mu\text{L}$ ) dan tip
- Desikator vakum
- Sprayer

#### Bahan

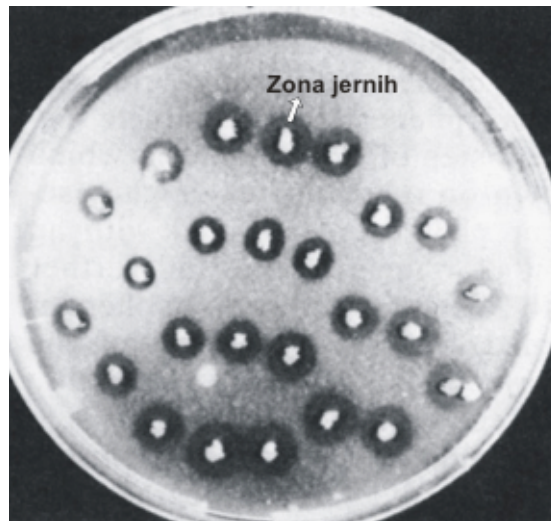
- Medium minimal bebas karbon (carbon free medium minima/, CFMM)
  - Larutkan secara berurutan 3,0 g  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ; 2,2 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 0,8 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,01 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,005 g  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 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  $121^\circ\text{C}$ , tekanan 0,1 MPa selama 20 menit. Dinginkan medium lalu tambahkan substrat PAH dengan konsentrasi akhir  $100 \text{ mg L}^{-1}$ .
- Larutan stok PAH (fenantrena, antrakena, fluorena, atau dibenzo-tiofena) sebagai sumber karbon dan energi.
  - Larutkan masing-masing PAH dengan dimetil sulfoksida (DMSO), lalu

sterilisasi menggunakan membran filter millipore 0.22  $\mu\text{m}$

- 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  $\mu\text{m}$

### 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  $10^3$  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).

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

#### Alat

- Inkubator dengan pengocok
- Pipet mikro (1 ml, 200  $\mu$ 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  $\mu$ 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

### 1. 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.

### 2. Pengenceran, inokulasi suspensi contoh, pengamatan

- Larutkan sebanyak 10 g contoh tanah dengan 90 mL larutan bufer natrium pirofosfat dan lakukan serial pengenceran sampai 10<sup>-10</sup>.
- Inokulasikan sebanyak 20 µL dari masing-masing pengenceran ke dalam sumur/lubang pada satu baris sebanyak delapan ulangan. Inokulasi pengenceran 10<sup>-10</sup> ke dalam baris 11, pengenceran 10<sup>-9</sup> 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<sup>-1</sup>) 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.

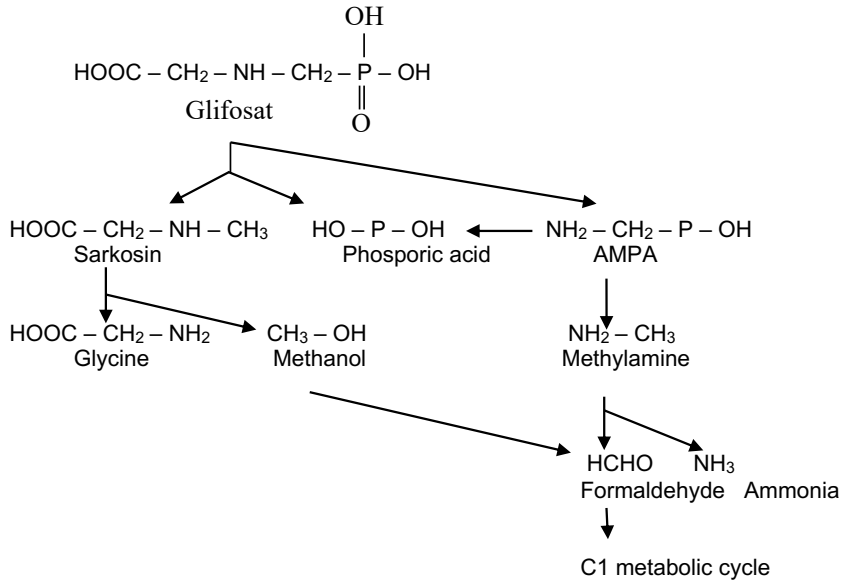
## Ulasan

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

## Mikroba Pendegradasi Residu Pestisida

Mikroba pendegradasi residu pestisida, baik dari kelompok bakteri maupun fungi, dapat diisolasi dari rizosfir dan atau endofit dari bagian tanaman yang tumbuh di lingkungan ekstrim terutama yang terkontaminasi residu pestisida. Mikroba tersebut biasanya diisolasi menggunakan metode kultur pengkayaan pada media minimal cair ataupun padat dan sebagai pengkayaannya adalah pestisida dengan konsentrasi yang rendah. Untuk mendapatkan mikroba yang mempunyai resistensi tinggi terhadap pestisida dapat dilakukan beberapa kali subkultur pada media cair yang sama dengan meningkatkan konsentrasi pengkaya yang digunakan sehingga mengeliminasi mikroba yang mempunyai resistensi rendah. Sementara untuk media padat, mikroba yang mempunyai resistensi tinggi dapat diisolasi dari media padat dengan penambahan pestisida dengan konsentrasi yang lebih tinggi. Selanjutnya, mikroba dipurifikasi pada media kaya seperti NA untuk bakteri dan PDA untuk fungi.

Bakteri mendegradasi polutan pestisida dengan cara memotong rantai struktur kimia bahan aktif pestisida pada ikatan yang mengandung C, P, atau N menggunakan enzim dan memanfaatkan unsur tersebut dalam metabolismenya. Sebagai contoh, bakteri mendegradasi senyawa glifosat dengan mekanisme biodegradasi seperti dalam Gambar 2. Unsur C dan P dimanfaatkan oleh bakteri dengan memotong rantai ikatan menggunakan enzim C-P lyase. Proses pemotongan rantai glifosat tersebut akan menghasilkan senyawa turunan yaitu sarkosin sebagai senyawa yang kehilangan unsur P dan *phosporic acid* sebagai senyawa yang kehilangan unsur C. Mekanisme lainnya adalah glifosat terdegradasi secara alami pada media kemudian terbentuk AMPA, senyawa tersebut oleh bakteri akan diambil unsur fosfatnya kemudian terbentuk senyawa turunan methylamine. Sarkosin, *phosporic acid*, dan AMPA merupakan senyawa turunan glifosat yang tidak bersifat toksik terhadap mikroba tanah dan tidak menjadi bahan yang berbahaya atau mencemari lingkungan.



Gambar 2. Mekanisme biodegradasi senyawa glifosat

### Isolasi mikroba dari rhizosfir menggunakan metode *enrichment culture* (Widowati & Ginting 2020)

#### Bahan

- Mineral salts medium (MSM) pH 7.0-7.2 disiapkan sebagai berikut ( $\text{g L}^{-1}$ ):  $0.2 \text{ MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $1.0 \text{ KH}_2\text{PO}_4$ ,  $1.0 \text{ K}_2\text{HPO}_4$ ,  $0.5 (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $0.01 \text{ CaCl}_2$ ,  $0.001 \text{ FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $0.5 \text{ NaNO}_3$ , dan pestisida dengan konsentrasi 2 kali dosis aplikasi di lapang.
- Contoh tanah rhizosfir dari berbagai situs terkontaminasi pestisida
- Pestisida komersial dengan berbagai jenis bahan aktif yang digunakan sebagai sumber C, disterilisasi menggunakan syringe membran filter  $0,2 \mu\text{m}$  (Carranza *et al.* 2017).

#### Prosedur

- Masukkan 10 g sampel tanah rhizosfir ke dalam tabung Erlenmeyer (250 mL) yang berisi 90 mL MSM yang disuplementasi dengan pestisida tertentu. Sebagai contoh menggunakan pestisida glifosat konsentrasi  $1 \text{ g L}^{-1}$ .
- Aduk sampel sampai homogen, kemudian diinkubasi goyang pada kecepatan 150 rpm, suhu  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , selama 72 jam dalam kondisi gelap.
- Subkulturkan 10 mL biakan ke dalam 90 mL media pengkaya yang sama,

inkubasi kembali dengan kondisi yang sama.

- Ulangi subkultur biakan sebanyak 5 kali dan inkubasi dengan kondisi sama.
- Lakukan pengenceran berseri, biakan hasil pengenceran  $10^{-3}$  sampai  $10^{-6}$  disebar pada media pengkaya yang sama.
- Murnikan setiap bakteri yang mempunyai karakteristik morfologi yang berbeda ke media Nutrient Agar.

### **Skринing mikroba toleran pestisida**

Uji ini dimaksudkan untuk memilih mikroba potensial yang mempunyai toleransi tinggi terhadap berbagai jenis pestisida. Isolat mikroba yang berhasil diisolasi ditumbuhkan dalam media MSM yang disuplementasi dengan pestisida dengan konsentrasi bertingkat sampai diperoleh konsentrasi pestisida tertinggi dimana mikroba masih dapat tumbuh. Untuk kelompok fungi, toleransinya bisa diukur secara kualitatif dengan membandingkan ukuran koloni fungi pada media seleksi dengan fungi yang tumbuh pada media kontrol.

#### **Prosedur**

- Remajakan semua isolat mikroba hasil isolasi pada media padat
- Inokulasikan pada media padat MSM yang disuplementasi masing-masing pestisida (kelompok herbisida, insektisida, dll) dengan konsentrasi bertingkat sampai diperoleh konsentrasi pestisida tertinggi dimana mikroba masih dapat tumbuh). Untuk bakteri dapat dilakukan dengan cara meneteskan kultur cair ( $10^8$  sel  $\text{mL}^{-1}$ ) bakteri pada media seleksi, inkubasi biakan pada suhu  $28 \pm 2$  °C selama 2 hari. Setiap perlakuan diulang tiga kali
- Pilih koloni yang bertahan tumbuh pada konsentrasi pestisida tertinggi.

### **Uji pemanfaatan pestisida sebagai sumber C, P, dan N**

Mikroorganisme yang berhasil diisolasi, dilanjutkan pengujiannya untuk melihat kemampuannya dalam mendegradasi pestisida melalui penggunaan pestisida sebagai sumber C, P dan N, disesuaikan dengan struktur kimia pestisida. Dalam pengujian ini biasanya menggunakan media selektif dimana hanya menggunakan pestisida sebagai satu-satunya sumber C, P, ataupun N (Moneke *et al.* 2010, Carranza *et al.* 2017, Benslama & Boulahrouf 2013, Anderson & Drew 1972). Media tersebut dalam bentuk cair ataupun padat, pengamatannya dibandingkan dengan kontrol.

#### **Bahan**

- Czapek Dox medium sebagai kontrol yang disiapkan sebagai berikut (g  $\text{L}^{-1}$  air suling: 30 sukrosa, 3  $\text{NaNO}_3$ , 1  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.25  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.5 KCl, 0.01  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 15 agar).

- Untuk pengujian pestisida sebagai sumber C: sukrosa sebagai sumber C diganti dengan pestisida konsentrasi final 10 mM .
- Untuk pengujian pestisida sebagai sumber P:  $K_2HPO_4$  sebagai sumber P diganti dengan glifosat konsentrasi final 1.0 mM.
- Untuk pengujian pestisida sebagai sumber N:  $NaNO_3$  sebagai sumber N diganti dengan glifosat konsentrasi final 1.5 mM.

#### **Prosedur (Carranza et al. 2017)**

- Remajakan isolat pendegradasi pestisida dalam media padat
- Inokulasi ke media MSM1, MSM2, dan CZN dengan cara digoreskan triplicate
- Gunakan media sama tanpa glifosat sebagai kontrol negatif.
- Inkubasi biakan pada suhu 30 °C selama 48–72 jam.

Catatan: Bila pengujian dilakukan dalam media cair, kerapatan optik dari perlakuan dibanding dengan kontrol.

### **Uji aktivitas biodegradasi**

Uji ini dapat dilakukan secara *in vitro* di laboratorium dan *in planta* di *growth room* atau rumah kaca untuk mengetahui kemampuan mikroba mendegradasi kontaminan pestisida baik sebagai isolat tunggal ataupun konsorsium. Mikroba terpilih dapat digunakan sebagai agen bioremediator polutan pestisida. Untuk mikroba konsorsium terlebih dahulu dilakukan uji kompatibilitas antarmikroba sehingga tidak saling menghambat satu dengan yang lain. Selain itu dilakukan juga uji patogenesitas mencakup uji hipersensitivitas pada daun tembakau dan uji hemolisis pada media *Blood Agar* sehingga mikroba yang diuji lanjut tidak bersifat patogen baik pada tanaman maupun hewan dan manusia.

#### **Uji aktivitas secara *in vitro* di laboratorium (Briceño et al. 2020)**

##### **Prosedur**

- Siapkan 100 mL LB cair yang disuplementasi dengan pestisida konsentrasi tertentu pada tabung Erlenmeyer 250 mL.
- Inokulasi dengan 1% (v/v) mikroba yang diuji.
- Sebagai kontrol biotik adalah tabung Erlenmeyer berisi media sama tanpa pestisida dan kontrol abiotik adalah tabung Erlenmeyer tanpa inokulasi mikroba.
- Biakan diinkubasi pada suhu  $28\pm 2^\circ C$ , 130 rpm selama 48 jam (waktu inkubasi disesuaikan dengan siklus pertumbuhan mikroba berdasarkan kurva tumbuh).
- Sampel diambil beberapa kali terutama pada fase lag, eksponensial, dan

stationer untuk analisis biomas mikroba, konsentrasi pestisida, dan metabolit pestisida menggunakan *high-performance liquid chromatography* (HPLC).

- Semua perlakuan dilakukan pengulangan 3 kali.

### **Uji aktivitas secara *in planta* di *growth room***

Benih jagung atau biji lainnya dapat digunakan untuk mengukur parameter perkecambahan. Pilih tanaman yang rentan terhadap paparan polutan.

#### **Prosedur**

- Persiapan benih jagung dimulai sterilisasi permukaan (*surface sterilization*) dengan merendam benih jagung dalam alkohol 70% selama 3 menit, dibilas dengan akuades steril sebanyak 5–7 kali. Untuk mempercepat perkecambahan, rendam benih dalam akuades steril selama 4–5 jam, bilas kembali dengan akuades steril sebanyak 3 kali dan susun di atas cawan petri yang telah dilapisi dengan kertas saring dan telah dilembabkan dengan akuades steril. Biji disusun tidak boleh terlalu rapat agar jagung dapat berkecambah secara optimal. Selanjutnya, inkubasi benih jagung di ruang gelap pada suhu ruang selama 3 hari.
- Persiapan inokulan mikroba yang akan diuji dilakukan dengan cara menumbuhkannya dalam media cair.
- Masukkan perlakuan mikroba dan pestisida ke dalam *plant pouches*. Aplikasi inokulan mikroba dapat dilakukan melalui *seed treatment* atau diinokulasi ke dalam *pouches plant*.
- Pilih benih jagung steril dengan keragaan yang seragam, dalam keadaan aseptis, pindahkan ke *plant pouches* satu benih/lubang.
- Untuk perlakuan kontrol, pelaksanaannya sama kecuali inokulan mikroba dan pestisida diganti dengan akuades steril dengan volume yang sama. Benih jagung dalam *plant pouches* diinkubasi di *growth room* selama 7-14 hari pada suhu antara 27–30°C dan kelembaban antara 60–70%, serta dengan pencahayaan 12 jam bercahaya dan 12 jam gelap.
- Semua perlakuan dilakukan pengulangan 3 kali.
- Amati panjang radikula dan plumula, serta biomassa kecambah dan bandingkan dengan perlakuan kontrol.

### **Daftar Pustaka**

- Anderson JR, Drew EA. 1972. Growth characteristics of a species of *Lypomyces* and its degradation of paraquat. *J. Gen. Microbiol.* 70: 43-58.
- Benslama O, Boulahrouf A. 2013. Isolation and characterization of glyphosate-degrading bacteria from different soils of Algeria. *Afr. J. Microbiol. Res.* 7(49): 5587-5595.

- Bezalel L, Hadar Y, Fu PP, Freeman JP, Cerniglia CE. 1996. Initial oxidation products in the metabolism of pyrene, anthracene, fluorene, and dibenzothiophene by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2554-2559.
- Briceño G, Lamilla C, Leiva B, Levio M, Donoso-Piñol P, Schalchli H, Gallardo F, Diez MC. 2020. Pesticide-tolerant bacteria isolated from a biopurification system to remove commonly used pesticides to protect water resources. *PLoS ONE* 15(6): e0234865.
- Carranza CS, Barberis CL, Chiacchiera SM, Magnoli CE. 2017. Assessment of growth of *Aspergillus* spp. from agricultural soils in the presence of glyphosate. *Rev. Argent. Microbiol.* 49(4): 384-393.
- Dordio AV, Carvalho AJP. 2013. Organic xenobiotics removal in constructed wetlands, with emphasis on the importance of the support matrix. *J. Hazard. Mater.* 252-253: 272-292.
- Hickey WJ. 1998. Biochemistry and metabolism of Xenobiotic Chemicals. p. 447-468. In Sylvia DM, Furhmann JJ, Hartel PG, Zuberer DA. (Eds.) *Principles and Application of Soil Microbiology*. Prentice Hall. New Jersey.
- Jain RK, Kapur M, Labana S, Lal B, Sarma PM, Bhattacharya D, Thakur S. 2005. Microbial diversity: Application of microorganism for biodegradation of xenobiotics. *Curr. Sci.* 89: 101-112.
- Kiyohara H, Nagao K, Yana K. 1982. Rapid screen for bacteria degrading water insoluble, solid hydrocarbons on agar plates. *Appl. Environ. Microbiol.* 43: 454-457.
- Moneke A, Anyanwu C, Okpala G. 2010. Biodegradation of glyphosate herbicide *in vitro* using bacterial isolates from four rice fields. *Afr. J. Biotechnol.* 9(26): 4067-4074.
- Prenafeta-Boldú FX, de Hoog GS, Summerbell RC. 2019. Fungal communities in hydrocarbon degradation. In McGenity T. (Eds) *Microbial Communities Utilizing Hydrocarbons and Lipids: Members, Metagenomics and Ecophysiology. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-14785-3\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-030-14785-3_8).
- Shahsavari E, Schwarz A, Aburto-Medina A, Ball AS. 2019. Biological degradation of polycyclic aromatic compounds (PAHs) in soil: a current perspective. *Curr. Pollut. Rep.* 5:84-92.
- Supuka N, Pinphanichakarna P, Pattaragulwanita K, Thaniyavarna S, Omorib T, Juntongjina K. 2001. Isolation and characterization of a fenantrene-degrading *Sphingomonas* sp. strain P2 and its ability to degrade Fluoranthene and pyrene via cometabolism. *Sci. Asia* 27: 21-28.
- Widowati T, Ginting RCB. 2020. Isolation and identification of bacterium resistant to glyphosate and paraquat herbicide from rice fields. *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.*, 439(1): 012010.
- Wrenn BA, Vennosa AD. 1996. Selective enumeration of aromatic and aliphatic hydrocarbon degrading bacteria by a most-probable-number procedure. *Can. J. Microbiol.* 42: 252-258.

# 2.12

## MIKROBA PENGAKUMULASI LOGAM BERAT

Rohani Cinta Badia Ginting, Jati Purwani, Erny Yuniarti,  
Surono, Rasti Saraswati

Penggunaan pestisida dan 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 (Nies 1999, Seiler & Berendonk 2012).

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, dan 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 pengkhelat 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 dan 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, dan Zn (Gadd & White 1993, Dave 1994). *Pseudomonas*, *Thiobacillus*, *Bacillus*, dan bakteri penambat N<sub>2</sub> 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.

Gen yang menyandikan resistensi dan detoksifikasi logam berat pada mikroba dari kelompok bakteri telah banyak diteliti. Bakteri memiliki gen resistensi spesifik terhadap logam berat dan setiap bakteri memiliki gen resistensi yang berbeda (Tabel

Tabel 1. Beberapa gen yang menyandikan resistensi dan detoksifikasi logam berat pada bakteri

Logam	Operon	Gen	Fungsi	Pustaka
As	Operon ars	<i>arsRDABC</i>	Mekanisme detoksifikasi dengan mengkonversi konsentrasi arsenat intraseluler ( $As^{5+}$ menjadi arsenit $As^{3+}$ )	Dey & Rosen 1995, Chen et al. 1986
Hg	Operon mer	<i>merRT-PECAGBD</i>	Mekanisme detoksifikasi dengan mengubah bentuk Hg anorganik dan organik reaktif menjadi bentuk Hg yang relatif tidak berbahaya, mudah menguap, dan monoatomik.	Priyadarshaneet et al. 2022
Cd	Operon cad	<i>cadCA</i> dan <i>cadB/DX</i>	Mekanisme resistensi cadmium, kobalt-seng-kadmium, dan domain terkait logam berat.	Rehan et al. 2022
Cu	Operon pco	<i>pcoABCDRSE</i>	Resistensi tembaga	Brown et al. 1995, Lee et al. 1990
Cr	Operon chr	<i>chrIBAEFC</i>	Mekanisme resistensi dan detoksifikasi senyawa yang mengandung kromium	Sharma & Shukla 2020
Cu	scs	<i>scsABCD</i>	Mekanisme detoksifikasi tembaga	Fu et al. 2014, Hatahet et al. 2014
Co-Zn-Cd	czc	<i>czcRDB</i>	Mekanisme resistensi kobalt-seng-kadmium	Nies 1999
Ni-Co-Cd	ncc	<i>nccYXHBAN</i>	Resistensi nikel-kobalt-kadmium	Schmidt & Schlegel 1994

1). Bakteri ada yang resisten terhadap satu logam berat dan ada yang resisten lebih dari satu logam berat. Sebagai contoh bakteri yang hanya memiliki gen *merA* mempunyai resistensi terhadap merkuri dengan spektrum yang sempit, sementara bakteri yang memiliki gen *merA* dan *merB* memiliki resistensi dengan spektrum yang luas.

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

## Isolasi Mikroba Pengakumulasi Logam Berat

Sumber mikroba potensial biasanya diambil dari situs terkontaminasi dan ekstrim seperti tailing tambang emas dan batubara, kolam penampungan limbah industri, lahan pertanian yang menggunakan pestisida dan pupuk kimia intensif, dll. Larutan stok logam berat disiapkan dengan membuat larutan konsentrat yang dilarutkan dalam air deionisasi dan disterilisasi dengan melewati larutan melalui saringan membran ukuran 0.22  $\mu\text{m}$  (Millipore) dalam kondisi aseptik. Stok logam berat kemudian disimpan dalam keadaan gelap pada suhu 4°C. Stok logam berat ini kemudian dicampur dengan media seleksi steril hangat sehingga tidak merusak logam berat dan konsentrasinya disesuaikan dengan yang dibutuhkan.

### (1) Isolasi dan Seleksi Mikroba Pengakumulasi Logam Berat (Pumpel *et al.* 1995)

#### 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  $\text{H}_2\text{S}$  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.

#### 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  $\mu\text{m}$
- $\text{H}_2\text{S}$
- Media PEG (pepton glukosa – ekstrak ragi)
  - Larutkan 4 g pepton, 2 g glukosa, 1 g ekstrak ragi, dan 15 g Bacto 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  $\text{AgNO}_3$  1.000 ppm
- Larutan stok  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  1.000 ppm
- Larutan stok  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$  1.000 ppm
- Larutan stok  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  1.000 ppm
- Larutan stok  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.000 ppm
- Larutan stok  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.000 ppm
- Larutan stok  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.000 ppm
- Larutan stok  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$  1.000 ppm

## Prosedur

- Encerkan 10 g contoh tanah dengan larutan glukosa 0,1% lalu inkubasi pada inkubator goyang selama  $\pm 2$  jam, kemudian lakukan seri pengenceran hingga 1.000 kali.
- Inokulasi masing-masing hasil pengenceran sebanyak 100  $\mu\text{L}$  ke dalam medium agar cawan pepton glukosa – ekstrak ragi (PGE) dengan metode cawan sebar lalu inkubasi pada suhu 30°C, Rh 60% di ruang 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 ( $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ) dan Cd ( $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ ) pada permukaan medium PGE yang telah ditumbuhi MPLB.
- Kemudian inkubasi biakan agar cawan yang telah dilapisi media NA yang mengandung logam Pb atau Cd selama 2-3 hari.
- Beri koloni mikroba (bakteri, khamir) yang tumbuh dengan gas  $\text{H}_2\text{S}$  dalam desikator selama 10 menit. Bakteri yang mampu mengakumulasi logam berat ditunjukkan dengan ciri-ciri koloni berwarna 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.

## (2) Isolasi Mikroba Pengakumulasi Logam Berat Menggunakan Metode Pengkayaan (Li *et al.* 2021)

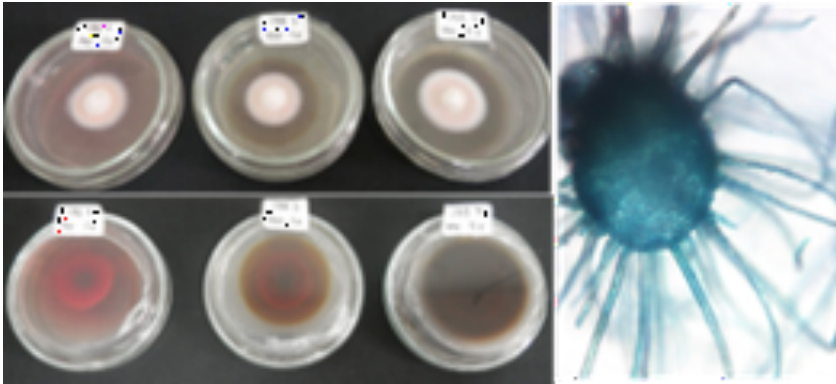
Berbagai media seleksi yang diperkaya dengan logam berat dapat digunakan untuk mengisolasi mikroba antara lain:

- Medium minimal (Albarracin *et al.* 2005) ( $\text{g L}^{-1}$ ): 0,5 L-asparagine, 0,5  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,2  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,01  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 10,0 glukosa yang disuplementasi logam berat. Sebagai contoh 16  $\text{mgL}^{-1}$   $\text{CuSO}_4$  (pH 7) (Ravel *et al.* 1998).
- Luria-Bertani (Huang *et al.* 2021): 1% *Tryptone*, 0,5% *Yeast extract*, 1% NaCl, pH 7.2.
- Marine agar (He *et al.* 2022) ( $\text{g L}^{-1}$ ): 1,0 *yeast extract*, 0.1  $\text{C}_6\text{H}_5\text{FeO}_7$ , 19,45 NaCl, 8,8  $\text{MgCl}_2$ , 3,24  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 1,8  $\text{CaCl}_2$ , 0,55 KCl, 0,16  $\text{NaHCO}_3$ , 0,08 KBr, 34.0  $\text{SrCl}_2$ , 22.0  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 4.0  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$ , 2.4 NaF, 1.6  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 8.0  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ .
- Potato dextrose broth untuk isolasi fungi ( $\text{g L}^{-1}$ ): rebusan dari 6 g kentang, 20,0 gula .

Untuk mengisolasi bakteri, ke dalam media ditambah dengan 10.0  $\text{mg mL}^{-1}$  *cycloheximide* untuk menghambat pertumbuhan fungi atau *nalidixic acid* untuk menghambat pertumbuhan bakteri. Media isolasi kemudian diperkaya dengan logam berat dapat berupa logam berat tunggal ataupun campuran beberapa logam berat dengan konsentrasi yang rendah, sebagai contoh ( $\text{mg L}^{-1}$ ) 10  $\text{Cd}^{2+}$ , 500  $\text{Cr}^{3+}$ , 1000  $\text{Zn}^{2+}$ , 500  $\text{Ni}^{2+}$ , dan 500  $\text{Cu}^{2+}$ .

### Prosedur

- Inokulasi 10 g contoh tanah yang terkontaminasi ke dalam labu Erlenmeyer yang berisi 100 mL media LB yang dikontaminasi dengan logam berat. Sebagai contoh logam 10  $\text{mg L}^{-1}$   $\text{Cd}^{2+}$ , lalu inkubasi pada inkubator goyang selama 7 hari dengan kecepatan 160 rpm.
- Lakukan subkultur sebanyak 3 siklus dengan cara menginokulasi 10% (v/v) biakan pada media yang baru dengan kondisi yang sama, dan inkubasi dengan kondisi yang sama.
- Lakukan serial pengenceran dan inokulasi pada media LB padat, inkubasi selama 2-5 hari.
- Purifikasi setiap kultur mikroba yang mempunyai karakteristik morfologi yang berbeda pada media padat tanpa penambahan logam berat.



Gambar 1. Skrining resistensi fungi terhadap logam Cu

### Seleksi Mikroba Pengakumulasi Logam Berat

Seleksi isolat dilakukan untuk mendapatkan mikroba yang mempunyai konsentrasi hambat minimum (minimum inhibitory concentration = MIC) tertinggi terhadap logam berat yang diamati. Konsentrasi hambat minimum didefinisikan sebagai konsentrasi terendah dari logam yang menghambat pertumbuhan setelah inkubasi 10 hari pada suhu kamar dalam gelap. Pelaksanaan skrining biasanya dilakukan pada media yang sama dengan media isolasi. Skrining pada media padat dilakukan dengan cara menumbuhkan isolat mikroba pada media yang ditambah dengan berbagai logam berat dengan konsentrasi yang bertingkat sampai diperoleh dimana pada konsentrasi tersebut mikroba yang diuji tidak tumbuh. Sebagai pembandingan (kontrol), isolat mikroba ditumbuhkan dalam media yang sama tanpa penambahan logam berat. Setiap perlakuan dilakukan ulangan 3 kali. Isolat mikroba yang mempunyai nilai konsentrasi hambat minimum tertinggi dipilih sebagai mikroba potensial.

#### Prosedur

- Siapkan media yang ditambah dengan logam berat dengan konsentrasi bertingkat.
- Siapkan kultur mikroba yang akan diuji.
- Untuk bakteri, teteskan atau goreskan kultur cair ke dalam media, sementara untuk fungi potong kultur fungi bagian tepi dan pindahkan ke dalam media secara aseptik.
- Inkubasi biakan selama 10 hari dalam keadaan gelap pada suhu ruang.
- Amati pertumbuhan mikroba dan lakukan sampai diperoleh dimana pada konsentrasi tersebut tidak ada lagi pertumbuhan.

## Uji Kemampuan Akumulasi Logam Berat

### Prosedur

- Inokulasi mikroba ( $10^9$  sel  $\text{mL}^{-1}$ ) 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 sentrifugasi pada kecepatan 5.000 rpm selama 10 menit pada suhu  $4^\circ\text{C}$ .
- 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.
- Bioakumulasi logam berat dihitung dengan formula:

Bioakumulasi logam berat (%) =  $(L_0 - L_1) \times 100\% / L_0$

$L_0$  = Konsentrasi awal logam berat

$L_1$  = Konsentrasi akhir logam dalam media biakan

### Daftar Pustaka

- Albarracin VH, Amoroso MJ, Abatea CM. 2005. Isolation and characterization of indigenous copper-resistant actinomycete strains. *Chemie der Erde* 65 S1: 145-156.
- Brown NL, Barrett SR, Camakaris J, Lee BT, Rouch DA. 1995. Molecular genetics and transport analysis of the copper-resistance determinant (pco) from *Escherichia coli* plasmid pR 51004. *Mol. Microbiol.* 17: 1153-1166.
- Chen C-M, Misra TK, Silver S, Rosen BP. 1986. Nucleotide sequence of the structural genes for an anion pump. The plasmid-encoded arsenical resistance operon. *J. Biol. Chem.* 261(32): 15030-15038.
- Dave SR. 1994. Biosorption of heavy metal. *Proch. Acad. Environ. Biol.* 3(1): 21-24.
- Dey S, Rosen BP. 1995. Dual mode of energy coupling by the oxyanion-translocating ArsB protein. *J. Bacteriol.* 177: 385-389
- Fu Y, Chang FM, Giedroc DP. 2014. Copper transport and trafficking at the host-bacterial pathogen interface. *Acc. Chem. Res.* 47:3605-3613.
- Gadd GM. 1990. Metal tolerance. p 178-210. *In* C. Edward (*Ed.*). *Microbiology of extreme environments*. McGraw-Hill. New York.
- Gadd GM, White C. 1993. Microbial treatment of metal pollution-working biotechnology. *Trends Biotechnol.* 3 (2): 353-359.
- Hatahet F, Boyd D, Beckwith J. 2014. Disulfide bond formation in prokaryotes: history, diversity and design. *Biochim. Biophys. Acta.* 1844:1402-1414.
- He M, Xu Y, Qiao Y, Zhang Z, Liang J, Peng Y, Liao J, Qiao Y, Shang C, Guo Z, Chen S. 2022. A novel yeast strain *Geotrichum* sp. CS-67 capable of accumulating heavy

- metal ions. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 236 (2022) 113497.
- Huang J, Liu C, Price GW, Li Y, Wang Y. 2021. Identification of a novel heavy metal resistant *Ralstonia* strain and its growth response to cadmium exposure. *J. Hazard. Mater.* 416 (2021) 125942.
- Lee BTO, Brown NL, Rogers S, Bergemann A, Camakaris J, Rouch DA. 1990. Bacterial response to copper in the environment: copper resistance in *Escherichia coli* as a model system. p. 625-632. In Broekaert JAC, GuGer S, Adams F. (Eds). *Metal Speciation in the Environment*. Berlin: Springer-Verlag.
- Li L, Shang X, Sun X, Xiao X, Xue J, Gao Y, Gao H. 2021. Bioremediation potential of hexavalent chromium by a novel bacterium *Stenotrophomonas acidaminiphila*. *Environ. Technol. Innov.* 22 (2021) 101409.
- Mullen MD, Wolf DC, Ferris FG, Beveridge TJ, Fleming CA, Bailey GW. 1989. Bacterial sorption of heavy metal. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 3143-3149.
- Nies DH. 1999. Microbial heavy-metal resistance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51(6): 730–750.
- Nies DH. 1992. CzcR and CzcD, gene products affecting regulation of resistance to cobalt, zinc, and cadmium (czc system) in *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* 174(24):8102-8110.
- Priyadarshane M, Chatterjee S, Rath S, Dash HR, Das S. 2022. Cellular and genetic mechanism of bacterial mercury resistance and their role in biogeochemistry and bioremediation. *J. Hazard Mater.* 423 (2022) 126985.
- Pümpel T, Pernfuß B, Pigher B, Diels L, Schiner F. 1995. A rapid screening method for the isolation of metal-accumulating microorganisms. *Ind. Microbiol J.* 14: 213-217.
- Rehan M, Alhusays A, Serag AM, Boubakri H, Pujic P, Normand P. 2022. The possible two operons cadCA and cadB/DX are induced in cadmium resistance mechanism by *Frankia alni* ACN14a. *Electron. J. Biotechnol.* doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2022.09.006>
- Schmidt T, Schlegel HG. 1994. Combined nickel-cobalt-cadmium resistance encoded by the ncc locus of *Alcaligenes xylosoxidans* 31A. *J. Bacteriol.* 176(22): 7045-7054.
- Seiler C, Berendonk TU. 2012. Heavy metal driven co-selection of antibiotic resistance in soil and water bodies impacted by agriculture and aquaculture. *Front. Microbiol.* 3:399, p10.
- Sharma B, Shukla P. 2021. Lead bioaccumulation mediated by *Bacillus cereus* BPS-9 from an industrial waste contaminated site encoding heavy metal resistant genes and their transporters. *J. Hazard. Mater.* 401(2021): 123285.
- Spain A. 2003. Implications of microbial heavy metal tolerance in the environment. *Rev. in Undergrad. Res.* 2: 1-6.

## 2.13

## MIKROBA PENGHASIL FITOHORMON

*Erny Yuniarti, Jati Purwani*

Fitohormon merupakan molekul pembawa pesan yang dihasilkan pada konsentrasi yang sangat rendah yang berfungsi dalam pengaturan berbagai proses pertumbuhan dan perkembangan tanaman serta pemacuan jalur transduksi sinyal atau pensinyalan sel yang beragam sebagai respons terhadap tekanan abiotik (Spaepen 2015; Saini *et al.* 2021). Lima kelompok fitohormon yang dikenal lebih awal adalah auksin, giberelin, etilen, sitokinin, dan asam absisat. Fitohormon lain yang ditemukan kemudian, yaitu strigolakton, asam salisilat, jasmonat dan brassinosteroid, poliamina, dan oksida nitrat (Spaepen 2015, Pirog *et al.* 2017). Asam absisat, asam salisilat, jasmonat, dan etilen memainkan peran penting dalam mengendalikan respons pertahanan tanaman terhadap patogen dan cekaman abiotik. Fitohormon ini bekerja secara harmonis satu sama lain, merespons sinyal perkembangan tanaman dan lingkungan melalui aktivitas sinergis dan antagonis yang dikenal sebagai *signaling cross talk* (Egamberdieva *et al.* 2017).

Fitohormon adalah metabolit sekunder yang dihasilkan alga, bakteri dan fungi yang berasosiasi dengan tanaman (Wang *et al.* 2015, Egamberdieva *et al.* 2017). Hasil tinjauan Egamberdieva *et al.* 2017 menjelaskan mekanisme toleransi stres pada tanaman yang diperantarai fitohormon yang dihasilkan mikroba. Beberapa mikroba yang menghuni perakaran menghasilkan sitokinin (CK), giberelin (GA), asam indole-3-asetat (AIA), asam salisilat (SA) dan asam absisat (ABA), yang membantu tanaman mengatasi stres dengan meningkatkan potensi antioksidannya melalui up-regulasi (meningkatkan jumlah komponen selular) sistem antioksidan dan dengan akumulasi osmolit kompatibel sehingga mengurangi kerusakan sel dan jaringan tanaman akibat stres oksidatif; meningkatkan kapasitas fotosintesis dan stabilitas membran; mempromosikan pembelahan sel dan regulasi stomata; merangsang pertumbuhan sistem akar, dan perolehan air dan nutrisi.

AIA merupakan auksin alami yang paling umum, yang dihasilkan oleh tanaman, jamur dan bakteri. AIA memiliki peran sentral dalam memodulasi pertumbuhan dan perkembangan tanaman. AIA yang dihasilkan oleh beberapa bakteri non patogen yang menghuni rhizosfer, bertindak sebagai molekul sinyal pada komunikasi antara tanaman dan mikroorganisme dan mendorong pertumbuhan tanaman. Triptofan (Trp) merupakan prekursor utama untuk biosintesis AIA, biosintesis AIA bergantung prekursor triptofan pada mikroba. Terdapat lima jalur pada bakteri, yaitu *indole-3-acetamide* (IAM), *indole-3-pyruvic acid* (IPyA), *indole-3-acetonitrile* (IAN), *triptamin* (TAM), dan jalur oksidase rantai samping triptofan (TSO). Meskipun diperkirakan terdapat jalur

tidak bergantung prekursor AIA pada bakteri, tidak ada enzim spesifik dalam jalur ini yang telah dikarakterisasi (Li *et al.* 2018).

Giberelin (GA) adalah fitohormon diterpenoid turunan ent-kaurene yang dihasilkan oleh tanaman, fungi, dan bakteri. Pada tanaman inang yang diinokulasi *Rhizobium meliloti* ditemukan GA1, GA4, GA9 dan GA20 sedangkan pada kultur tanaman inang yang diinokulasi *A. lipoferum* dijumpai GA1, GA3, GA9, GA19 dan pada tanaman inang yang diinokulasi *A. brasilense* terdeteksi GA20 dan GA1 dan GA3 (Morrone *et al.* 2009).

Pada fungi, GA disintesis dari asetil-KoA melalui jalur asam mevalonik (jalur MVA) dan unit isoprenoid, isopentenil difosfat (IPP). Dimulai dengan jalur biosintesis terpenoid, biosintesis GA bercabang pada tahap *farnesyl diphosphate* (FDP). Produksi senyawa intermediet berikutnya, *geranylgeranyl diphosphate* (GGDP) dikatalisis oleh dua sintase GGDP yang berbeda; GGS1 dan GGS2. GGDP untuk biosintesis GA disintesis oleh sintase GGDP spesifik jalur GA, GGS2. Langkah-langkah jalur awal dari GGDP (*geranylgeranyl diphosphate*) hingga pembentukan GA12-aldehida pada tumbuhan tingkat tinggi dan *Fusarium fujikuroi* adalah sama. *Ent-kaurene* intermediet pertama disintesis dari GGDP dalam reaksi pembentukan cincin dua tahap melalui *ent-copalyl diphosphate* (CPP) dan selanjutnya diubah oleh oksidasi berurutan menjadi *ent-kaurenoic acid* (KA) (ent-kaurene oksidase/P450-4 PhKO), diikuti oleh hidroksilasi pada C-7 $\beta$  untuk menghasilkan ent-7 $\alpha$ -asam hidroksikaurenoat dengan bantuan enzim GA14 sintase), dan akhirnya oksidasi pada C-6  $\beta$  (ent-asam kaurenoat oksidase/P450-1, PhKAO) menghasilkan kontraksi cincin  $\beta$ . Selanjutnya, GA12-aldehida dihidroksilasi pada C-3 $\beta$  menjadi GA14-aldehida, yang kemudian dioksidasi pada C-7 membentuk GA14. Selanjutnya GA14 dioksidasi pada C-20 oleh enzim 20-oksidase menghasilkan GA4 yang analog dengan pembentukan GA9 dan GA20 pada tumbuhan tingkat tinggi. Desaturasi GA4 pada C-1,2 menghasilkan GA7, yang diubah menjadi produk utama (pada *F. fujikuroi*), GA3, melalui reaksi hidroksilasi pada C-13 (13-hidroksilasi). GA1 dibentuk sebagai produk minor pada hidroksilasi GA4 dan tidak diubah menjadi GA3 (Bömke & Tudzynski 2009).

Dalam tulisan ini menjelaskan metode analisis AIA dan GA 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 dan GA secara kuantitatif menggunakan metode kolorimetri dan HPLC (*high-pressure liquid chromatography*).

## Prinsip

AIA 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 dan 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.

### **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  $\mu\text{m}$ )
- Membran nitroselulosa
- Larutan pengencer
  - Masukkan 9 mL akuades ke dalam botol pengencer, lalu disterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit.
- Pereaksi Gordon & Weber (1951)
  - Larutkan 8,12 g  $\text{FeCl}_3$  dengan air deionisasi dalam labu takar 100 mL dan cukupkan volume sampai 100 ml. Campurkan 1 mL larutan  $\text{FeCl}_3$  dengan 50 ml  $\text{HClO}_4$  35% dalam botol gelap.

#### **Prosedur**

- Inokulasi media agar cawan yang mengandung 5 mM L-triptofan dengan kultur mikroba lalu segera lapiasi dengan membran nitroselulosa.
- Inkubasi media yang telah diinokulasi dan dilapiasi 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 dan Weber atau pindahkan membran ke filter paper yang telah dijenuhi dengan reagen Gordon dan Weber dan biarkan pada suhu ruang hingga tampak halo berwarna merah yang berbeda seputar koloni pada membran nitroselulosa. Reaksi pembentukan warna terhadap AIA terbatas pada daerah yang dekat sekitar 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 mm<sup>2</sup> spot.
- Prosedur ini dapat digunakan untuk enumerasi populasi bakteri penghasil AIA. Encerkan 1 g (tanah atau tanaman) sampai 10<sup>-6</sup> lalu inokulasikan dengan metode cawan sebar sebanyak 0,1 mL dari masing-masing pengenceran pada

- media agar cawan yang mengandungi 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 lapi dengan membran nitroselulosa. Selanjutnya, lakukan prosedur seperti di atas untuk menentukan koloni penghasil AIA.

### **Asai Kemampuan Mikroba Menghasilkan AIA secara Kuantitatif dengan Spektrofotometer (Patten & Glick 2002)**

#### **Alat**

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

#### **Bahan**

- Pereaksi Gordon dan Weber (1951)
  - Lihat uraian di atas
- Larutan stok AIA
  - Larutkan 0,01 g AIA dengan 50 akuades dalam gelas piala menggunakan magnet pengocok lalu cukupkan volume menjadi 100 mL.
- DF medium (5.0 g *peptone*, 1.5 g *yeast extract*, 1.5 g *beef extract*, 5.0 g NaCl, 0.5 g tryptophan, per liter).

#### **Prosedur**

- Sentrifus 20 mL kultur pada kecepatan 12.000 rpm pada suhu 4°C selama 10 menit lalu saring supernatan dengan membran filter 0,45 µm.
- Pipet 1 mL filtrat ke dalam tabung reaksi bersih lalu tambah dengan 2 ml pereaksi Gordon & Weber. Sebagai kontrol, campurkan 1 mL filtrat dengan 2 mL pereaksi Gordon & Weber. Kocok lalu inkubasi campuran filtrat dan pereaksi selama 25 menit, kemudian ukur absorbansinya pada  $\lambda = 530$  nm.

#### **Standar kalibrasi**

- Buat larutan standar AIA dengan konsentrasi 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

dan Weber. Sebagai blanko, tambahkan 1 mL akuades dengan 2 mL pereaksi Gordon dan 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.

## Asai Kemampuan Mikroba Menghasilkan AIA secara Kuantitatif dengan HPLC Detektor UV/Vis (Jimtha *et al.* 2014)

### Alat

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

### Bahan

- Membran filter 0,45  $\mu\text{m}$
- 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  $\mu\text{m}$ .
- Sesuaikan pH filtrat menjadi pH 2,8 dengan HCl 1,0 N, untuk memprotonasi dan meningkatkan lipofilisitas gugus karboksil.
- Ekstraksi larutan filtrat 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 dalam HPLC, saring ekstrak dalam metanol dengan filter membran berukuran 0,45  $\mu\text{m}$ . HPLC (*Shimadzu Liquid Chromatograph* LC-3A dengan *Detector UV/Vis*) pada panjang gelombang 254 nm. Kromatogram HPLC dihasilkan melalui injeksi 10  $\mu\text{L}$  ekstrak yang telah disaring ke dalam 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  $\text{menit}^{-1}$ .
- Larutan C (larutan stok untuk fase gerak)

## **Asai Giberelin (GA) mikroba dengan Spektrofotometer (Vikram *et al.* 2007)**

### **Alat**

- Spektrofotometer
- Sentrifus

### **Bahan**

- *Nutrient Broth* (NB)
- HCl 4 N
- Etil Asetat
- $\text{NaHCO}_3$
- *Czapek-Dox Broth*
- Standar GA3

### **Prosedur**

- Kultur bakteri dalam NB berumur 48 jam disentrifus pada 10.000 rpm selama 10-15 menit. pH supernatan diatur menjadi 2,5 menggunakan HCl 4 N.
- Supernatan diekstraksi menggunakan metode ekstraksi cair-cair (etil asetat/ $\text{NaHCO}_3$ ).
- Untuk fungi, kaldu kultur F. fujikuroi Czapek-Dox disaring melalui kertas saring yang telah ditimbang sebelumnya dan filtrat diatur ke pH 2,5 dengan HCl 10%.
- Filtrat yang telah diasamkan diekstraksi dengan etil asetat (rasio 1 filtrat : 3 filtrat pelarut) dan dikumpulkan untuk estimasi GAs.
- Dalam pengukuran ini, asam giberelat diubah menjadi asam giberelenat yang menyerap cahaya pada panjang gelombang 254 nm.
- Sebanyak 25 mL supernatan ditambahkan 2 mL Zn asetat, direaksikan selama 2 menit, kemudian ditambahkan 2 mL kalium ferrosianida.
- Campuran disentrifus pada kecepatan 10.000 rpm selama 15 menit, lalu 5 mL supernatan ditambah 5 mL HCl 30%. Campuran diinkubasi pada suhu 20°C selama 75 menit. Absorbansi diukur pada 254 nm.
- Konsentrasi GA dihitung berdasarkan kurva standar GA.

## **Asai Giberelin Mikroba dengan HPLC (Bhalla *et al.* 2010)**

### **Alat**

- HPLC

### **Bahan**

- Nutrient Broth
- *Potato Dextrose Broth* (PDB)
- HCl 0,1 N

- KOH 0,1 N
- Standar Giberelin

### Prosedur

- Persiapan larutan standar
  - Pembuatan standar Giberelin (GA3, GA4, GA7, GA3 metil ester, GA7 metil ester 3,13 diasetat, metil ester GA7, dan asam fusarat; masing-masing 1 mg) dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL, dilarutkan dalam asetonitril, dan volume dibuat sampai tanda untuk mendapatkan larutan stok yang mengandung 100 g mL<sup>-1</sup> untuk masing-masing.
  - Dari masing-masing larutan stok 100 g mL<sup>-1</sup>, 1 mL larutan dipipet ke labu ukur 10 mL dan volume dibuat sampai tanda untuk mendapatkan konsentrasi standar giberelin sebesar 10 g mL<sup>-1</sup>.
  - Dari larutan standar hasil pengenceran ini, standar kerja 1 g mL<sup>-1</sup> dibuat dengan pengenceran serial mikroliter masing-masing larutan standar untuk diinjeksikan ke dalam HPLC.
- Ekstraksi Giberelin
  - Kultur bakteri atau fungi pada medium diinokulasikan masing-masing pada medium NB dan PDB dalam Erlenmeyer 250 mL. Labu diinkubasi pada 25 - 30°C.
  - Setelah inkubasi, untuk kultur fungi, filtrat kultur masing-masing labu disaring dengan kertas saring Whatman No. 42. Untuk kultur bakteri sebelum disaring, kultur disentrifus pada kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C.
  - pH filtrat diatur menjadi 2,5-3,0 dengan menambahkan 0,1 N HCl atau KOH. Filtrat kultur diekstraksi menggunakan hampir tiga kali etil asetat (450 + 150 + 150 mL) dalam corong pisah 1 L. Lapisan organik dipisahkan dan dilewatkan melalui natrium sulfat anhidrat (10 g).
  - Pelarut diuapkan dalam *rotary vacuum evaporator* pada suhu 40°C dan kecepatan 10 rpm.
  - Residu dilarutkan dalam asetonitril (HPLC *grade*) dan disimpan untuk analisis HPLC.
- Pengukuran Ekstraksi Giberelin dengan HPLC
  - Pada analisis HPLC, larutan yang mengandung giberelin (20 µL) diinjeksikan ke dalam HPLC pada panjang gelombang 206 nm. Setiap putaran diulang tiga kali dan respons detektor diukur sebagai area puncak.
  - Larutan standar giberelin juga diinjeksikan dalam kondisi yang sama.
  - Setelah menstandarisasi metode analisis untuk mendapatkan puncak tajam yang terpisah untuk setiap analat, sampel yang diekstraksi juga diinjeksikan pada kondisi HPLC yang sama dan respons diukur melalui

area puncak pada panjang gelombang 206 nm.

- Jumlah gibberelin pada ekstrak filtrat diestimasi dengan rumus sebagai berikut:  $\gamma = \alpha \times c \times v/\beta$ , dimana  $\gamma$  = konsentrasi analat yang ditunjukkan oleh waktu retensi pada HPLC di dalam sampel  $1 \mu\text{g g}^{-1}$ ,  $\alpha$  = area puncak sampel,  $\beta$  = area puncak standar,  $c$  = konsentrasi larutan standar ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ),  $v$  = volume ekstrak sampel.

### Daftar Pustaka

- Bhalla K, Singh SB, Agarwal R. 2010. Quantitative determination of gibberellins by high performance liquid chromatography from various gibberellins producing *Fusarium strains*. *Environ Monit Assess* 167(1–4):515–520.
- Bömke C, Tudzynski B. 2009. Diversity, regulation, and evolution of the gibberellin biosynthetic pathway in fungi compared to plants and bacteria. *Phytochemistry*.70:1876–1893.
- Bric JM, Bostock RM, Silverstone SE. 1991. Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by Bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 535-538.
- Egamberdieva D, Wirth SJ, Alqarawi AA, Abd\_Allah EF, Hashem A. 2017. Phytohormones and Beneficial Microbes: Essential Components for Plants to Balance Stress and Fitness. *Frontiers in Microbiology*. 8: Article 2104.
- Frankenberger WT, Poth M. 1987. Biosynthesis of indole-3-acetic acid by the pine ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 2908-2913.
- Gordon SA, Weber RP. 1951. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant Physiol* 26:192-195.
- Jimtha JC, Smitha PV, Anisha C, Deepthi T, Meekha G, Radhakrishnan EK, Gayatri GP, Remakantha A. 2014. Isolation of endophytic bacteria from embryogenic suspension culture of banana and assessment of their plant growth promoting properties. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 118:57–66 DOI 10.1007/s11240-014-0461-0.
- Lebuhn M, Hartmann A. 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.
- Li M, Guo R, Yu F, Chen X, Zhao H, Li H, Wu J. 2018. Indole-3-Acetic Acid Biosynthesis Pathways in the Plant-Beneficial Bacterium *Arthrobacter pascens* ZZ21. *Int. J. Mol. Sci.*, 19, 443; doi:10.3390/ijms19020443.
- Maor R, Haskin S, Levi-Kedmi H, Sharon A. 2004. In planta production of indole-3-acetic acid by *Colletotrichum gloeosporioides* sp. *Aeschynomene*. *App. Environ. Microbiol* 70:1852-1854.
- Morrone D, Chambers J, Lowry L, Kim G, Anterola A, Bender K, Peters RJ. 2009. Gibberellin biosynthesis in bacteria: Separate ent-copalyl diphosphate and ent-kaurene synthases in *Bradyrhizobium japonicum*. *FEBS Letters* 583: 475–480.

- Patten CL, Glick BR. 1996. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Can J Microbiol.* 42:207–220.
- Patten C, Glick B. 2002. Regulation of indoleacetic acid production in *Pseudomonas putida* GR12-2 by tryptophan and the stationary-phase sigma factor RpoS. *Can J Microbiol* 48. 7:635–642.
- Pirog T P, Iutynska GO, Leonova NO, Beregova K, Shevchuk TA. 2018. Microbial Synthesis OF Phytohormones. *BIOTECHNOLOGIA ACTA*, V. 11, No 1.
- Saini S, Kaur N, Pati PK. 2021. Phytohormones: Key players in the modulation of heavy metal stress tolerance in plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 223: 112578.
- Spaepen S. 2015. Plant Hormones Produced by Microbes. In: Lugtenberg, B. (eds) *Principles of Plant-Microbe Interactions*. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-08575-3\\_26](https://doi.org/10.1007/978-3-319-08575-3_26) Chapter 26 Plant Hormones Produced by Microbes Stijn Spaepen.
- 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].
- Vikram A, Hamzehzarghani H, Alagawadi AR, Krishnaraj PU, Chandrashekar BS. 2007. Production of plant growth promoting substances by phosphate solubilizing bacteria isolated from Vertisols. *J Plant Sci* 2(3):326–333.
- Wang C, Liu Y, Li SS, Han GZ. 2015. Insights into the origin and evolution of the plant hormone signaling machinery. *Plant Physiology*, 167(3): 872–886.

*There is no greater love than love of food. Air and water give us life, but food gives us a way of life.*

George Bernard Shaw

## 2.14

## MIKROBA PELARUT SILIKAT

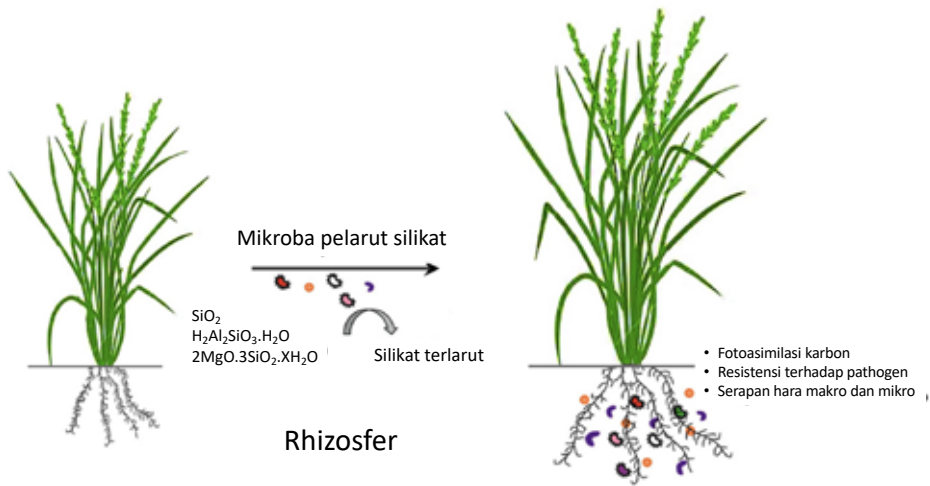
*Etty Pratiwi*

Silika (Si) merupakan unsur kedua terbanyak (sekitar 27%) di kerak bumi setelah oksigen, sebagian besar terdapat dalam bentuk silikat tidak larut seperti magnesium silikat, aluminium silikat, besi, kalsium silikat, natrium, dan kalium silikat (Bist *et al.* 2020). Selain itu beberapa bentuk Si lainnya seperti kaolin, smektit, vermikulit, kuarsa, silika amorf, dan bentuk kristal seperti feldspar, ortoklas dan plagioklas juga terdapat di dalam tanah (Sahebi *et al.* 2015).

Studi sebelumnya telah mengungkapkan peran menguntungkan Si pada tanaman melalui peningkatan pertumbuhan dan perkembangan tanaman (Frew *et al.* 2018). Akumulasi Si umumnya lebih tinggi pada tumbuhan paku-pakuan dan monokotil dibandingkan dengan jenis tumbuhan lain (Hodson *et al.* 2005, Farooq & Dietz 2015). Manfaat Si tampak lebih nyata pada spesies tanaman pengakumulator Si seperti padi, jagung, gandum dan tebu. Suplementasi Si telah terbukti mempengaruhi kebugaran tanaman pada cekaman lingkungan (Sathe *et al.* 2021).

Silika meningkatkan resistensi tanaman atau cekaman biotik terhadap beberapa penyakit dalam kondisi suplementasi Si telah banyak dilaporkan (Hawerroth *et al.* 2019). Silika melindungi tanaman dari serangga dan nematoda (Silva *et al.* 2010). Selain cekaman biotik, Si juga dapat mengurangi dampak negatif cekaman abiotik seperti cekaman logam berat, cekaman lingkungan seperti kekeringan, salinitas, cekaman panas, dan ketidakseimbangan nutrisi (Ma 2004). Selain itu, Si juga diketahui memfasilitasi ketersediaan hara makro dan hara mikro lainnya seperti fosfor, kalium, seng, dan tembaga (Artyszak 2018). Mekanisme pelarutan silikat oleh mikroba dalam meningkatkan ketersediaan Si di tanah disajikan pada Gambar 1.

Berkaitan dengan pentingnya silika sebagai pupuk untuk berbagai tanaman, mikroba pelarut silikat menjadi komponen baru pupuk hayati untuk pengelolaan tanaman dan kesuburan yang berkelanjutan. Eksplorasi mikroba pelarut silikat (MPSi) memberikan pilihan yang lebih ramah lingkungan dan ekonomis untuk meningkatkan ketersediaan Si bagi tanaman pangan, yang pada akhirnya meningkatkan produksi pertanian. Mikroba pelarut silikat semakin diminati penggunaannya sebagai pupuk hayati di bidang pertanian karena tidak hanya melarutkan Si tetapi juga P dan K (Patil *et al.* 2022), sehingga mengurangi ketergantungan pada pupuk kimia.



Gambar 1. Mekanisme pelarutan silikat oleh mikroba dalam meningkatkan ketersediaan Si di tanah (Dimodifikasi dari Patil et al. 2022)

## Isolasi dan Penapisan Mikroba Pelarut Silikat (Patil et al. 2022)

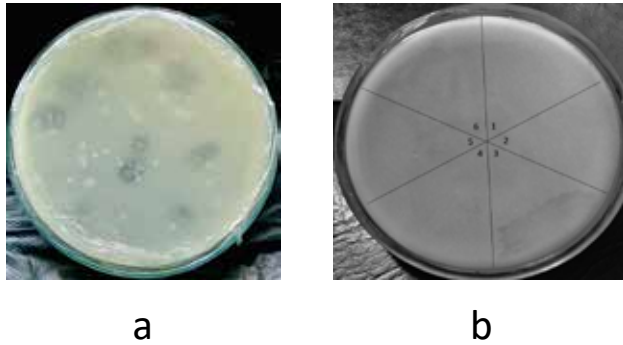
### Prinsip Pengujian

Rhizosfer tanaman merupakan sumber yang kaya akan MPSi. Isolasi dan seleksi MPSi dilakukan menggunakan media yang disuplementasi dengan silikat sukar larut, yaitu magnesium trisilikat ( $Mg_2O_8Si_3$ ). Kemampuan mikroba yang dapat melarutkan  $Mg_2O_8Si_3$  pada media selektif ini diperlihatkan melalui terbentuknya zona bening di sekeliling koloni (Gambar 2 dan 3).

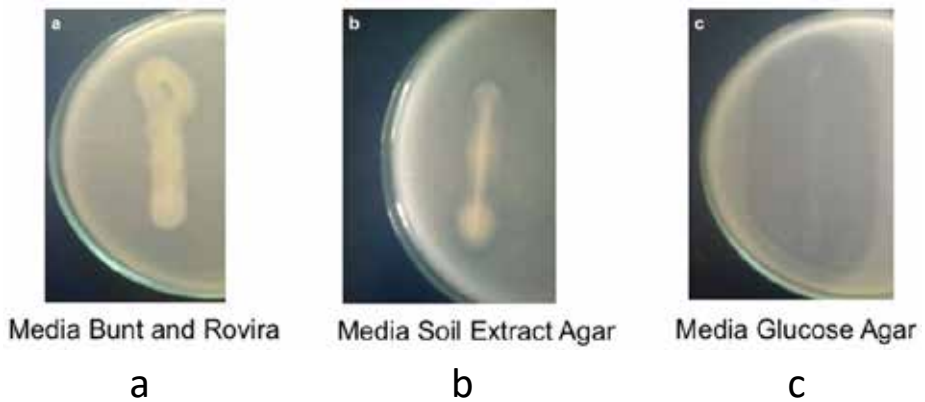
Beberapa media yang dapat digunakan untuk mengisolasi mikroba pelarut silikat, diantaranya media Agar Silikat untuk bakteri, fungi, atau actinomycetes (Patil et al. 2022), media Bunt Rovira (Muralikannan & Anthoni Raj 1998), NBRISSM (Bist et al. 2020), serta *Nutrient Agar*, *Glucose Agar*, dan media *Soil Extract Agar* yang disuplementasi dengan magnesium trisilikat.

### Alat

- Vortex
- Spreader
- Inkubator
- Mortar
- Laminar flow
- Pipet mikro dilengkapi dengan tip



Gambar 2. [a] Isolasi bakteri pelarut silikat pada media padat Bunt Rovira, [b] Seleksi bakteri pelarut silikat pada media padat Bunt Rovira yang diinkubasi selama 7 hari pada suhu 28°C



Gambar 3. Koloni mikroba pelarut silikat pada media padat Bunt Rovira [a], media Soil Extract Agar [b], dan media Glucose Agar [c] yang diperkaya dengan magnesium trisilikat (Sumber: Vasanthi et al. 2018).

### Bahan

- Contoh tanah rhizosfer atau bagian dari tanaman seperti padi, tebu, jagung atau alang-alang dan bintil akar tanaman kacang-kacangan.
- Larutan garam fisiologis dan tabung steril untuk pengenceran sampel tanah.

### Media

- Agar Silikat untuk Bakteri
  - Magnesium sulfat 0,1 g
  - Kalsium karbonat 0,1 g
  - $Mg_2O_8Si_3$  1,0 g

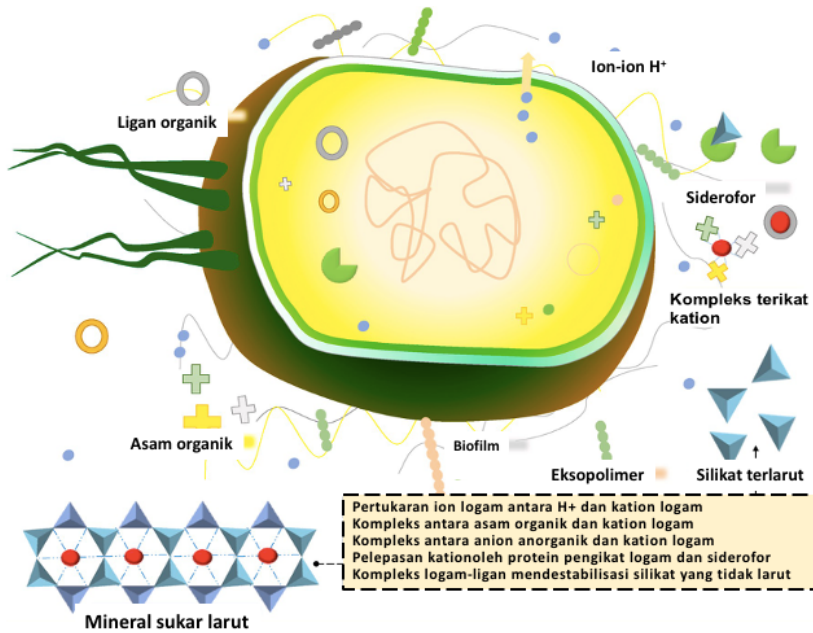
- Glukosa 1,0 g
- Ferri klorida 0,005 g
- Kalsium fosfat 1,0 g
- Amonium sulfat 0,2 g
- Agar 20 g
- Air suling sampai volume 1000 mL
- pH akhir (pada 25 °C):  $7,2 \pm 0,2$  (lalu tambahkan 5 mL 10 mg% fenol merah atau 20 mg% bromotimol biru per liter).
- Agar Silikat untuk Fungi
  - Glukosa 0,5 g
  - Ekstrak ragi 0,5 g
  - Amonium sulfat 0,4 g
  - $Mg_2O_8Si_3$  1,0 g
  - Kalium alumino silikat 1,5 g
  - Kalsium fosfat 1,0 g
  - Agar 20,0 g
  - Air suling sampai volume 1000 mL
  - pH akhir 6,5 (lalu tambahkan 5 mL 10 mg% fenol merah atau 20 mg% bromotimol biru per liter).
- Agar Silikat untuk Actinomycetes
  - Magnesium sulfat 0,1 g
  - Kalsium karbonat 0,1 g
  - Kalium alumino silikat 1,5 g
  - *Soluble starch* 2 g
  - Besi klorida 0,01 g
  - Asparagin 0,01 g
  - Casein 0,02 g
  - Kalsium fosfat 1,0 g
  - Amonium sulfat 0,2 g
  - Agar 20 g
  - Air suling sampai volume 1000 mL
  - pH akhir 7,0 (lalu tambahkan 5 mL 10 mg% fenol merah atau 20 mg% bromotimol biru per liter).
- Media NBRISSM
  - Glucose 2,5 g

- *Hydroxyapatite* 2,5 g
- $\text{MgNO}_3$  1,25 g
- $\text{CaCl}_2$  1,25 g
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,1 g
- $\text{Mg}_2\text{O}_8\text{Si}_3$  0,1 g
- Air suling sampai volume 1000 mL
- pH akhir 7,0
- Nutrient agar media (per liter media):
  - *Glucose* 5,0 g
  - *Peptone* 5,0 g
  - *Beef extract* 3,0 g
  - $\text{NaCl}$  5,0 g
  - $\text{Mg}_2\text{O}_8\text{Si}_3$  2,5 g
  - Agar 20,0 g
  - Air suling sampai volume 1000 mL
  - pH akhir pH 7,0
- Media Bunt Rovira
  - *Glucose* 20,0 g
  - *Peptone* 1,0 g
  - *Yeast extract* 1,0 g
  - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,5 g
  - $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,4 g
  - $\text{MgCl}_2$  0,1 g
  - $\text{FeCl}_3$  0,01 g
  - Soil extract 250 mL
  - $\text{Mg}_2\text{O}_8\text{Si}_3$  2,5 g
  - Agar 20,0 g
  - Air suling sampai volume 1000 mL
  - pH akhir pH 6,6-7,0
- *Soil extract agar*:
  - *Glucose* 1,0 g
  - $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,5 g
  - *Soil extract* 100 mL
  - $\text{Mg}_2\text{O}_8\text{Si}_3$  2,5 g
  - Agar 20,0 g

- Air suling sampai volume 1000 mL
- pH akhir pH 7,0
- *Glucose agar:*
  - *Glucose* 1,0 g
  - $Mg_2O_8Si_3$  2,5 g
  - Agar 20,0g
  - Air suling sampai volume 1000 mL
  - pH akhir pH 7,0

### Prosedur

- Ambil sampel tanah sebanyak 1 g, lalu tambahkan 9 mL larutan garam fisiologis steril, setelah diaduk rata lalu lakukan seri pengenceran secara berurutan hingga sepuluh kali lipat sampai  $10^{-6}$ .
- Untuk mengisolasi mikroba endofit dan rhizobia rhizosfer, permukaan tanaman disterilkan dengan 70% etanol atau 0,01% merkuri klorida atau 5,0% NaOCl. Kemudian hancurkan sampel dalam larutan garam fisiologis steril, encerkan lebih lanjut dan gores pengenceran spesifik pada media agar pelarut silikat steril.
- Siapkan agar selektif yang telah diperkaya  $Mg_2O_8Si_3$  menggunakan air suling murni di dalam labu Erlenmeyer yang bersih dan sterilkan pada suhu  $121^{\circ}C$  selama 15 menit pada tekanan 15 psi.
- Biarkan media mendingin pada suhu  $40^{\circ}C$ , dan labu Erlenmeyer digoyang merata untuk melarutkan silikat atau karbonat yang mengendap.
- Tuang ke dalam cawan Petri steril dan biarkan memadat pada suhu kamar selama 2-3 jam. Siapkan juga cawan media kontrol masing-masing media kultur tanpa silikat.
- Ambil satu loop penuh suspensi tanah dari tabung pengenceran  $10^{-5}$  hingga  $10^{-6}$  dan gores pada cawan agar silikat, atau ambil 100 mL suspensi tanah dari tabung pengenceran  $10^{-5}$  hingga  $10^{-6}$  dan disebar merata pada media padat silikat.
- Inkubasi cawan pada suhu kamar kira-kira hingga 48 jam; amati lempeng untuk pertumbuhan dan zona bebas di sekitar koloni (Gambar 2 dan 3).
- Bandingkan cawan yang mengandung silikat dengan cawan kontrol untuk memeriksa kelarutan Si melalui pembentukan zona bening di sekitar koloni.
- Pemurnian isolat dilakukan dengan dengan cara menumbuhkan koloni-koloni tunggal hasil isolasi sebelumnya pada media padat yang diperkaya dengan magnesium silikat (Gambar 2b dan 2c).
- Untuk konfirmasi mekanisme pelarutan, gunakan indikator pH dalam medium. Tambahkan 3-5 mL dari larutan 10 mg/% fenol merah atau larutan 10 mg/%



Gambar 4. Mekanisme yang terlibat dalam aktivitas pelarutan silikat oleh bakteri termasuk menurunkan pH dengan produksi asam organik dan anorganik, penggantian partikel bermuatan pada permukaan mineral, produksi metabolit mikroba, enzim, dan eksopolimer (Dimodifikasi dari Raturi *et al.* 2021)

bromofenol biru dan aduk rata (indikator pH seperti bromocresol green, phenol red, bromophenol blue ditambahkan pada media untuk mengetahui mekanisme kelarutan silikat. Larutan indikator pH dilarutkan dalam etanol 70% untuk menghindari kontaminasi. Indikator pH dapat ditambahkan setelah sterilisasi). Perubahan warna akan menunjukkan apakah pelarutan silikat oleh mikroba bersifat asam atau alkali.

## Ulasan

Silika dalam tanah berada sebagai nutrisi anorganik seperti mika, feldspar, dan sebagai silikat dari berbagai elemen seperti natrium, aluminium, kalsium, magnesium, kalium, dan besi, yang tidak tersedia untuk serapan tanaman (Struyf *et al.* 2010). Bentuk mineral Si ini berasal dari pelapukan atau pelarutan dalam air tanah.

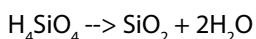
Pelarutan mineral silikat oleh mikroba terjadi melalui produksi asam organik atau anorganik, alkali, polisakarida ekstraseluler, atau ligan (Gambar 4). Namun pelarutan berbasis asam organik adalah mekanisme yang paling umum digunakan oleh bakteri untuk melarutkan mineral silikat (Cama & Ganor 2006).

Silikat banyak tersedia di tanah tetapi dalam bentuk tidak bergerak atau mineral yang tidak tersedia untuk diasimilasi langsung oleh tanaman. Kebutuhan tanaman dipenuhi dengan penambahan pupuk silika dari luar, namun sebagian besar pemenuhan silika dilakukan dengan penambahan terak industri, yang menyebabkan pencemaran logam berat lainnya di tanah pertanian. Selain itu, pupuk silika yang ada di pasaran seperti bentonit, mika *feldspar*, dan tanah diatom tersedia tetapi mengandung sedikit Si yang tersedia sehingga memerlukan penerapan dosis yang lebih tinggi. Saat ini kalium silikat digunakan sebagai pupuk silika yang populer tetapi harganya terlalu mahal, dan dapat menyebabkan fitotoksitas, dan eutrofikasi. Aplikasi pupuk hayati berbahan aktif mikroba pelarut Si terbukti paling ramah lingkungan, murah, dan signifikan untuk memenuhi kebutuhan Si tanaman.

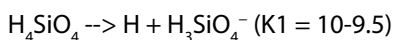
Pelarutan silikat oleh mikroba pertama kali dilaporkan oleh Aleksandrov *et al.* (1967). Berbagai mikroba dilaporkan memiliki potensi depolimerisasi/pelarutan silika, yaitu *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Pseudomonas* sp. (Chen *et al.* 2009). Beberapa penelitian membuktikan bahwa fungi aktif melarutkan mineral silikat dari mineral batuan, misalnya *Fusarium oxysporum* (Henderson 1963, Bansal 2004). Sejumlah strain bakteri dari genus *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Rhizobia*, *Burkholderia*, dan *Enterobacter* juga diketahui melepaskan silika dari silikat dan meningkatkan pertumbuhan tanaman (Kang *et al.* 2017)

Pelapukan batuan menjadi asam silikat dapat dibantu oleh mikroba pelarut silikat dan tetap dalam bentuk ini pada pH antara 2,0 dan 8,5. Ketika pH meningkat menjadi 9,0 dan 11,0  $H_4SiO_4$  berdisosiasi menjadi  $H_3SiO_4^-$  dan  $H_2SiO_4^{2-}$ . Pada pH di atas 11,0 dapat menyebabkan polimerisasi asam monosilikat menjadi asam polisilikat. pH antara 9,0 dan 10,0 memengaruhi adsorpsi silikat (Gambar 5).

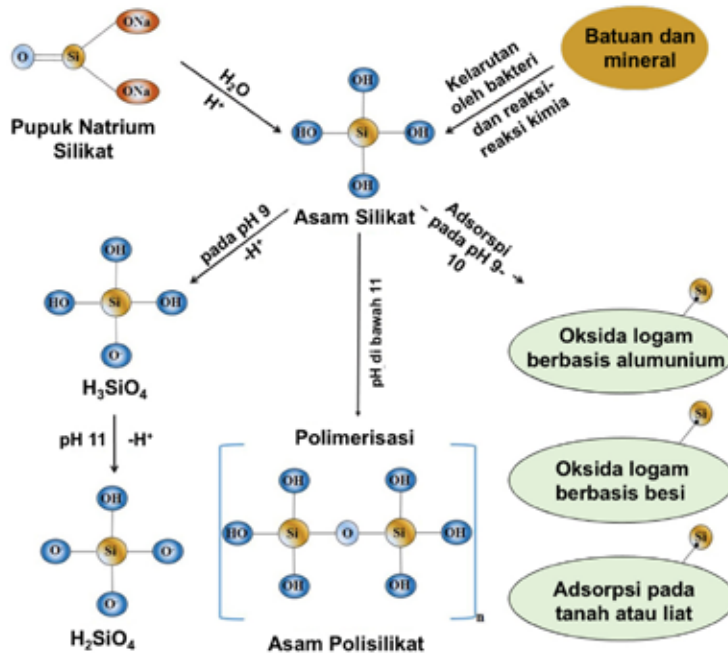
Silikat dalam larutan pada pH 2-9 berada dalam bentuk asam monosilikat yang tidak terdisosiasi ( $H_4SiO_4$ ), sedangkan pada pH 9 ke atas, ia berubah menjadi anion silikat, seperti  $H_3SiO_4^-$  (Hall 1972). Polimerisasi asam monosilikat dalam larutan supersaturasi terhadap silika amorf, membentuk oligomer asam polisilik (Iler 1979). Reaksi polimerisasi ini disukai di sekitar pH netral di mana kelarutan silika paling rendah (Avakyan *et al.* 1985). Polimerisasi asam monosilikat dapat dilihat sebagai penghilangan air dari antara monomer yang berdekatan untuk membentuk ikatan siloksan. Silika dapat dilihat sebagai anhidrida asam silikat:



Konstanta disosiasi untuk asam silikat adalah sebagai berikut (Anderson 1972):



Silika dapat berada dalam bentuk terhidrasi sebagian yang disebut asam metasilikat ( $H_2SiO_3$ ) atau dalam bentuk terhidrasi penuh yang disebut asam ortosilikat



Gambar 5. Pengaruh pH terhadap ketersediaan silikat dalam tanah. Ion H di tanah memengaruhi keberadaan asam mono/polisisilikat dalam tanah (Dimodifikasi dari Raturi et al. 2021)

( $H_4SiO_4$ ). Masing-masing bentuk ini dapat dipolimerisasi, pembentuk asam orto, misalnya,  $H_3SiO_4 \cdot H_2SiO_3 \cdot H_3SiO_3$  (Latimer dan Hildebrand 1940, Liebau 1985). Polimer dapat menunjukkan sifat koloid, tergantung pada ukuran dan faktor lainnya. Partikel koloid silika cenderung terbentuk pada kondisi jenuh silika (Tobler et al. 2009) dan disukai oleh kondisi asam (Hall 1972).

### Evaluasi Aktivitas Pelarutan Silika

Penapisan isolat mikroba untuk pelarutan Si umumnya didasarkan pada pembentukan zona bening pada media seleksi yang disuplementasi dengan silikat seperti magnesium trisilikat ( $Mg_2O_8Si_3$ ) yang diinkubasi selama 7 hari pada suhu  $28^\circ C$  (Kang et al. 2017). Terbentuknya zona bening pada media seleksi merupakan indikasi kemampuan bakteri untuk melarutkan silika.

Zona bening (halozone) merupakan tanda awal untuk mengetahui kemampuan MPSi dalam melarutkan silikat. Semakin lebar zona bening, secara kualitatif dapat dianggap sebagai tanda kemampuan MPSi 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 MPSi dalam melarutkan silikat secara kualitatif semakin besar, walaupun hal ini belum cukup untuk menggambarkan kemampuan MPSi dalam pelarutan silikat sukar larut.

Aktivitas bakteri pelarut silikat juga dapat diperkirakan dalam media kaldu dengan kuantifikasi Si yang dilepaskan oleh siliko-molibdat atau dengan metode Elliott dan Snyder (1991) yang dimodifikasi (Bist *et al.* 2020) di mana tiga volume asam borat 2,5% dan volume yang sama dari amonium molibdat 5,4% ditambahkan ke supernatan yang dikumpulkan dari kultur berumur 1, 3, 5, 7 dan 10 hari dalam medium Si diikuti dengan inkubasi 5 menit.

## Pengukuran Indeks Kelarutan Silikat

### Alat dan Bahan

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

### Prosedur

- Amati pertumbuhan koloni MPSi dalam cawan Petri
- 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, lalu 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.

## Daftar Pustaka

- Aleksandrov VG, Blagodyr RN, Live IP. 1967. Liberation of phosphoric acid from apatite by silicate bacteria. *Microchem. J.* 29:111–114.
- Anderson GM. 1972. Silica solubility. pp. 1085-1088. *In* Fairbridge RW (Ed.). *The Encyclopedia of Geochemistry and Environmental Sciences*. Encyclopedia of Earth Science Series, Vo. IVA. New York: Van Nostrand Reinhold.
- Artyszak A. 2018. Effect of silicon fertilization on crop yield quantity and quality—a literature review in Europe. *Plants (Basel)* 7(3):54.
- Avakyan ZA, Belkanova NP, Karavaiko GI, Piskunov VP. 1985. Silicon compounds in solution during bacterial quartz degradation. *Mikrobiologiya* 54:301– 307.
- Bansal V, Rautaray D, Ahmad A, et al. 2004. Biosynthesis of zirconia nanoparticles using the fungus *Fusarium oxysporum*. *J. Mater. Chem.* 14(22):3303–3305.
- Bist V, Niranjana A, Ranjan M, Lehri A, Seem K, Srivastava S. 2020. Silicon-solubilizing

- media and its implication for characterization of bacteria to mitigate biotic stress. *Front Plant Sci.* Feb 28: 11:28.
- Cama J, Ganor J. 2006. The effects of organic acids on the dissolution of silicate minerals: A case study of oxalate catalysis of kaolinite dissolution. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 70: 2191-2209.
- Chen J, Uroz S, Calvaruso C, et al. 2009 Mineral weathering by bacteria: ecology, actors and mechanisms. *Trends Microbiol.* 17:378–387.
- Elliot CL, Snyder GH. 1991. Autoclave-induced digestion for the colorimetric determination of silicon in rice straw. *J. Agric. Food. Chem.* 39: 1118-1119
- Farooq MA, Saqib ZA, Akhtar J. 2015. Silicon-mediated oxidative stress tolerance and genetic variability in rice (*Oryza sativa* L.) grown under combined stress of salinity and boron toxicity. *Turk. J. Agric. For.* 39:718-729.
- Frew A, Weston LA, Reynolds OL, Gurr GM. 2018. The role of silicon in plant biology: a paradigm shift in research approach. *Ann. Bot.* 121, 1265–1273. <https://doi.org/10.1093/aob/mcy009>.
- Gascho GJ. 2001 Silicon sources for agriculture. pp 197–207. *In* Datnoff LE, Snyder GH, & Korndorfer GH (Eds). *Silicon in Agriculture*, vol 8. Elsevier, Amsterdam.
- Hall FR. 1972. Silica cycle. pp. 1082–1085. *In* Fairbridge RW (Ed.) *The Encyclopedia of Geochemistry and Environmental Sciences*. Encyclopedia of Earth Science Series, Vol. IVA. New York: Van Nostrand Reinhold.
- Hawerth C, Araujo L, Bermudez-Cardona MB, Silveira PR, Wordell Filho JA, Rodrigues FA. 2019. Silicon-mediated maize resistance to macrospora leaf spot. *Tropical Plant Pathol.* 44(2):192-196
- Henderson ME, Duff RB. 1963. The release of metallic and silicate ions from minerals, rocks, and soils by fungal activity. *J. Soil Sci.* 14:237–245.
- Iler RK. 1979. *The Chemistry of Silica: Solubility, Polymerization, Colloid and Surface Properties, and Biochemistry*. John Wiley and Sons Ltd., New York.
- Kang SM, Waqas M, Shahzad R., You YH, Asaf S, Khan MA, Lee KE, Joo GJ, Kim SJ, Lee IJ. 2017. Isolation and characterization of a novel silicate-solubilizing bacterial strain *Burkholderia eburnea* CS4-2 that promotes growth of japonica rice (*Oryza sativa* L. cv. Dogjin), *Soil Sci. Plant Nutr.* 63:233-241.
- Kaya C, Tuna AL, Sonmez O, Ince F, Higgs D. 2009. Mitigation effects of silicon on maize plants grown at high zinc. *J. Plant Nutr.* 32: 1788–1798.
- Latimer WM, Hildebrand JH. 1940. *Reference Book of Inorganic Chemistry*. Revised edition. New York: MacMillan.
- Liebau F. 1985. *Structural Chemistry of Silicates. Structure, Bonding and Classification*. Berlin, Germany: Springer.
- Ma JF. 2004. Role of silicon in enhancing the resistance of plants to biotic and abiotic stresses. *Soil Sci. Plant Nutr.* 50: 11-18.
- Maghsoudi K, Emam Y, Ashraf M. 2015. Foliar application of silicon at different growth stages alters growth and yield of selected wheat cultivars. *J. Plant. Nutr.* 39:1194–1203.
- Miyake Y, Takahashi E. 1983. Effect of silicon on the growth of solution-cultured cucumber plant. *Soil Sci. Plant Nutr.* 29:71–83.

- Muralikannan N, Anthoni Raj S. 1998. Occurrence of silicate solubilising bacteria in rice ecosystem. Madras. Agricultural J. 85:47-50.
- Onodera I. 1917. Chemical studies on rice blast (*Dactylaria parasitance* Cavara). J. Agr. Sci. 180:606–617.
- Patil CD, Mohite BV, Suryawanshi RK, Patil SV. 2022. Isolation and Screening of Silicate Solubilizing Microbes: Modern Bioinputs for Crops. p. 237-242. In Amaresan N, Patel P, Amin D.(Eds). Practical Handbook on Agricultural Microbiology. Springer Protocols Handbooks. Humana, New York, NY.
- Raturi G, Sharma Y, Rana V, Thakral V, Myaka B, Salvi P, Sing M, Dhar H, Deshmukh R. 2021. Exploration of silicate solubilizing bacteria for sustainable agriculture and silicon biogeochemical cycle. Plant Physiol. Biochem. 166: 827- 838.
- Rudnick RL, Gao S. 2003. Composition of the continental crust. pp 1–64. In Holland HD, Turekian KK. (Eds). Treatise on geochemistry, Vol 3. Elsevier Science, New York,
- Sahebi M, Hanafi MM, Azizi P. 2016. Application of silicon in plant tissue culture. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 52:226–232
- Sathe AP, Kumar A, Mandlik R, Raturi G, Yadav H, Kumar N, et al. 2021. Role of silicon in elevating resistance against sheath blight and blast diseases in rice (*Oryza sativa* L.), Plant Physiol. Biochem. 166:128-139.
- Savant NK, Snyder GH, Datnoff LE. 1997. Silicon management and sustainable rice production. Adv. Agron. 58:151–199.
- Silva R, Oliveira R, Nascimento K, Rodrigues F. 2010. Biochemical responses of coffee resistance against *Meloidogyne exigua* mediated by silicon. Plant Pathol. 59: 586–593.
- Struyf E, Smis A, Van Damme S, Garnier J, Govers G, Van Wesemael B, Conley DJ, Batelaan O, Frot E, Clymans W, Vandevenne F, Lancelot C, Goos P, Meire P. 2010. Historical land use change has lowered terrestrial silica mobilization, Nature Comm. 1: AR129.
- Tobler DJ, Benning LG. 2013. In situ and time resolved nucleation and growth of silica nanoparticles forming under simulated geothermal conditions. Geochim Cosmochim Acta 114:156–168.
- Vasanthi N, Saleena LM, Raj SA. 2018. Silica solubilization potential of certain bacterial species in the presence of different silicate minerals. Silicon. 10: 267–275.

# 2.15

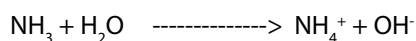
## BAKTERI NITRIFIKASI

Dila Aksani, Jati Purwani, Edi Husen

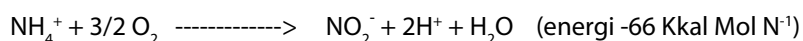
Nitrifikasi merupakan proses perubahan nitrogen di dalam tanah yang terjadi secara biologis dari bentuk reduktif menjadi bentuk oksidatif, yaitu proses oksidasi ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) menjadi nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) dan selanjutnya proses oksidasi nitrit menjadi nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) (Alexander 1977). Oksidasi ammonium menjadi nitrit dan kemudian menjadi nitrat dilakukan berturut-turut oleh grup bakteri *Nitrosomonas* sp. dan bakteri *Nitrobacter* sp. (Anggrahini, 2009). Kedua grup bakteri yang berperan dalam proses nitrifikasi merupakan bakteri autotrof yang membutuhkan senyawa anorganik sebagai sumber energi dan karbon dioksida sebagai sumber karbon (Pratiwi, 2011).

Bakteri nitrifikasi berperan penting dalam meningkatkan ketersediaan unsur hara N dalam bentuk nitrat di dalam tanah (Kiding *et al.* 2015). Beberapa faktor yang mempengaruhi proses nitrifikasi di dalam tanah yaitu ketersediaan ammonium, kemasaman tanah (pH tanah), kelembaban, aerasi dan suhu tanah (Antriana 2015). Proses nitrifikasi di dalam tanah berlangsung secara aerob.

Tahapan reaksi proses nitrifikasi yang dilakukan oleh bakteri adalah sebagai berikut (Spotte 1979):

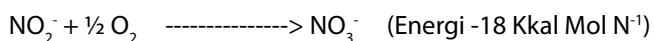


(*Nitrosomonas* sp.)



Enzim ammonia monooksigenase

(*Nitrobacter* sp.)



Enzim nitrit oksidase

### Isolasi, enumerisasi dan karakterisasi

#### Alat

Erlenmeyer, tabung reaksi, cawan petri, gelas ukur, autoklaf, oven, inkubator, mesin penggoyang, neraca analitik, mikropipet, tip, ose (bulat dan lurus), objek glass, pipet tetes, corong, batang pengaduk, sendok tanduk, bunsen, botol sampel, rak tabung, penangas, vortex, mikroskop, dan *laminar air flow* (LAF).

## Bahan

Contoh tanah (tanah perakaran dan di sekitar perakaran tanaman),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , Fe-sitrat, fenol red,  $\text{KNO}_3$ , NaCl,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{CaCl}_2$ , bactoagar, bactopecton, akuades, minyak imersi, kapas, kain kasa, korek api, *tissu roll*, alkohol, spiritus, *aluminium foil*, *plastic wrap*, kertas label, larutan Hucker's cristal violet (gram A), larutan *Mordan lugol iodine* (gram B), alkohol aseton (gram C), dan safranin (gram D).

## Prosedur

### 1. Sterilisasi Alat

Alat-alat yang akan digunakan disterilkan lebih dahulu. Alat yang terbuat dari gelas atau kaca disterilkan dengan menggunakan oven dengan suhu  $180^\circ\text{C}$  selama 2 jam. Sedangkan alat-alat yang terbuat dari logam misalnya ose dicuci dengan alkohol 70% kemudian dipijarkan di atas api bunsen sampai membara. Sterilisasi medium menggunakan panas basah bertekanan dengan autoklaf pada suhu  $121^\circ\text{C}$  dan tekanan 1 atm atau 15 psi (*pon per square inch*) selama 15–30 menit.

### 2. Pembuatan Medium

- Medium Cair Spesifik *Nitrosomonas* sp., komposisinya dalam 1000 mL akuades adalah: 2,0 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 1,0 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 2,0 g NaCl; 0,5 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,4 g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,01 g  $\text{CaCO}_3$  dan 0,025 g fenol-red dengan pH 7 (Odokuma & Akponah 2008). Semua bahan-bahan ditimbang sesuai dengan takaran yang diperlukan kemudian dilakukan pemanasan sehingga semua bahan larut. Selanjutnya disterilkan menggunakan autoklaf selama 15 menit, pada tekanan 1 atm dengan suhu  $121^\circ\text{C}$ . Khusus untuk pembuatan media padat ke dalam media ditambahkan 15 g bactoagar.
- Medium Cair Spesifik *Nitrobacter* sp., komposisinya dalam 1000 mL akuades adalah: 0,2 g  $\text{NaNO}_2$ ; 0,50 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 0,50 g NaCl; 0,50 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,50 g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 1,0 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  dengan pH 7 (Zhang et al. 2014). Semua bahan-bahan ditimbang sesuai dengan takarannya kemudian dipanaskan sehingga semua bahan larut. Selanjutnya medium disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit, pada tekanan 1 atm dengan suhu  $121^\circ\text{C}$ . Khusus untuk pembuatan media padat, ditambahkan 15 g bactoagar ke dalam media.

## Isolasi Bakteri Nitrifikasi

Isolasi bakteri nitrifikasi dilakukan dengan metode enrichment culture, yaitu sebanyak 1 g sampel tanah dimasukkan ke dalam masing-masing 50 mL media spesifik untuk bakteri *Nitrosomonas* sp. dan media spesifik untuk bakteri *Nitrobacter* sp. Kultur cair berisi isolat tersebut dikocok dengan menggunakan mesin pengoyang sampai suspensi tersebar merata dan di inkubasi dalam suhu kamar selama 7–10 hari. Bakteri

*Nitrosomonas* sp. diindikasikan oleh perubahan warna media dari merah menjadi kuning dan bakteri *Nitrobacter* sp. diindikasikan oleh perubahan warna media dari bening menjadi keruh (Pratiwi 2011).

### **Penghitungan Populasi Bakteri**

Penghitungan total populasi bakteri nitrifikasi dilakukan dengan metode tuang (*pour plate method*). Sebanyak 1 mL suspensi dari media spesifik diencerkan bertingkat hingga  $10^{-6}$ , lalu dituang pada cawan petri steril dan di tambahkan medium agar nitrifikasi spesifik dan diinkubasi selama 2 x 24 jam, setelah itu dilakukan perhitungan total bakteri nitrifikasi (Pratiwi 2011).

## **Karakterisasi dan Pewarnaan Gram**

### **Karakterisasi Mikroba**

#### 1. Pengamatan koloni

Pengamatan koloni dilakukan dengan mengamati morfologi dari koloni yang terbentuk pada cawan petri yaitu bentuk koloni, warna, elevasi, ukuran, bentuk tepi koloni, serta permukaan koloni. Morfologi bakteri *Nitrosomonas* sp. berbentuk ellipsoid, batang pendak, Gram negatif dan bersifat motil atau non-motil. Sedangkan morfologi bakteri *Nitrobacter* sp. berbentuk batang pendek, Gram negatif, pleomorfik dan seringkali berbentuk pears, dan umumnya non-motil (Pratiwi 2011).

#### 2. Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram dilakukan dengan cara membuat olesan tipis isolat bakteri dari medium spesifik. Olesan tipis tersebut diwarnai dengan larutan kristal violet selama satu menit. Setelah itu dibilas dengan akuades dan direndam kembali menggunakan iodium selama satu menit. Selanjutnya larutan iodium dihilangkan dengan alkohol 95% selama 30 detik. Olesan dicuci dengan akuades dan dikeringkan dengan kertas isap. Counter stain dilakukan dengan safranin selama satu menit dan dicuci dengan akuades, lalu dikeringkan. Selanjutnya diamati dengan mikroskop menggunakan minyak imersi. Bakteri Gram negatif tidak menahan kristal violet setelah dicuci dengan alkohol, dengan demikian akan berwarna merah.

#### 3. Uji biokimia bakteri

Uji biokimia ini mencakup uji enzim katalase, uji OF (Oksidatif Fermentasi), uji sitrat, uji motilitas, uji gelatin, uji urea, uji indol, dan uji TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*) (Kiding *et al.* 2015).

## Daftar Pustaka

- Alexander M. 1977. Introduction to Soil Microbiology. 2nd edition. John Wiley & Sons. New York
- Anggrahini N. 2009. Dinamika  $\text{N-NH}_4^+$ ,  $\text{N-NO}_3^-$  dan potensial nitrifikasi tanah di Alfisol, Jumantono dengan berbagai perlakuan kualitas serasah sengon laut dan mahoni. Skripsi. Fakultas Pertanian. Universitas Sebelas Maret. Surakarta.
- Antriana N. 2015. Keragaman dan laju kinetika aktivitas isolat nitrifikasi asal perkebunan karet dan kelapa sawit Jambi. Tesis. Pasca Sarjana IPB. Bogor.
- Kiding A, Khotimah S, Linda R. 2015. Karakterisasi dan kepadatan bakteri nitrifikasi pada tingkat kematangan tanah gambut yang berbeda di kawasan hutan lindung Gunung Ambawang Kab. Kubu Raya. Jurnal Protobiont. 4(1):17-21.
- Pratiwi YR. 2011. Isolasi dan seleksi bakteri penitrifikasi dari sampel tanah di sekitar kandang ternak di kabupaten bogor. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Rao NSS. 1994. Soil Microbiology (Fourth Edition of Soil Microorganisms and Plant Growth). Science Publishers Inc. Pakistan.
- Spotte S. 1979. Fish and Invertebrate Culture, Water Management in Closed System, 2nd Edition, A Willey Int. Pub. John Willey and Sons. New York.
- Zhang D, Shouguang Ma, Zhang W, Wang Y. 2014. Ammonia stimulates growth and nitrite-oxidizing activity of *Nitrobacter winogradskyi*. Biotechnology & Biotechnological Equipment. 28(1): 27-32.
- Odokuma LO, Akponah E. 2008. Response of *Nitrosomonas*, *Nitrobacter* and *Escherichia coli* to drilling fluids. Journal of cell and Animal Biology. 2: 43-54.

# 2.16

## BAKTERI DENITRIFIKASI

Selly Salma, Jati Purwani, Dila Aksani, Edi Husen

Denitrifikasi adalah adalah reaksi reduksi nitrat melalui intermediatnya yaitu nitrit, gas oksida nitrat (NO) dan di-nitrogen oksida (N<sub>2</sub>O) hingga terbentuk N<sub>2</sub> yang dilakukan oleh bakteri aerob fakultatif. Proses biologis tersebut terjadi di alam, dimana nitrogen yang difiksasi dari udara (N<sub>2</sub>) dikembalikan dari tanah, air atau ekosistem lainnya ke atmosfer. Nitrat, nitrit, NO dan N<sub>2</sub>O adalah sebagai penerima elektron terakhir pada kondisi tidak adanya oksigen (O'Hara & Daniel, 1985). Proses denitrifikasi yang berlangsung secara aerob menghasilkan gas N<sub>2</sub>O dari pada N<sub>2</sub> (Takaya *et al.* 2003). Setiap langkah dari proses denitrifikasi dikatalisis oleh enzim reduktase, yang tergolong metallo-enzim, seperti yang tertera pada Tabel 1. Di antara enzim-enzim tersebut, nitrit reduktase merupakan enzim kunci (Zumft 1997)

Tabel 1. Enzim-enzim reduktase yang berperan dalam reaksi denitrifikasi dari nitrat menjadi N<sub>2</sub> (Pajares & Bohanan 2016, Bothun, 2014)

Substrat	Enzim reduktase	Produk
Nitrat (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> )	Nitrat reduktase yang terikat membrane (NAR) atau nitrat reduktase yang terikat periplasma (NAP)	Nitrit (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )
Nitrit	Nitrit reduktase (NIR)	NO
NO	Nitric oxide reductase (NOR)	N <sub>2</sub> O
N <sub>2</sub> O	Nitrous oksida reduktase	N <sub>2</sub>

Firestone (1982) mencatat terdapat 23 genus bakteri sebagai pelaku denitrifikasi, dan umumnya secara fisiologi termasuk kemo-heterotrof. Bakteri di tanah yang dilaporkan sebagai pelaku denitrifikasi yang potensial adalah dari genus *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Paracoccus*, *Thiobacillus*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Chromobacterium*, *Flavobacterium* dan *Hyphomicrobium* (Demanèche *et al.* 2009). Beberapa bakteri nitrifikasi heterotrof juga mampu melakukan denitrifikasi secara aerob, seperti *P. denitrificans* (Robertson *et al.* 1988), *Paracoccus denitrificans* (Robertson *et al.* 1989) dan *A. faecalis* (van Niel *et al.* 1992). Bagi beberapa bakteri denitrifikasi heterotrofik, misalnya, *P. stutzeri*, denitrifikasi bukanlah proses anaerob yang ketat (Firth & Dwards 2000). Denitrifikasi dalam tanah sangat bergantung pada ketersediaan senyawa organik

sebagai donor elektron (O'Hara & Daniel, 1985). Selain di tanah, mikroba denitrifikasi juga tersebar luas di sedimen, laut, kolam air tawar, dan sistem pengolahan air bersih, dan di sistem pengolahan limbah atau *sludge* (Maintinguer et al. 2013). Kemampuan denitrifikasi juga dimiliki oleh bakteri rhizobia. Pengujian yang dilakukan oleh Daniel et al. (1981), yaitu menguji kemampuan denitrifikasi dari 46 strain rhizobia untuk menilai kemampuan strain-strain tersebut menggunakan nitrat serta kemampuan untuk produksi nitrit, nitrat oksida dan nitrogen. Hasil uji tersebut menunjukkan bahwa 23 strain adalah pelaku denitrifikasi, termasuk 5 strain *Rhizobium meliloti*.

Denitrifikasi berperan penting dalam keseimbangan siklus nitrogen di alam (Knowles 1982), tetapi dalam beberapa hal menjadi persoalan yang cukup serius, misalnya (i) di bidang pertanian, dimana proses denitrifikasi merupakan mekanisme utama hilangnya unsur hara N yang mengakibatkan efisiensi pupuk nitrogen berkurang, (ii) adanya gas oksida nitrogen maka berpotensi menimbulkan pembentukan asam nitrat di atmosfer yang memberikan kontribusi nyata terhadap hujan asam, (iii) berpengaruh terhadap level ozon di stratosfer sehingga berdampak kepada iklim dunia (Crutzen & Enhalt 1977). Persyaratan umum yang diperlukan agar denitrifikasi dapat berlangsung adalah: (1) adanya bakteri yang memiliki kemampuan metabolik tersebut, (2) adanya elektron donor yang sesuai seperti senyawa organik atau senyawa an-organik seperti Sulfur tereduksi dan molekular Hidrogen ( $H_2$ ), (3) adanya kondisi anaerob atau kondisi dengan ketersediaan Oksigen terbatas, dan (4) ketersediaan oksida-oksida N, baik  $NO_3$  maupun  $NO_2$  sebagai penerima elektron terakhir (Firestone 1982).

Untuk menetapkan kelimpahan bakteri tersebut di alam, menurut Parsons et al. (1991), metode MPN merupakan cara yang tepat untuk memprediksi kelimpahan bakteri denitrifikasi di tanah. Respirasi dan kelembaban tanah merupakan faktor yang sangat berpengaruh terhadap laju denitrifikasi untuk beberapa tanah. Untuk memprediksi kelimpahan bakteri denitrifikasi dan pereduksi nitrat yang berasal dari sampel tanah, bahan organik, air danau, *effluent* dari sistim *septic tank*, Volz (1977) menggunakan media *Nutrient broth* yang ditambahkan baik nitrit maupun nitrat dan diinkubasi secara anaerob. Namun demikian, Volz (1977) menyatakan bahwa  $NO_2^-$  *broth* lebih sesuai digunakan dari  $NO_3^-$  *broth* untuk mengestimasi bakteri denitrifikasi dari tanah dan air.

## Prosedur Kerja

### Alat

- Cawan Petri steril
- Mikropipet 1 mL
- Mikropipet 200  $\mu$ L
- Mikrotip 1 mL
- Mikrotip 200  $\mu$ L
- Erlenmeyer 250 mL
- Tabung reaksi
- Inkubator
- Neraca Analitik ketelitian 2 desimal
- Autoklaf
- Pembakar bunsen
- pH Meter
- Laminar Air Flow
- Vortex
- Tabung Durham
- Botol Schott
- *Anaerobic jar*

### Bahan

- Anaerocult
- *Nutrient Broth* (Difco)
- $\text{KNO}_3$
- $\text{KNO}_2$
- $\text{NaNO}_3$
- $\text{NH}_4\text{Cl}$
- $\text{K}_2\text{HPO}_4$
- $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
- $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- $\text{H}_3\text{BO}_3 \cdot \text{NiCl}_2$
- $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- Vitamin : Biotin, Folic Acid, Thiamine, Riboflavin, Nicotinic Acid, Calcium Pantothenate, Pyridoxine, Vitamin B12, Lipoic Acid, p-aminobenzoic acid.
- Media Bromthymol Blue (BTB), Screening Medium (SM), Denitrification Medium (DM) dan *Luria-Bertani medium* (LB)

## Enumerasi bakteri denitrifikasi menggunakan metode *Most Probable Number* (MPN)

### Prinsip

Gas yang dihasilkan dari pertumbuhan bakteri pada media cair *Nutrient Broth* yang ditambahkan  $\text{KNO}_3$  atau  $\text{KNO}_2$  dan diinkubasi pada kondisi anaerob adalah gas dari oksida-oksida nitrogen yaitu  $\text{NO}$ ,  $\text{N}_2\text{O}$  dan  $\text{N}_2$ . Dengan terbentuknya gas yang terperap dalam tabung Durham, menunjukkan sampel tersebut mengandung bakteri denitrifikasi.

### Prosedur

- Masukkan 5 g atau 5 mL contoh/sampel ke dalam 45 mL air steril dan dihomogenkan.
- Buat seri pengenceran  $1x - 10^7x$  pada tabung reaksi yang telah berisi air steril
- Buat media cair nitrat dengan menimbang *Nurient broth* untuk takaran 1 L dan masukkan dalam beaker glass kapasitas 2 L, tambahkan 1,5 mg/L  $\text{KNO}_2$
- Takaran *Nutrient Broth* per L tergantung dari merk *Nutrient Broth* yang digunakan (Difco/Himedia/Merck dll) yang digunakan.
- Tambahkan akuadest secara bertahap dan diaduk menggunakan *magnetic stirer*, sampai semua larut.
- Bagi media tersebut dalam tabung reaksi, masukkan tabung durham, tutup dengan penutup silicon dan disterilisasi  $120^\circ\text{C}$ , 1 atm, selama 20 menit.
- Inokulasikan 1 mL sampel dari setiap pengenceran ke dalam tabung reaksi yang telah berisi media cair nitrat, lakukan triplo
- Inkubasi pada suhu ruang selama 3-4 minggu
- Catat semua tabung yang menunjukkan adanya gas dihasilkan (gas akan terperap dalam tabung Durham)
- Dari jumlah tabung yang positif dari setiap pengenceran akan diperoleh angka MPN
- Konversikan angka MPN dengan menggunakan Tabel MPN (Alef & Nannipieri 1995)
- Untuk sampel yang berasal dari sistem pengolahan limbah, Zinder (1984) dalam Maintinguer *et al.* (2013) telah memformulasikan media cair dengan komposisi sebagai berikut (g/L) : 0,5  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0,4  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,1  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,05  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Trace metals solution (10 ml/L): NTA (4,5 g/L);  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,556 g/L);  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (0,086 g/L);  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0,17 g/L)  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,21 g/L),  $\text{H}_3\text{BO}_3 \cdot \text{NiCl}_2$  (0,19 g/L);  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0,02 g/L). Vitamin solution (10 mL/L): *Biotin* (0,002 g/L), *Folic Acid* (0,002 g/L), *Thiamine* (0,005 g/L), *Riboflavin* (0,005 g/L), *Nicotinic Acid* (0,005 g/L), *Calcium Pantothenate* (0,005 g/L), *Pyridoxine* (0,01 g/L), Vitamin B12 (0,0001 g/L), *Lipoic Acid* (0,005 g/L) and *p-aminobenzoic acid* (0,005 g/L). Larutan bikarbonat (0,1 g/L) digunakan sebagai buffer pada

pH 7,0. Terakhir ditambahkan 0,68 g  $\text{NaNO}_3/\text{L}$  0.12 g  $\text{N-NO}_3/\text{L}$  and ethanol (1.65 g/L) untuk mencapai C: $\text{NO}_3$  ratio 3.

### Perhitungan MPN

- Catat jumlah tabung yang memberikan hasil positif dari pengenceran 1x –  $10^7$ x
- Sebagai contoh :

Pengenceran 10x			Pengenceran 100x			Pengenceran 1000x			Angka positif		
Ulangan											
I	II	III	I	II	III	I	II	III			
+	+	+	+	+	-	+	-	-	3	2	1

- Selanjutnya lihat pada Tabel MPN\* dengan 3 faktor pengenceran, dimana angka MPN untuk 3 2 1 adalah 15,00
- Angka tersebut dikalikan faktor pengenceran yang di tengah yaitu 100x, sehingga hasilnya adalah  $15 \times 100 = 1500 = 1,5 \times 10^3$  MPN/g atau ml sampel.

### Isolasi dan karakterisasi bakteri denitrifikasi (Naoki *et al.* 2003, Li *et al.* 2013)

#### Prinsip

Metode isolasi bakteri denitrifikasi aerob berdasarkan pada perubahan pH di medium yang disebabkan berkurangnya  $\text{NO}_3^-$  karena proses denitrifikasi. Media mengandung  $\text{KNO}_3$  dan BTB sebagai indikator pH. pH awal diatur 7,0-7,3. Bakteri yang terdapat pada sampel tumbuh selama masa inkubasi. Kemampuan bakteri dalam menggunakan  $\text{NO}_3^-$  diketahui dengan munculnya koloni berwarna biru atau adanya halo di sekitar koloni akibat peningkatan pH.

#### Prosedur

- Komposisi media *Bromthymol Blue* (BTB) : 0,1% L-asparagine, 0,1%  $\text{KNO}_3$ , 0,1%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  , 0,005%  $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,02%  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,1%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1 ml  $\text{L}^{-1}$  BTB (1% dalam ethanol), 2% agar ; pH 7,0 – 7,3.
- Komposisi *Screening Medium* (SM) : 0,284% *sodium succinate*, 10 mM  $\text{NaNO}_3$ , 0,136%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  , 0,027%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  , 0,1% *yeast extract*, 0,019%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,
- 1 ml  $\text{L}^{-1}$  trace element solution liter; pH 7.2
- Komposisi *Denitrification Medium* (DM) : 0,472% *sodium succinate*, 10 mM

- $\text{NaNO}_3$ , 0,15%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,042%  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,06%  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0,5% *Casamino Acid*, 0,1%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2 ml  $\text{L}^{-1}$  *trace element solution*, pH 7,2
- Komposisi Luria-Bertani medium (LB): 1% *tryptone*, 0,5% *yeast extract*, 0,5% NaCl.
  - Sebanyak 5 mL atau 5 g sampel dimasukkan dalam erlenmeyer 500 mL yang telah berisi media 200 ml SM steril, tutup dengan penutup kapas, dan diinkubasi pada suhu 30°C, selama 3 hari.
  - Suspensi bakteri yang tumbuh digores pada media BTB yang telah ditambahkan 8,5 g  $\text{L}^{-1}$  sodium succinate, dan diinkubasi pada suhu 30°C, selama 3 hari.
  - Untuk sampel tanah dapat disuspensikan dulu dalam 0,9% NaCl, kemudian digores langsung ke media MB
  - Sampel tanah juga bisa langsung diinkubasi pada media DM tanpa melalui media SM.
  - Untuk inkubasi anaerob, cawan Petri disusun dalam *Anaerobic Jar* dengan memasukkan anerocult sebagai penyerap udara.
  - Koloni yang berwarna biru yang tumbuh diinokulasikan dalam 200 mL media Luria Bertani yang telah ditambahkan 10mM  $\text{NaNO}_3$  pada tabung erlenmeyer 500 mL
  - Tabung ditutup dengan penutup karet dan diinkubasi pada 120 rpm, 30°C. Suspensi bakteri ini digunakan sebagai prekulturr.
  - Sebanyak 50ml dari prekulturr disentrifugasi dan dicuci 2 kali menggunakan 0,9% NaCl steril.
  - Pelet diinokulasikan ke dalam 100 mL media DM yang telah ditambahkan  $\text{NaNO}_3$ . Kemampuannya menghasilkan gas  $\text{N}_2$  diukur dengan fungsi waktu, menggunakan metode yang dijabarkan pada prosedur di atas.

### Daftar Pustaka

- Alef K, Nannipieri P. 1995. Enzyme activities. p 311-373. *In* K. Alef, P. Nannipieri (Eds.). *Methods in Applied Soil Microbiol.* Biochem. Academic Press, London.
- Daniel RM, Limmer AW, Steele W and Smith IM. 1982. Anaerobic growth, nitrate reduction and denitrification in 46 *Rhizobium* strains. *Journal of General Microbiology*, 128, 1811-1815
- Demanèche S, Philippot L, David MM, Navarro E, Vogel TM, Simonet P. 2009. Characterization of denitrification gene clusters of soil bacteria via a metagenomic approach. *Applied Environmental Microbiology* 75, 534-537.
- Firth JR, Edwards C. 1999. Effects of cultural conditions on denitrification by *Pseudomonas stutzeri* measured by Membrane Inlet Mass Spectrometry. *Journal of Applied Microbiology* 87, 353-358.
- Firth JR, Edwards C. 2000. Analysis of denitrification by *Pseudomonas stutzeri* under nutrient-limited conditions using membrane inlet mass spectrometry. *Journal of*

- Applied Microbiology 88, 853-859
- Firestone MK. 1982. Biological denitrification. In Stevenson FJ (Ed.), Nitrogen Agricultural Soils. Agron. Monogr. 22. American Society Agronomy, Crop Science Society of America and Soil Science Society of American, Madison, 289-326.
- Kari Lovise Bøthun. 2014. Isolation of nitrate reducing and denitrifying bacteria from high and low pH soils. Noregs miljø- og biovitenskapelige universitet Fakultet for veterinærmedisin og biovitenskap Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap.
- Maintinguer SI, Sakamoto IK, Adorno MAT, Varesche MBA. 2013. Evaluation of the microbial diversity of denitrifying bacteria in batch reactor. Brazilian Journal of Chemical Engineering vol. 30, No. 03, pp. 457 - 465, July - September, 2013. www.abeq.org.br/bjch
- O'Hara GW, Daniel RM. 1985. Rhizobial denitrification: A Review. Soil Bid. Biochem. Vol. 11, No. 1, pp. 1-9
- Pajares S, Bohannan BJM. 2016. Ecology of nitrogen-fixing, nitrifying, and denitrifying microorganisms in tropical forest soils. Frontiers in Microbiology 7: 1-20.
- Parsons LL, Murray RE, Smith MS. 1991. Soil denitrification dynamics: spatial and temporal variations of enzyme activity, populations, and nitrogen gas loss. Soil Sci. Soc. Am. J. 55:90-95.
- Robertson LA, van Niel EDWJ, Torremans RAM, Kuenen JG. 1988. Simultaneous nitrification and denitrification in aerobic chemostat of *Thiosphaera pantotropha*. Applied and Environmental Microbiology 54, 2812±2818.
- Robertson LA, Cornelisse R, De Vos P, Hadjoetomo R, Kuenen JG. 1989. Aerobic denitrification in various heterotrophic nitrifiers. Antonie Van Leeuwenhoek 56, 289-99.
- Steele KW, Bonish PM, Sarathchandra SU. 1984. Denitrification potentials and microbiological characteristics of some northern North Island soils. New Zealand Journal of Agriculture Research, vol 27 : 525-530
- Takaya N, Maria AB, Catalan S, Yasushi S, Isao K, Zhemin Z, Hirofumi. 2003. Aerobic denitrifying bacteria that produce low levels of nitrous oxide. Applied and Environmental Microbiology, June, vol. 69, no. 6, p. 3152–3157
- van Niel EWJ, Braber KJ, Robertson LA, Kuenen JG. 1992. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification in *Alcaligenes faecalis* strain TUD. Antonie Van Leeuwenhoek 62, 231-237
- Volz MG. 1977. Denitrifying Bacteria can be enumerated in nitrite broth. Soil Science Society of America Journal. Vo 4, issue 3, 549-551
- Zumft WG. 1997. Cell biology and molecular basis of denitrification. Microbiology and Molecular Biology Review 61(4): 533-616.

*Tell me what you eat, and I will tell you what you are*

Brillat-Savarin

## 2.17

## MIKROBA PELARUT KALIUM

Surono, Etty Pratiwi

Kalium adalah nutrisi tanaman penting utama, selain N dan P, yang memainkan peran penting dalam proses fisiologis dan metabolisme tanaman, serta berpengaruh pada ketahanan tanaman terhadap cekaman biotik dan abiotik (Haro & Benito 2019). Sebanyak 90-98% K di tanah berada dalam keadaan tidak dapat dipertukarkan sehingga diperlukan aktivitas mobilisasi K sehingga tersedia untuk tanaman salah satunya dengan menggunakan mikroba (Muthuraja & Muthukumar 2021). Berdasarkan berbagai hasil penelitian, mikroba pelarut K secara efektif dapat meningkatkan kelarutan K di tanah sehingga tersedia bagi tanaman (Sparks 1987). Beberapa bakteri seperti *Bacillus edaphicus*, *B. mucilaginosus*, *Acidothiobacillus ferrooxidans*, *B. circulans*, *Paenibacillus* sp. dan cendawan seperti *Aspergillus terreus* dan *Aspergillus* sp. diketahui terlibat dalam proses pelarutan mineral K dari berbagai sumber mineral K seperti ortoklas, muskovit, feldspar, biotit, mika, ilit (Hu *et al.* 2006, Meena *et al.* 2014, Mo & Lian 2011). Mekanisme yang digunakan oleh mikroba untuk pelarutan K antara lain melalui aktivitas produksi asam organik, penurunan pH tanah, asidolisis, khelasi, reaksi pertukaran, dan kompleksasi (Sattar *et al.* 2019).

Batuan beku dan batuan sedimen di tanah merupakan sumber yang kaya K. Batuan beku seperti syenites ( $\sim 54 \text{ g K kg}^{-1}$ ), granit ( $\sim 46 \text{ g K kg}^{-1}$ ) basalt ( $\sim 7 \text{ g K kg}^{-1}$ ) dan peridotit ( $\sim 2 \text{ g K kg}^{-1}$ ) memiliki kandungan K lebih tinggi daripada batuan sedimen seperti lempung serpih dan batu kapur, yang masing-masing mengandung  $30 \text{ g kg}^{-1}$  dan  $6 \text{ g kg}^{-1}$  (Malavolta 1985). Di litosfer, konsentrasi K tanah mineral berkisar antara 0,04 dan 3% (Syers 2003) dan di tanah permukaan terdapat 3000 dan 100.000  $\text{kg K ha}^{-1}$ . Dari total kandungan K ini, sebanyak 98% K berada dalam bentuk yang tidak dapat ditukar berupa mineral silikat seperti mika dan feldspar (Mohamed *et al.* 2017) dan sisanya 2% tersedia dalam larutan untuk bisa diserap tanaman (Meena *et al.* 2016).

Sumber utama K tanah (90-98% dari total K) sebagian besar berupa mineral K primer atau K struktural seperti mineral silikat yaitu, biotit, ortoklas, muskovit, feldspar, mika (bubuk mika, mika ruby, batu mika, skrap mika dan serpih mika), vermikulit, ilit dan smektit (Sparks & Huang 1985). Umumnya, K yang dapat ditukar dan tidak dapat ditukar merupakan persentase yang sangat kecil dari mineral K dalam tanah, dan kumpulan ini diasumsikan tersedia secara perlahan untuk serapan tanaman meskipun ketersediaannya tergantung pada sejumlah faktor seperti (i) pelapukan fraksi mineral K (feldspar dan mika), (ii) tingkat K di kolam lain seperti larutan, K yang dapat ditukar, K yang tidak dapat ditukar, (iii) sifat dan ukuran partikel K mineral pembawa, dan (iv) lingkungan tanah seperti Eh dan kondisi pH, sifat dan aktivitas berbagai ion dalam

larutan tanah, pembasahan, dan pengeringan, suhu (Meena *et al.* 2016).

Ketersediaan kalium untuk tanaman sangat tergantung pada jenis mineral sehubungan dengan ketersediaan hayati, dan mineral K yang paling penting adalah muskovit (mika putih)  $KAl_2(AlSi_3O_{10})(F,OH)_2$ , atau  $(KF)_2(Al_2O_3)_3(SiO_2)6(H_2O)$ , yang merupakan mineral filosilikat dari aluminium dan kalium; biotit (mika hitam)  $K(Mg,Fe)_3Al_2Si_3O_{10}(OH,F)_2$  dan ortoklas ( $KAlSi_3O_8$ ), kalium-taranakit, zeolit, vermikulit, klorit, glaukonit, ilit (Parker *et al.* 1989). Di antaranya, kelompok mika biotit dan muskovit menjadi perhatian khusus karena merupakan sumber utama dari banyak nutrisi penting seperti Mg, K, Mn dan Zn dan lebih mudah larut daripada mineral lainnya (Sugumaran & Janarthanam 2007). Jadi, di tanah dengan mineral campuran, seperti di Pakistan di mana sekitar 57% dari K teraplikasi adalah tetap, transformasi K sangat kompleks (Pal *et al.* 1999) karena pH tinggi, adanya interlayer K dari mineral lempung yang tidak mengembang, seperti vermikulit  $(Mg, Fe^{++}, Al)_3(Al, Si)_4O_{10}(OH)_2(4H_2O)$  dan ilit  $(K, H_3O)(Al, Mg, Fe)_2(Si, Al)_4O_{10}[(OH)_2, (H_2O)]$  (Goulding 1987). Namun, bioavailabilitas K di kolam yang berbeda mengikuti urutan solusi > dapat ditukar > tetap > mineral (Sparks 2000).

### **Mekanisme Pelarutan Kalium oleh Mikroba Pelarut K**

Informasi yang tersedia tentang pelarutan K oleh mikroba tanah (bakteri dan cendawan) tergolong masih sedikit. Namun, laporan yang tersedia menunjukkan bahwa mikroba ini mengadopsi mekanisme khusus untuk mineralisasi batuan K yang mungkin termasuk reaksi redoks dengan produksi molekul pengkelat dan asam organik untuk pelapukan K (Gambar 1) (Sattar *et al.* 2019).

#### **(1) Pelarutan K oleh Bakteri**

Bakteri memainkan peran penting dalam pelarutan mineral K, dan secara luas dikenal sebagai bakteri pelarut kalium. Pelarutan K oleh bakteri meliputi (i) cara pelarutan langsung, (ii) cara pelarutan tidak langsung, (iii) sekresi polisakarida, dan (iv) pembentukan biofilm pada permukaan mineral.

#### **Metode Pelarutan Langsung**

Mikroba membantu dalam pelarutan K melalui (i) produksi asam organik yang kuat (ii) asidolisis rizosfer (Gerke 1992) mineral, dan (iii) pelapukan kimia berbasis asam karbonat (Gadd 2007).

Mikroba mengeluarkan asam organik seperti asam oksalat, tartarat dan sitrat (Rajawat *et al.* 2016) dan ion  $H^+$  (Gambar 2), yang menurunkan pH tanah di sekitarnya (Bennett *et al.* 1998). Eksudasi asam organik merupakan mekanisme penting dari mineral K (mika, biotit, muskovit, feldspar, ilit, dan ortoklas) (Basak *et al.* 2016) pelarutan melalui pengasaman dan protonasi yang dimediasi mikroba menjadi bentuk yang tersedia untuk tanaman.

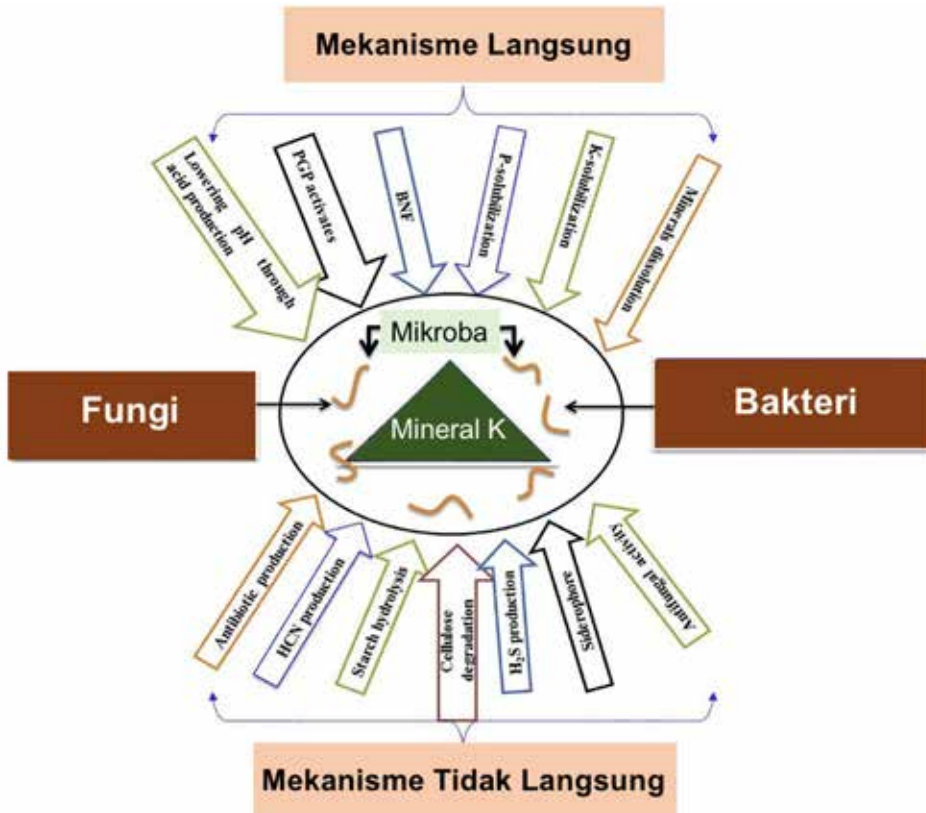


Gambar 1. Mekanisme pelarutan kalium oleh mikroba pelarut K (Sumber: Sattar et al. 2019 yang dimodifikasi)

Beberapa asam organik yang umumnya dilepaskan oleh mikroba dan berperan dalam proses pelarutan K disajikan pada Tabel 1. Molekul asam organik mempengaruhi pelapukan mineral melalui tiga tahap, yaitu: (i) asam melekat pada mineral permukaan dan ekstrak nutrisi dari partikel mineral dengan reaksi transfer elektron; (ii) memutuskan ikatan oksigen, dan (iii) kelat hadir dalam larutan melalui gugus karboksil dan hidroksilnya.

Tabel 1. Daftar mineral yang mengandung kalium (Sattar et al. 2019)

Minerals	Chemical formula	K <sub>2</sub> O (%)
<i>Sylvite</i>	KCl	63.09
<i>Kalsilite</i>	KAISiO <sub>4</sub>	29.75
<i>Langbeinite</i>	2MgSO <sub>4</sub> ·K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	22.71
<i>Leucite</i>	KAISi <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	21.56
<i>Kainite</i>	KMgSO <sub>4</sub> Cl·3H <sub>2</sub> O	18.91
<i>Carnallite</i>	MgCl <sub>2</sub> ·KCl·6H <sub>2</sub> O	16.94
<i>Potassium feldspar</i>	KAISi <sub>3</sub> O <sub>8</sub>	16.91
<i>Nepheline</i>	(Na,K)AISiO <sub>4</sub>	15.67
<i>Phlogopite</i>	K <sub>2</sub> Mg <sub>6</sub> Si <sub>6</sub> Al <sub>2</sub> O <sub>20</sub> (OH) <sub>4</sub>	11.30
<i>Muscovite</i>	KAl <sub>3</sub> Si <sub>3</sub> O <sub>10</sub> (OH) <sub>2</sub>	10.88
<i>Biotite</i>	K <sub>2</sub> Fe <sub>6</sub> Si <sub>6</sub> Al <sub>2</sub> O <sub>20</sub> (OH) <sub>4</sub>	09.18



Gambar 2. Mekanisme langsung dan mekanisme tidak langsung dalam meningkatkan kelarutan kalium oleh mikroba pelarut K (Sumber: Sattar et al. 2019 yang dimodifikasi)

### Metode Pelarutan Tidak Langsung

Selain asidolisis atau penurunan pH, mikroba juga melarutkan mineral K melalui metode pelarutan tidak langsung seperti (i) khelasi kation yang terikat pada K silikat, (ii) reaksi pertukaran, (iii) pelarutan dengan pelekatan langsung MPK pada permukaan mineral (Gambar 1 dan 2), (iv) ligan pengompleks logam, dan (iv) pelepasan fitohormon melalui mikroba.

Kemampuan mengkelat asam organik merupakan mekanisme penting dalam melarutkan mineral K (Meena et al. 2015). Khelasi adalah metode tidak langsung pelarutan K dari mineral terikat K (Gambar 2). MPK yang efisien ini juga memiliki kemampuan pelapukan mineral melalui proses pelarutan asam. KSM membentuk kompleks logam-organik dengan ion Al dan Si yang terkait dengan K-mineral, dan sebagai hasilnya, ion K dilepaskan dalam larutan (Romheld & Kirkby 2010).

Ligan pengompleks logam adalah cara potensial lain untuk melarutkan K melalui mikroba. Mikroba yang efisien, selain asam organik, memancarkan ligan dan polimer organik berbobot molekul tinggi seperti asam guluronat, asam mannuronat, dan alginat, yang membentuk kompleks dengan ion pada permukaan mineral untuk melemahkan ikatan logam-oksigen (Basak *et al.* 2016). Di sisi lain, ligan dapat membentuk kompleks dengan ion dalam larutan dan secara langsung mempengaruhi keadaan saturasi larutan. Selanjutnya, polimer ini dapat mempercepat difusi ion dari permukaan mineral dengan menghasilkan lapisan lendir yang mengandung polisakarida dan enzim di sekitar permukaan mineral. Proses ini dapat mengakibatkan peningkatan kontak antara permukaan mineral dan air (Meena *et al.* 2013) dan meningkatkan kelarutan sejumlah mineral. Polisakarida yang diproduksi mikroba ini mengandung gugus fungsi (eCOOe) yang membentuk kompleks dengan ion mineral, mengubah keadaan saturasi larutan dan dengan demikian meningkatkan mobilisasi (Sheng *et al.* 2002). Selain itu, eksudat mikroba ini (senyawa organik dengan berat molekul rendah) mengandung produk sampingan dari proses metabolisme, ligan organik, kelat, dan enzim ekstraseluler, yang membantu pelarutan mineral K (Malinovskaya *et al.* 1990) melalui manipulasi pH lingkungan mikro (Welch *et al.* 2002).

### **Sekresi Polisakarida**

Meskipun mekanisme pelepasan K dari mineral silikat adalah kompleks; mikroba mengadopsi banyak cara yang berbeda untuk memobilisasi K dalam tanah. Kapsul eksopolisakarida (EPS) adalah cara lain bakteri melarutkan mineral K. EPS yang diproduksi mikroba ini teradsorpsi kuat oleh asam organik, dan dengan demikian meningkatkan pelekatan pada permukaan mineral yang menghasilkan konsentrasi asam organik yang tinggi pada atau di sekitar mineral (Liu *et al.* 2012).

Mikroba seperti *Bacillus*, *Clostridium* dan *Thiobacillus* dengan kapasitas untuk mensekresi zat antara metabolik atau kapsul mucilaginous yang mengandung EPS menunjukkan biodegradasi feldspar dan illite yang lebih tinggi untuk melepaskan K<sup>+</sup> (Sheng & He 2006). EPS mikroba dengan kandungan protein tinggi (Du *et al.* 2008) merangsang pembentukan kompleks bakteri-mineral di mana mikroba mengeluarkan asam organik dan pH rendah yang dihasilkan meningkatkan kelarutan mineral K dan bioavailabilitas K. Selain itu, EPS juga memiliki kemampuan yang kuat untuk mengadsorpsi asam organik (Lian 1998). EPS mengikat K<sup>+</sup> dan SiO<sub>2</sub> yang membantu menjaga keseimbangan antara larutan tanah dan mineral yang pada akhirnya meningkatkan pelepasan dan keteersediaan K<sup>+</sup> (Lian *et al.* 2002).

### **Pembentukan Biofilm**

Pembentukan biofilm adalah mekanisme mobilisasi cadangan K yang potensial tetapi paling jarang dipelajari. Biofilm adalah langkah paling awal dalam interaksi mikroba-tanaman di mana sel-sel bakteri menempel pada permukaan abiotik/biotik. Dalam biofilm, sel-sel difiksasi dalam matriks polimer ekstraseluler yang diproduksi

oleh mikroba.

Strain mikroba tertentu membentuk biofilm pada permukaan mineral rizosfer melepaskan asam organik, metabolit yang menurunkan pH yang berperan dalam pelarutan dan penyerapan mineral K oleh tanaman (Balogh-Brunstad *et al.* 2008). Komunitas mikroba terkonsentrasi pada antarmuka akar-hifa-mineral, yang dilindungi oleh polimer ekstraseluler. Polimer eksopolisakarida yang dikeluarkan oleh mikroba ini berfungsi sebagai katalis dan membantu dalam mobilisasi nutrisi dari struktur mineral yang kompleks, melindungi mikroba dari logam berat, antibiotik, kation lain, nutrisi, dan patogen.

## (2) Pelarutan K oleh Cendawan

Peran cendawan dalam pelarutan K lebih menonjol melalui produksi asam organik dan penyerapan melalui sistem akar. Beberapa cendawan seperti *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, dan *Aspergillus niger* memainkan peran penting dalam pelarutan dan penyerapan K. Cendawani menghasilkan asam organik, terutama asam oksalat, sitrat dan glukonat yang mirip dengan rhizobakteri, yang menyebabkan pelapukan silikat tanah liat, mika, dan feldspar (Vassileva *et al.* 2000).

Asam oksalat menyebabkan pelarutan feldspar (Hu *et al.* 2006), sedangkan asam tartarat dan oksalat terlibat dalam memobilisasi illite dan glukonat, dan mempercepat pelapukan albite, kuarsa dan kaolinit (Argelis *et al.* 1993). Selain itu, fungsi memineralisasi K melalui reaksi pengkelat elemen mineral, hidrolisis asam, dan sekresi makromolekul dan polimer yang tidak larut yang berperan penting dalam pelepasan K dari mineral K (Lian *et al.* 2008).

## Isolasi dan Seleksi Mikroba Pelarut K (Patel & Patel 2022)

Untuk mendapatkan mikroba pelarut K, baik dari kelompok bakteri maupun fungi, perlu dilakukan proses isolasi dari berbagai sumber seperti tanah rizosfer atau batuan yang selanjutnya diseleksi untuk mendapatkan mikroba pelarut K yang paling potensial untuk penggunaan selanjutnya pada interaksi dengan tanah dan tanaman. Secara umum isolasi mikroba pelarut K menggunakan media Aleksandrov.

### Bahan

- Sumber mineral K (feldspar, mika, illit, kalium aluminium silikat, muskovit, atau biotit) untuk ditambahkan ke dalam media agar Aleksandrov.
- Media Aleksandrov dengan komposisi: 0,5% glukosa, 0,05%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,0006%  $FeCl_3$ , 0,06%  $CaCO_3$ , 0,2%  $CaPO_4$ , 3% agar, pewarna merah fenol sebagai indikator. Lalu tambahkan sumber K dengan kisaran 0,2–1%, dan akuades yang disesuaikan dengan berapa volume media yang akan dibuat. pH diatur pada pH 7.

- Agar nutrisi padat: ekstrak daging sapi 0,3%, pepton 0,5%, agar-agar 18%, pH 7,0–7,5.

### Prosedur

- Kumpulkan sampel tanah secara aseptik dalam kantong Ziploc steril untuk meminimalkan kemungkinan kontaminasi mikroba eksogen. Gunakan segera atau disimpan pada lemari pendingin dengan suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  untuk analisis lanjutan.
- Ambil 1 g contoh tanah dan masukkan ke dalam 10 ml akuades steril. Kocok selama 30 menit dan biarkan selama 30 menit agar partikel tanah yang besar mengendap. Gunakan supernatan untuk isolasi mikroba.
- Encerkan secara serial hingga enam kali lipat hingga sepuluh kali lipat dan inokulasi/sebarkan pada media agar Aleksandrov/media agar nutrisi yang dilengkapi dengan sumber K dan inkubasikan cawan pada suhu  $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$  sampai munculnya koloni.
- Pilih isolat berdasarkan zona bening yang terbentuk di sekitar koloni kemudian murnikan di media Aleksandrov untuk konfirmasi ulang kemampuannya dalam melarutkan K.
- Seleksi secara kualitatif dilakukan dengan menghitung indeks pelarutan dengan membandingkan diameter pertumbuhan koloni dengan zona bening yang dihasilkan dengan formula penghitungan sebagai berikut:  
Indeks Pelarutan:  $\text{Diameter zona bening (cm)} / \text{Dimater koloni isolat (cm)}$
- Isolat yang terpilih dengan indeks kelarutan yang tinggi ditumbuhkan di media nutrient agar untuk bakteri dan media *potato dextrose agar* untuk fungi, untuk pengujian selanjutnya baik dalam kemampuannya melarutkan K dari berbagai sumber K maupun dalam memacu pertumbuhan tanaman.

### Catatan:

- Pengayaan: Campurkan sampel tanah yang terkumpul dengan bubuk mika dan simpan pada suhu kamar selama 1 minggu. Ambil 1 g sampel tanah dan inokulasikan dalam 90 ml media cair yang mengandung glukosa 0,95%, ekstrak ragi 0,045% dan 0,45% mika atau substrat yang kaya K. Volume akhir dibuat menjadi 100 mL dan diinkubasi pada suhu kamar dengan kecepatan 120 rpm selama 7 hari (Verma & Patidar 2016).
- Gunakan air steril deionisasi untuk menyiapkan media.

## Pengujian Pelarutan Kalium oleh Mikroba Pelarut K

Isolat bakteri atau cendawan ditumbuhkan pada 100 mL media Aleksandrov cair yang ditambahkan kalium sebanyak 1%, dengan pH 6,5 dan diinkubasi pada suhu 30°C sambil digoyang di *shaker* dengan kecepatan 120 rpm selama 7 hari menggunakan sumber kalium feldspar. Selama masa inkubasi 7 hari, dilakukan penghitungan kalium yang dilepaskan menggunakan SSA yang mengacu pada Buku Petunjuk Teknis Analisis Kimia Tanah, Tanaman, Air, dan Pupuk (Balai Penelitian Tanah 2009) dengan membuat kurva pelarutan K untuk menyeleksi mikroba pelarut K yang mempunyai kemampuan terbaik di antara isolat yang diujikan.

## Daftar Pustaka

- Argelis DT, Gonzala DA, Vizcaino C, Gartia MT. 1993. Biochemical mechanism of stone alteration carried out by filamentous fungi living in monuments. *Biogeo. Chem.* 19, 129–147.
- Balogh-Brunstad Z, Keller CK, Gill RA, Bormann BT, Li CY. 2008. The effect of bacteria and fungi on chemical weathering and chemical denudation fluxes in pine growth experiments. *Biogeochemistry* 88, 153–167.
- Basak BB, Sarkar B, Biswas DR, Sarkar S, Sanderson P, Naidu R. 2016. Bio-in-tervention of naturally occurring silicate minerals for alternative source of potassium: challenges and opportunities. *Adv. Agron.* 141, 115–145.
- Bennett PC, Choi WJ, Rogera JR. 1998. Microbial destruction of feldspars. *Mineral Manage.* 8, 149–150.
- Du Y, Zhou XY, Lian B. 2008. The extracellular secretion of *Bacillus mucilaginosus* and its capability of releasing potassium from potassium-bearing minerals. *Earth Sci. Front.* 15, 107–111.
- Gadd GM. 2007. Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. *Mycol. Res.* 11 (1), 3–49.
- Gerke L. 1992. Phosphate, aluminium and iron in the soil solution of three different soils in relation to varying concentrations of citric acid. doi.org/10.1002/jpln.
- Goulding KWT. 1987. Potassium fixation and release. *Proceedings of the colloquium of the international Potash Institute.* 10, 131–136.
- Goulding KWT, Talibudeen O. 1979. Potassium reserves in a sandy clay soil from the Saxmundhum experiment: kinetics and equilibrium thermodynamics. *J. Soil Sci.* 30, 291–302.
- Haro R, Benito B. (2019). The role of soil fungi in K+ plant nutrition. *Int. J. Mol. Sci.* 20:3169. doi: 10.3390/ijms20133169
- Hu X, Chen J, Guo J. 2006. Two phosphate and potassium-solubilizing bacteria isolated from Tianmu Mountain, Zhejiang, China. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 22, 983–990.
- Lian B, Fu PQ, Mo DM, Liu CQ. 2002. A comprehensive review of the mechanism of potassium release by silicate bacteria. *Acta Mineral. Sin.* 22, 179–182.

- Lian B, Wang B, Pan M, Liu C, Teng HH. 2008. Microbial release of potassium from K-bearing minerals by thermophilic fungus *Aspergillus fumigatus*. *Geochem. Cosmochim. Acta* 72, 87–98.
- Liu D, Lian B, Dong H. 2012. Isolation of *Paenibacillus* sp. and assessment of its potential for enhancing mineral weathering. *Geomicrobiol. J.* 29, 413–421.
- Malavolta E. 1985. Potassium status of tropical and subtropical region soils. In Munson, RD. (Ed.), *Potassium in Agriculture*. American Society of Agronomy, Madison, WI, pp. 163–200.
- Malinovskaya IM, Kosenko LV, Votselko SK, Podgorskii VS. 1990. Role of *Bacillus mucilaginosus* polysaccharide in degradation of silicate minerals. *Mikrobiologiya* 59, 49–55.
- Meena OP, Maurya BR, Meena VS. 2013. Influence of K-solubilizing bacteria on release of potassium from waste mica. *Agri. Sustain. Dev.* 1 (1), 53–56.
- Meena VS, Maurya BR, Verma JP. 2014. Does a rhizospheric microorganism enhance K<sup>+</sup> availability in agricultural soils? *Microbiol. Res.* 169, 337–347.
- Meena VS, Maurya BR, Verma JP, Meena RS. 2016. *Potassium Solubilizing Microorganisms for Sustainable Agriculture*. Springer India.
- Meena VS, Maurya RB, Verma JP, Aeron A, Kumar A, Kim K, Bajpai VK. 2015. Potassium solubilizing rhizobacteria (KSR): isolation, identification, and K-release dynamics from waste mica. *Ecol. Eng.* 81, 340–347.
- Mo BB, Lian B. 2011. Hg (II) adsorption by *Bacillus mucilaginosus*: mechanism and equilibrium parameters. *World J. Microbiol Biotechnol* 27:1063–1070.
- Mohamed HM, El-Homasy RF, Abd-Ellatef AH, Salh FM, Hussein MY. 2017. Identification of yeast strains isolated from agricultural soils for releasing potassium-bearing minerals. *Geomicrobiol. J.* 34 (3), 261–266.
- Muthuraja R, Muthukumar T. 2021. Isolation and characterization of potassium solubilizing *Aspergillus* species isolated from saxum habitats and their effect on maize growth in different soil types. *Geomicrobiology Journal*. 38. 10.1080/01490451.2021.1928800.
- Pal Y, Wong MTF, Gilkes RI. 1999. The forms of potassium and potassium adsorption in some virgin soils from South-Western Australia. *Aust. J. Soil Res.* 37, 695–709.
- Parker DR, Hendricks GJ, Sparks DL. 1989. Potassium in Atlantic Coastal Plain soils: II. Crop responses and changes in soil potassium under intensive management. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 53, 397–401.
- Rajawat, M.V.S., S. Singh, G. Singh, & A.K. Saxena. 2012. Isolation and characterization of K-solubilizing bacteria isolated from different rhizospheric soil. In: *Proceeding of 53rd Annual Conference of Association of Microbiologists of India*. p. 124.
- Rajawat MVS, Singh S, Tyagi SP, Saxena AK. 2016. A modified plate assay for rapid screening of potassium-solubilizing bacteria. *Pedosphere* 26 (5), 768–773.
- Romheld V, Kirkby EA. 2010. Research on potassium in agriculture: needs and prospects. *Plant Soil*. 335, 155–180.
- Sattar A, Naveed M, Ali M, Zahir ZA, Nadeem SM, Yaseen M. 2019. Perspectives of potassium solubilizing microbes in sustainable food production system: a review. *Appl. Soil Ecol.* 133, 146–159. doi: 10.1016/j.apsoil.2018.09.012

- Sheng XF, He LY. 2006. Solubilization of potassium bearing minerals by a wild type strain of *Bacillus edaphicus* and its mutants and increased potassium uptake by wheat. *Can. J. Microbiol.* 52, 66–72.
- Sheng XF, He LY, Huang WY. 2002. The conditions of releasing potassium by a silicate-dissolving bacterial strain NBT. *Agric. Sci. China* 1, 662–666.
- Sparks DL. 1987. Potassium dynamics in soils. *Adv. Soil Sci.* 6, 1–63.
- Sparks DL. 2000. Bioavailability of soil potassium, D-38-D-52. *In* Sumner ME(Ed.) *Handbook of Soil Science*, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Sugumaran P, Janarthanam B. 2007. Solubilization of potassium containing minerals by bacteria and their effect on plant growth. *World J Agric Sci* 3:350–355
- Syers JK., 2003. Potassium in soils: current concepts. *In* Johnston AE. (Ed.), *Proceedings of the IPI Golden Jubilee Congress 1952–2002 held at Basel Switzerland 8–10 October 2002. Feed the soil to feed the people. The role of potash in sustainable agriculture.* International Potash Institute, Basel, pp. 301–310.
- Vassileva M, Azcon R, Barea J, Vassilev N. 2000. Rock phosphate solubilization by free and encapsulated cells of *Yarrowia lipolytica*. *Proc. Biochem.* 35, 693–697.
- Welch SA, Taunton AE, Banfield JF. 2002. Effect of microorganisms and microbial metabolites on apatite dissolution. *Geophys. J. Roy. Astron. Soc.* 19, 343–367.
- White, A.F., 2003. Natural weathering rates of silicate minerals. *Treatise Geochem.* 5, 133–168.

## 2.18

## BAKTERI KOLIFORM

Selly Salma, Erny Yuniarti

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 Enterobacteriaceae. Spesies yang disebutkan terakhir merupakan spesies yang keberadaannya paling tinggi (Leclerc *et al.* 1981 dalam Alonso *et al.* 1999). Knowles (1982) mengisolasi koliform seperti *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Erwinia*, dan *Escherichia coli* dari tanah yang dimanfaatkan sebagai pupuk hayati karena kemampuannya menambat  $\text{N}_2$  dari udara. Namun demikian, dalam standar mutu pupuk organik dan hayati yang dituangkan dalam Kepementan 261/2019 mensyaratkan bahwa pupuk organik dan pupuk hayati tidak boleh mengandung *E.coli* dan *Salmonella* sp yang merupakan patogen manusia yang cukup membahayakan.

Penggunaan pupuk kandang atau kompos yang tidak matang yang berasal dari limbah peternakan 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.

Sayuran yang dapat dikonsumsi dalam keadaan segar seperti tomat, cabai, bawang merah, selada, sawi, ketimun, seledri, daun kemangi, dan bawang bombay,

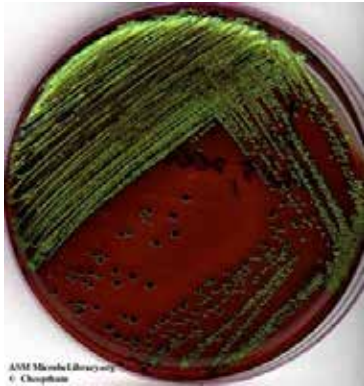
dapat dimasukkan ke dalam hidangan segar seperti salad atau dikonsumsi sebagai lalapan. Namun, jumlah wabah penyakit yang dibawa melalui makanan mentah yang terkait dengan produk segar meningkat cukup nyata. *E. coli* menjadi patogen paling umum ditemui, yang dapat menyebabkan diare, kolitis hemoragik, sindrom uremik hemolitik, dan indikasi lainnya pada manusia. Sayuran dapat terkontaminasi *E. coli* kapan saja mulai dari pra hingga pascapanen. Bakteri ini mampu bertahan dalam banyak kondisi lingkungan dengan berbagai mekanisme, seperti adhesi ke permukaan dan internalisasi dalam produk segar. Sementara metode pengolahan konvensional dan sanitasi kimia tidak diperbolehkan digunakan pada industri makanan (Guevara et al. 2019)

### Enumerasi *E. coli*

Penetapan jumlah populasi *E. coli* dilakukan dengan 3 tahap seperti yang tertera pada Tabel di bawah ini (Anthony et al. 2001):

Tahapan Pengujian	Media, suhu dan waktu inkubasi	Hasil		Keterangan
		Positif	Negatif	
Tahap 1 : <i>Presumptive test</i> (uji penduga)	LSTB ( <i>Lauryl Sulfat Tryptose Broth</i> ) ; durham ; 35°C, 24jam	Gas + Media Keruh	Gas – Media Bening	Semua <i>faecal contamination</i>
Tahap 2 : <i>Confirmation test</i> (Uji penguat)	BGLB ( <i>Brilliant Green Lactose Bile Broth</i> ); durham; 35°C, 24jam	Gas + keruh	Gas – Bening	Total coliform ( <i>Escherichia, Enterobacter, Klebsiella, Serratia, Citrobacter, Proteus</i> )
Tahap 3 : <i>Completed Test</i> (Uji pelengkap)	EMBA ( <i>Eosin Methylene Blue Agar</i> ), 35°C, 48jam	Hijau metalik	Warna lain	Postitif: <i>E.coli</i>

Apabila pengujian dilakukan hanya sampai tahap MPN durham saja dan tidak dilanjutkan sampai pada uji pelengkap, maka dapat dipastikan jumlah populasi yang terukur adalah total coliform, bukan *E. coli* saja. Bakteri Coliform terdiri dari genus *Escherichia, Enterobacter, Klebsiella, Serratia, Citrobacter, and Proteus* dalam satu famili Enterobacteriaceae yang dapat memfermentasi lactose. *Eosin-Methylene Blue* agar (EMB) adalah media selektif untuk bakteri Gram negatif, dimana pertumbuhan *E. coli* ditandai dengan adanya warna hijau metalik pada koloninya



*E.coli* pada media EMB agar



*E.aerogenes* pada media EMB agar

Gambar 1. Performa koloni *E.coli* (kiri) dan *E.aerogenes* (kanan) pada media agar EMB (Gambar diunduh dari ASM MicrobeLibrary.org)

### Enumerasi *Salmonella* sp (EPA, 2006 & Anthony *et al.* 2001)

Pengujian *Salmonella* sp tidak dilakukan dengan menggunakan tabung durham, karena selama pertumbuhannya *Salmonella* sp tidak menghasilkan gas sebagaimana *E. coli*. Media pengayaan selektif untuk *Salmonella typhi* dan *Salmonella* spp lainnya yang direkomendasikan oleh American Public Health Association adalah media Tetrathionate (TTB). Bakteri yang mereduksi Tetrathionate, seperti Salmonellae, akan berproliferasi pada medium tersebut, sedangkan bakteri enterik lain akan terhambat pertumbuhannya. Beberapa jenis dari genus *Proteus* juga mereduksi Tetrathionate, sehingga pengujian harus dilanjutkan dengan uji pelengkap pada media selektif adalah SS (*Salmonella Shigella*) agar, Hektoen Enteric Agar (HEA), Bismuth Sulfite agar, Brilliant Green agar, dan Xylose-Lisine-Deoxycholate (XLD) agar.

Uji pelengkap yang disajikan pada buku ini menggunakan media SS agar, yang merupakan media selektif diferensial untuk *Salmonella* dan *Shigella*. Pertumbuhan *Salmonella* sp ditandai dengan koloni yang berwarna hitam karena adanya H<sub>2</sub>S yang dihasilkan, sedangkan *Shigella* sp tidak menghasilkan H<sub>2</sub>S.

#### Alat

- Cawan Petri steril
- Mikropipet 1 mL
- Mikropipet 200 µL
- Mikrotip 1 mL
- Mikrotip 200 µL
- Erlenmeyer 250 mL
- Tabung reaksi

- Inkubator
- Neraca Analitik ketelitian 2 desimal
- Autoklaf
- Pembakar bunsen
- pH Meter
- *Laminar Air Flow*
- *Vortex*
- Tabung Durham

### **Bahan**

- *Lactose Broth* (LB)
- *Tetrathionate Broth* (TTB)
- *Salmonella Shigella* (SS) agar
- *Pepton Buffer 0.1%*
- *Lauryl Sulfat Tryptose Broth* (LSTB)
- *Eosin Methylen Blue agar* (EMB)
- Contoh pupuk 5 gram atau 5 mL

### **Prosedur**

#### 1. Pembuatan media

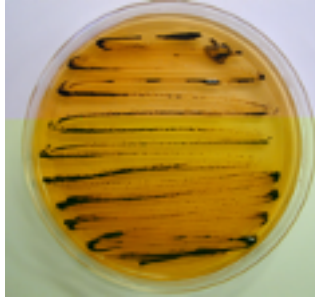
- Media *Lactose Broth*
  - Timbang 13 g *Lactose Broth* dan masukkan dalam beaker glass
  - Tambahkan 1 L aquadest secara bertahap
  - Homogenkan pada magnenic stirer
  - Masukkan sebanyak 45 ml dalam botol selai, tutup
  - Sterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C, 1 atm selama 20 menit
  - Setelah media tersebut dingin, Media telah siap untuk digunakan
- Media *Tetrathionate Broth*
  - Timbang 77 g TTB dan masukkan ke dalam beaker glass
  - Tambahkan 1 L aquadest secara bertahap
  - Homogenkan pada *magnenic stirer*
  - Masukkan sebanyak 9 ml dalam tabung reaksi, tutup
  - Sterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C, 1 atm selama 20 menit
  - Setelah media tersebut dingin, Media telah siap untuk digunakan
- Media *Lauryl Sulfat Tryptose Broth*
  - Timbang 35,0 g LSTB dan masukkan ke dalam beaker glass
  - Tambahkan 1 L aquadest secara bertahap
  - Homogenkan pada *magnenic stirer*
  - Masukkan sebanyak 9 ml dalam tabung reaksi, masukkan tabung Durham,

tutup

- Sterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C, 1 atm selama 20 menit
- Setelah media tersebut dingin, Media telah siap untuk digunakan
- Media *Eosin Methylen Blue Agar*
  - Timbang 37,5 g EMB agar masukkan ke dalam beaker glass
  - Tambahkan 1 L aquadest secara bertahap
  - Homogenkan pada *magnenic stirer*
  - Sterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C, 1 atm selama 20 menit
  - Tuang ke dalam cawan petri steril secara aseptis
  - Untuk 1 L media didistribusikan merata pada 45-50 cawan Petri
  - Setelah media tersebut dingin, maka cawan dibalik dan disimpan pada suhu kamar selama 24 jam
- Media *Salmonella Shigella (SS) agar*
  - Timbang 63,0 g SS agar dan masukkan ke dalam beaker glass
  - Tambahkan 1 L aquadest secara bertahap
  - Homogenkan pada *magnenic stirer*
  - Sterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C, 1 atm selama 20 menit
  - Tuang ke dalam cawan petri steril secara aseptis
  - Untuk 1 L media didistribusikan merata pada 45-50 cawan Petri
  - Setelah media tersebut dingin, maka cawan dibalik dan disimpan pada suhu kamar selama 24 jam

### **Enumerasi *Salmonella* sp menggunakan metode MPN**

- Masukkan 5 g atau 5 mL contoh/sampel ke dalam 45 mL media LB dan inkubasi pada suhu ruang selama 1 jam.
- Atur pH menjadi 6.8 + 0.2
- Inkubasi pada suhu 35°-37° C selama 24 jam
- Ambil 1 ml dan buat seri pengenceran 1x, 10x, 100x pada media TTB, triplo
- Inkubasi pada suhu 35°-37° C selama 24 jam + 2 jam
- Amati pertumbuhan bakteri yang dilihat dari kekeruhan media TTB
- Apabila TTB menjadi keruh maka hasilnya positif, demikian halnya apabila media TTB tetap bening maka hasilnya negatif
- Selanjutnya tabung-tabung yang positif dilanjutkan dengan uji pelengkap pada media spesifik SS agar dengan cara menggoreskan pada media tsb secara kwadran
- Inkubasi pada suhu 35°-37° C selama 48 jam
- Amati pertumbuhan koloni *Salmonella* sp yang berwarna hitam pada media tersebut, seperti pada gambar di bawah ini



Gambar 2. Koloni *Salmonella* yang tumbuh pada media agar SS

- Tabung-tabung positif yang tidak menghasilkan pertumbuhan kultur *Salmonella* sp maka dinilai sebagai negatif
- Konversikan nilai positif dan negatif tersebut ke dalam angka MPN melalui tabel MPN.
- Lakukan penghitungan nilai MPN per gram atau ml sampel

### Enumerasi *E coli* menggunakan metode MPN

- Masukkan 5 gram atau 5 mL contoh ke dalam 45 ml *Pepton Buffer* dan dihomogenisasi
- Buat seri pengenceran 1x – 100x dengan menggunakan air steril
- Inokulasikan sebanyak 1 mL dari setiap seri pengenceran ke dalam 9 mL media LSTB dalam tabung reaksi dengan tabung Durham, triplo
- Inkubasi pada suhu 35°-37°C selama 24-48 jam
- Amati kekeruhan dan pembentukan gas pada tabung tersebut
- Apabila media LSTB menjadi keruh dan terbentuk gas maka hasilnya positif, demikian halnya apabila media tidak keruh dan atau tidak terbentuk gas maka hasilnya negatif
- Selanjutnya tabung-tabung yang positif dilanjutkan dengan uji pelengkap pada media spesifik EMB agar, dengan cara menggosokkan 1 ose kultur yang telah tumbuh pada media LSTB, secara kwadran
- Inkubasi pada suhu 35°-37° C selama 24 jam
- Amati pertumbuhan koloni *E.coli* yang berwarna hijau metalik pada media EMB, seperti pada Gambar di atas.
- Tabung-tabung positif yang tidak menghasilkan pertumbuhan kultur *E coli* pada media EMB maka dinilai sebagai negatif
- Konversikan nilai positif dan negatif tersebut ke dalam angka MPN melalui tabel MPN.
- Lakukan penghitungan nilai MPN per gram atau ml sampel

### Perhitungan MPN

- Catat jumlah tabung yang memberikan hasil positif dari pengenceran 1x, 10x dan 100x, triplo
- Sebagai contoh :

Pengenceran 10x			Pengenceran 100x			Pengenceran 1000x			Angka positif		
Ulangan											
I	II	III	I	II	III	I	II	III			
+	+	+	+	+	-	+	-	-	3	2	1

- Selanjutnya lihat pada tabel MPN dengan 3 faktor pengenceran, dimana angka MPN untuk 3 2 1 adalah 15,00
- Angka tersebut dikalikan faktor pengenceran yang di tengah yaitu 10x, sehingga hasilnya adalah  $15 \times 10 = 150 = 1,5 \times 10^2$  MPN/g atau ml sampel

Tabel MPN yang digunakan dari buku *Methods in applied soil Biology and Biochemistry*, 1995, hal. 154-158.

### Daftar Pustaka

- Alef K, Nannipieri P. 1993. *Methods in applied soil Biology and Biochemistry*. Academic Press
- Alonso JL, Soriano A, Carbajo O, Amoros I, Garelick H. 1999. Comparison and recovery of *Escherichia coli* and thermotolerant coliform in water with a chromogenic medium incubated at 41 and 44,5°C. *Appl. Microbiol. Environ* 65(8): 3746-3749.
- Anthony DH. 2001. Enumeration of *Escherichia coli* and the coliform bacteria. *In* Bacteriological Analytical Manual. Chapter 4. Food Drug Administration Atlas RM. 2000. Handbook of Microbiological Media. Academic Press
- Environment Protection Agency. 2006. United State Environmental Protection Agency.
- Knowles R. 1982. Free-living dinitrogen-fixing bacteria. p 1071-1091. *In* Page AL, Miller RH, Keeney DR (Eds.) *Methods of Soil Analysis*. Part 2. Chemical and Microbiological Properties. American Society of Agronomy, Inc
- Lynch JM. Poole NJ. 1979. Water pollution and its prevention. p 226-245. *In* Microbial Ecology: A Conceptual Approach. Blackwell scientific Publication. Oxford.
- Luna-Guevara JJ, Arenas-Hernandez MMP, Martínez de la Peña C, Silva JL. 2019. The Role of Pathogenic *E. Coli* in Fresh Vegetables: Behavior, Contamination Factors, and Preventive Measures. *International Journal of Microbiology*. Published 26 November 2019.

Microbiology of food and animal feeding stuffs—horizontal method for the detection of Salmonella (EN ISO 6579:2002). International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland. 2002

Raymundo AK, Zamora AF, Dalmacio IF. 1991. Manual on Microbiological Techniques. Technology and Livelihood Resources Centre.

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  $10^3 \text{ g}^{-1}$  tanah. Pembagian kelompok ini berdasarkan alat gerak, pembelahan sel, dan tahap siklus hidup (Tabel 1). Panjang flagellata berkisar 5-20  $\mu\text{m}$ , amuba >50  $\mu\text{m}$ , sporozoa 45-60  $\mu\text{m}$ , 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.

†*Sudah meninggal dunia*

Tabel 1. Karakteristik kelompok utama protozoa

Kelompok taksonomi	Alat gerak	Reproduksi aseksual	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: <i>Sporozoa</i> (sporozoon)	Biasanya tidak bergerak	Skizogoni (pembelahan ganda)	Fusi gamet	<i>Plasmodium</i> <i>Toxoplasma</i> <i>Eimeria</i> <i>Cryptosporidium</i>

Sumber: Colome et al. (1978)

## Isolasi

### Prinsip

Ada berbagai macam metode isolasi protozoa yang dapat dikelompokkan menjadi tiga kategori: metode pengayaan, metode pengenceran, dan metode fisik. Cara termudah untuk memperkaya sampel adalah dengan menambahkan butiran jelai rebus, gandum, atau beras, yang akan mendorong pertumbuhan bakteri dan dengan demikian menghasilkan sumber makanan bagi protozoa. Beberapa metode pengayaan yang umum digunakan dijelaskan dalam Finlay et al. (1988) dan Lee (1992). Metode pengenceran paling efektif digunakan untuk sampel yang dominan uniprotozoa. Rincian metode pengenceran dijelaskan dalam Cowling (1991) dan Finlay et al. (2000). Metode fisik melibatkan pemilihan sel individu protozoa dan memindahkan protozoa tersebut ke media pertumbuhan. Mikropipet dengan pipet kapiler tipis, yang digunakan di bawah mikroskop, dapat digunakan untuk mengisolasi berbagai macam protozoa, terutama yang relatif besar dan/atau lambat. Metode isolasi lainnya termasuk pelapisan minyak silikon, flow cytometry, pelapisan agar, dan elektromigrasi. Pelapisan minyak silikon melibatkan isolasi sel-sel pendiri klon dalam mikrodroplet terbentuk dari emulsi minyak/kultur yang dicampur puseran (Soldo & Brickson 1980).

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 1992).

- Masukkan serasah atau contoh tanah sebanyak 10-50 cm ke dalam cawan Petri diameter 10-15 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

### 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 mengistia (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

$$x = X/n$$

$$y = s - x$$

$$\log \lambda = x \log a - K$$

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

$\lambda$  = 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:

$$x = 48/8 = 6$$

$$y = 12 - 6 = 6$$

$$\log \lambda = 6 \log 2 - 0,397 = 1,409; \lambda = 25,66$$

Jumlah populasi protozoa adalah 25.660 per g tanah

## 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. Sebelum digunakan, saring semua larutan menggunakan membran filter <math><0,3 \mu\text{m}</math>.

### 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

- 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 alikuot 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  $25^{\circ}\text{C}$ .
- Tetapkan dengan 0,1 mL glutaraldehida 25% dan kemudian masukkan ke dalam 5 ml kolom fosfat percoll 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  $0,8 \mu\text{m}$  menggunakan penghisap  $-7 \text{ kPa}$ . Warnai dengan larutan akridin oranye.
- Letakkan filter pada kaca objek dan amati protozoa menggunakan mikroskop epifluorescens dan minyak imersi.

### Perhitungan

1. 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<sub>bb</sub> = jumlah populasi dalam tanah basah
- Bb = berat tanah basah (g)
- B = bulk density (g cm<sup>-3</sup>)
- D = kedalaman lapisan contoh tanah yang dianalisis (cm)
- 104 = ketetapan bulk density sampai 1 m<sup>2</sup> (1 m<sup>2</sup> = 10<sup>4</sup> cm<sup>2</sup>)
- 100/%bk = ketetapan untuk berat kering tanah

## 2. 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<sup>-3</sup>.

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

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

Keterangan:

- BM = biomassa kering
- s = jumlah total spesies
- I<sub>ibk</sub> = jumlah individu spesies ke i per g berat kering tanah
- W<sub>i</sub> = bobot massa per spesies ke i (ng)
- 0,15 = faktor konversi dari bobot basah ke bobot kering massa
- Bk = berat kering tanah
- I<sub>i</sub> = jumlah spesies ke i per m<sup>2</sup>

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

## Daftar Pustaka

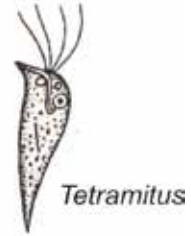
- Alexander M. 1977. Introduction to Soil Microbiology. 2nd ed. John Wiley and Sons. New York. 467 p.
- Anderson JM. 1988. Spatiotemporal effects of invertebrates on soil processes. *Biol. Fertil. Soils* 6: 216-227.
- Bamforth SS. 1995. Sampling and enumerating soil protozoa. *In* Lee JJ, Soldo AT. (Eds.) *Protocols in Protozoology*. Society of Protozoologists. 041 New Hampshire Street Lawrence Kansas 66044.
- Colome JS, Kubinski AM, Cano RJ, Grady DV. 1978. Laboratory exercises in microbiology. West Publ. Co. US.
- Cowling AJ. 1991. Chapter 27: Free-living heterotrophic flagellates: methods of isolation and maintenance, including sources of strains in culture. p. 477-491. *In* Patterson DJ, Larson J. (Eds.) *The Biology of Free-Living Heterotrophic Flagellates*. Systematics Association Special Volume No. 45, Clarendon Press, Oxford, UK.
- Darbyshire JF, Wheatly RE, Greaves MP. 1974. A rapid micromethod for estimating bacterial and protozoan populations in soil. *Revue. Ecol. Biol. Sol.* 11: 465-475.
- Finlay BJ, Rogerson A, Cowling AJ. 1988. Beginners guide to the collection, isolation, cultivation and identification of freshwater protozoa. *Culture Collection of Algae and Protozoa*, Freshwater Biological Association, Ambleside, UK. 78 pp.
- Finlay BJ, Black HIJ, Brown S, Clarke KJ, Esteban GF, Hindle RM, Olmo JL, Rollett A, Vickerman K. 2000. Estimating the growth of the soil protozoan community. *Protist* 151: 69-80.
- Fisher RA, Yates F. 1963. Statistical tables in biological, agricultural, and medical research. Oliver and Boyd, Edinburgh.
- Foissner W. 1992. Estimating the species richness of soil protozoa using the "non-flooded Petri Dish method". *In* Lee JJ, Soldo AT. (Eds.) *Protocols in Protozoology*. Society of Protozoologists. 041 New Hampshire Street Lawrence Kansas 66044.
- Griffiths BS, Ritz K. 1988. A technique to extract, enumerate and measure protozoa from mineral soils. *Soil Biol. Biochem.* 20(2):163-173.
- Lee JJ. 1992. Axenic isolation of diatoms and chlorophytes as food for protozoa. *In* Lee JJ, Soldo AT. (Eds.) *Protocols in Protozoology*. Society of Protozoologists. 041 New Hampshire Street Lawrence Kansas 66044.
- Protocols in Protozoology. Society of Protozoologists. 1041, New Hampshire Street Lawrence Kansas 66044.
- Lousier JD, Bamforth SS. 1990. Soil protozoa. *In* Dindal DL. (Ed.) *Soil Biology Guide*. A Wiley-Intersci. Publ. New York.
- Singh BN. 1955. Culturing soil protozoa and estimating their numbers in soil. p. 403-411. *In* Kevan (Ed.) *Soil Zoology*, Butter worths, London.
- Soldo AT, Brickson SA. 1980. A simple method for plating and cloning ciliates and other protozoa. *J. Protozool.* 27: 328-31.
- Stout JD. 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)

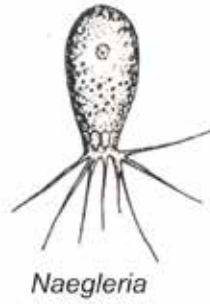
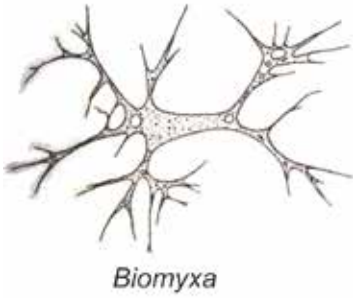
x	Tingkat pengenceran							
	4	5	6	7	8	9	10	≥ 11
0,4	,757	,773	,781	,785	,787	,788	,789	,789
0,6	,622	,640	,649	,653	,655	,656	,657	,657
0,8	,537	,556	,556	,571	,573	,574	,575	,575
1,0	,479	,500	,511	,516	,518	,520	,520	,521
1,2	,437	,461	,472	,478	,480	,482	,482	,483
1,4	,406	,432	,444	,450	,453	,455	,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

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.

*The key to every biological problems must finally be sought in the cell.*

E. B. Wilson

# 3.1

## ESTIMASI BIOMASSA C-MIKROBA

*Sarmah, Edi Husen, 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  $\text{mg C kg}^{-1}$  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:

- 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.
- 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.

## Metode Fumigasi Inkubasi (Jenkinson & Powlson 1976)

### Prinsip

Metode pengukuran didasarkan pada proses dekomposisi sel-sel mikroba yang mati setelah difumigasi dengan uap kloroform. Inokulan berupa tanah segar dicampurkan ke tanah yang telah difumigasi dan diinkubasi selama 10 hari untuk memberi kesempatan terjadinya proses mineralisasi biomassa yang baru mati. Fumigasi kloroform menyebabkan peningkatan produksi  $\text{CO}_2$  karena terjadi peningkatan peruraian biomassa yang mati tersebut.

### Alat

- Corong pisah 250 mL
- Toples kedap udara 1.000 mL
- Gelas kimia atau botol kaca lebar
- Buret 50 mL
- Desikator yang dihubungkan dengan alat vakum
- Kertas tisu
- Butiran anti-bumping (batu didih)

### Bahan

- Kloroform bebas alkohol
  - Masukkan 100 mL kloroform ke dalam corong pisah dan tambahkan 5 mL asam sulfat pekat, kocok dengan hati-hati. Diamkan sampai batas kedua larutan terlihat jelas, buang lapisan bawahnya. Ulangi sebanyak 3 kali atau sampai tidak ada gelembung pada batas kedua larutan. Tampung bagian atas larutan (kloroform) dalam botol kaca gelap. Kloroform bebas alkohol dapat disimpan di tempat gelap selama 14 hari.
- Catatan: Pastikan corong pisah tidak bocor, lakukan di ruang asam!!! Cek kebocoran corong pisah: Masukkan  $\pm 10$  mL kloroform, tandai batas atas permukaan kloroform pada corong pisah. Diamkan selama  $\pm 1$  jam, jika volume berkurang berarti terjadi kebocoran.
- Larutan asam klorida (HCl) 0,1 N
- Larutan kalium hidroksida (KOH) 0,1 N
- Larutan indikator PP
  - Masukkan 0,1 g fenolptalein ke dalam labu ukur 100 mL dan tambah etanol (60% v/v) sampai tanda tera.
- Larutan indikator MO
  - Masukkan 0,5 g metil orange ke dalam labu ukur 100 mL dan tambah alkohol 50% sampai tanda tera.

## Prosedur

- Timbang @100 g tanah dan masukkan ke dalam 4 gelas kimia.
- Masukkan 2 gelas kimia yang berisi contoh tanah tersebut bersama gelas kimia yang berisi 30 mL kloroform bebas alkohol dan batu didih ke dalam desikator yang dialasi kertas tisu basah, tutup desikator.  
Catatan: sesuaikan volume kloroform dengan jumlah sampel
- Keluarkan udara dari dalam desikator dengan alat vacum sampai kloroform mendidih. Lanjutkan proses vacum selama  $\pm 15$  menit, matikan alat vacum. Tutup keran penghubung desikator dan alat vacum, inkubasi di tempat gelap (atau tutup dengan kain hitam) pada suhu kamar selama 24 jam.
- Keluarkan sampel dan kertas tisu dari desikator, bersihkan desikator. Masukkan kembali gelas kimia yang berisi sampel tanah, tutup desikator. Nyalakan alat vacum selama 15 menit. Ulangi beberapa kali hingga uap kloroform benar-benar hilang.
- Perlakukan 2 gelas kimia lainnya dengan cara yang sama tetapi tanpa kloroform.
- Inokulasikan tanah segar sebanyak 1% ke dalam sampel tanah yang difumigasi dan diaduk rata.
- Masukkan sampel tanah ke dalam toples dengan gelas kimia berisi 20 mL larutan KOH dan wadah plastik berisi 10 mL akuades, segera tutup toples dan inkubasi selama 10 hari pada ruang gelap bersuhu 25°C.
- Ambil dan ganti larutan KOH setiap 3 hari sekali dengan yang baru. Pada saat yang sama amati kelembapan tanah yang hilang selama inkubasi dan tambahkan akuades sebanyak air yang hilang.
- Larutan KOH yang lama dititrasi dengan larutan HCl untuk mengukur produksi CO<sub>2</sub>. Gunakan indikator PP dan JM untuk menentukan titik akhir titrasi.
- Sebagai kontrol, inkubasi larutan KOH tanpa tanah.

## Perhitungan

$$BK = (\text{berat basah sampel} \times \% \text{berat kering}) / 100$$

$$X = ((a - b) \times 1,2) / BK$$

$$C\text{-mic} = (X_f - X_{nf}) / (0,45)$$

Keterangan:

BK = berat kering sampel

X = jumlah C-CO<sub>2</sub> yang dihasilkan (mg C-CO<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> tanah kering)

C – mic = Biomassa karbon mikroba (mg g<sup>-1</sup> tanah kering)

a = volume HCl sampel setelah ditambahkan JM (mL)

b = volume HCl kontrol setelah ditambahkan JM (mL)

$X_f$  = jumlah C-CO<sub>2</sub> yang dihasilkan sampel yang difumigasi

$X_{nf}$  = jumlah C-CO<sub>2</sub> yang dihasilkan sampel yang tidak difumigasi

1,2 = faktor konversi (1 mL 0,1 N HCl = 1,2 mg C-CO<sub>2</sub>)

0,45 = faktor kc, bagian dari C-biomassa yang mengalami mineralisasi menjadi CO<sub>2</sub> selama inkubasi pada suhu 25°C.

## Metode Fumigasi–Ekstraksi (Vance et al. 1987)

### Prinsip

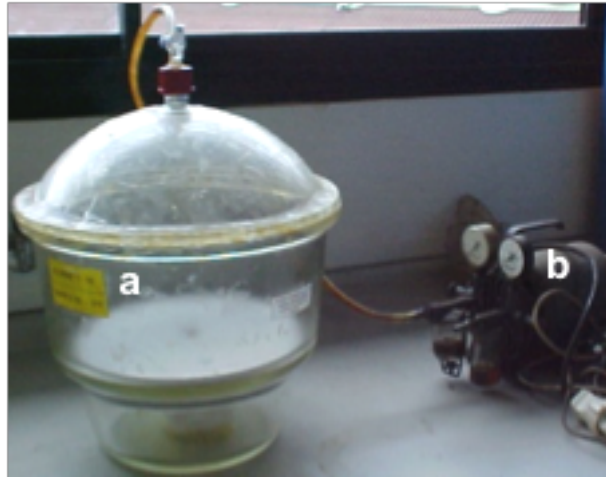
Fumigasi dengan kloroform membunuh dan melarutkan sel mikroba dengan lepasnya sitoplasma ke dalam lingkungan tanah. Bahan-bahan sel dapat diekstraksi dari tanah. Alef & Nannipieri (1995) mengemukakan bahwa C-organik, total N dan NH<sub>4</sub>-N, ninhydrin-reaktif N, C-karbohidrat. C-fenol reaktif dapat diekstraksi dengan 0,5 M K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

### 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

### Bahan

- Kloroform (CHCl<sub>3</sub>) bebas alkohol (prosedur seperti di atas)
- Larutan K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 M
- Larutkan 87,135 g K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dengan akuades sampai volume 100 mL
- Asam sulfat pekat
- Larutan kalium dikromat 1N
  - Larutkan 98,1 g K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> dengan 600 mL akuades dalam gelas piala, tambah 100 mL asam sulfat pekat, panaskan hingga larut sempurna. Setelah dingin, tuang larutan ke dalam labu ukur 1000 mL dan tepatkan volumenya dengan akuades.
- 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



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

### Prosedur

- Timbang @25 g contoh tanah dan masukkan ke dalam 4 gelas kimia (2 difumigasi, 2 tidak difumigasi).
- Lakukan prosedur fumigasi seperti pada subbab sebelumnya.
- Masukkan masing-masing contoh tanah yang difumigasi dan tidak difumigasi ke dalam labu Erlenmeyer 250 mL dan segera ekstraksi dengan larutan  $K_2SO_4$  0,5 M dengan rasio pengekstrak : berat kering tanah = 4 : 1 (v/b).
- Kocok dengan shaker selama 30 menit pada kecepatan 200 rpm dan dilanjutkan dengan sentrifugasi selama 10 menit pada 2000 g. Setelah sentrifugasi, 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).

## Perhitungan

$$\text{Kadar C-organik } (\mu\text{g.g}^{-1} \text{ tanah}) = (\text{ppm kurva} \times V) / \text{BK}$$

$$\text{BK} = (\text{berat basah sampel} \times \% \text{berat kering}) / 100$$

Keterangan:

- ppm kurva = kadar C contoh dari kurva hubungan antara kadar deret standar dengan pembacaannya setelah dikoreksi blanko ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
- V = volume ekstrak (mL)

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

Keterangan:

- S = Kadar C-organik contoh tanah yang difumigasi
- C = Kadar C-organik contoh tanah yang tidak difumigasi
- 0,35 = faktor kEC (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  $\text{CO}_2$  sehingga membuat tingkat  $\text{CO}_2$  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  $\text{K}_2\text{SO}_4$ . 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.

## Metode Substrate-Induced Respiration (SIR) (Anderson & Domsch 1978)

Metode respirasi yang diinduksi substrat (metode fisiologis) untuk penentuan karbon dalam biomassa mikroba didasarkan pada pengukuran intensitas respirasi tanah (emisi CO<sub>2</sub>) setelah ditambah dengan substrat yang mudah teroksidasi dan tersedia (glukosa). Pada konsentrasi substrat yang tinggi, laju transformasi menjadi tinggi dan sesuai dengan biomassa mikroba (Ananyeva *et al.* 2011).

### (1) Metode titrasi

#### Alat

- Gelas kimia
- Toples kedap udara
- Buret
- Bahan
- Glukosa
- Larutan NaOH 0,1M
- Larutkan 4 g NaOH dalam 1000 mL akuades.
- Larutan HCl 0,1 M
  - Tambahkan 83 mL HCl pekat (37%) secara perlahan ke dalam 250 mL akuades di dalam labu ukur 1000 mL, kocok sebentar lalu tambahkan akuades sampai tanda tera.
- Larutan BaCl<sub>2</sub> 0,5M
  - Larutkan 12,2 g BaCl<sub>2</sub> dalam 100 mL akuades.
- Indikator fenolftalein
  - Larutkan 0,1 g fenolftalein dalam labu ukur 100 mL dengan etanol (60% v/v).

#### Prosedur

- Bersihkan tanah dari batu, akar, batang, dan daun. Ayak dengan saringan berpori 2 mm.
- Pra-inkubasi sampel tanah (100 – 500 g) selama 7 hari pada suhu 22°C dengan kelembaban tanah 60% dari total kapasitas air.
- Sebanyak 20 g tanah yang telah diinkubasi awal diambil dan dimasukkan ke gelas kimia
- Tambahkan glukosa sebanyak 200 mg (dilarutkan dalam 2 mL akuades) dan aduk rata.
- Masukkan gelas kimia berisi tanah ke dalam toples kedap udara ukuran 500 mL bersama gelas kimia berisi 20 mL larutan NaOH 0,1 M. Inkubasi pada suhu 22°C selama 4 jam.
- Setelah inkubasi, segera keluarkan gelas kimia berisi larutan NaOH. Endapkan CO<sub>2</sub> yang diserap dengan menambahkan 2 mL larutan barium klorida 0,5 M.

Tambahkan 3 – 4 tetes indikator fenolftalein dan titrasi dengan 0,1 M HCl sampai warna larutan hilang.

- Catat volume HCl yang terpakai.

### Perhitungan

$$SIR = ((B - S) \times 2,2 \times 100) / (m \times \%bk \times t)$$

$$MB_{SIR} = SIR / 20$$

Keterangan:

- SIR = laju respirasi yang diinduksi substrat ( $\text{mg CO}_2 \cdot \text{g}^{-1} \text{ tanah} \cdot \text{jam}^{-1}$ )
- B = volume HCl kontrol (mL)
- S = volume HCl sampel (mL)
- m = bobot sampel basah (g)
- %bk = persen berat kering sampel
- t = waktu inkubasi (jam)
- 2,2 = faktor konversi 1 mL HCl 0,1N setara 2,2 mg  $\text{CO}_2$
- 100 = faktor konversi berat kering sampel
- MBSIR = biomassa karbon mikroba ( $\text{mg C-CO}_2 \cdot \text{g}^{-1} \text{ tanah}$ )
- 20 = konversi berdasarkan asumsi bahwa  $100 \mu\text{g CO}_2 \cdot \text{h}^{-1}$  setara dengan 2 mg biomassa-C (Anderson & Domsch 1978)

## (2) Metode gas chromatography (Ananyeva et al. 2011)

### Alat

- Gelas kimia
- Tabung reaksi bertutup karet (septum)
- Syringe
- Gas Chromatography (GC)
- Bahan
- Glukosa

### Prosedur

- Bersihkan tanah dari batu, akar, batang, dan daun. Ayak dengan saringan berpori 2 mm.
- Pra-inkubasi sampel tanah (100 – 500 g) selama 7 hari pada suhu 22°C dengan kelembaban tanah 60% dari total kapasitas air.
- Sebanyak 2 g tanah yang telah diinkubasi awal diambil dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi bertutup karet (uk.15 mL)
- Tambahkan glukosa sebanyak 20 mg (dilarutkan dalam 0,2 mL akuades) dan aduk rata.

- Inkubasi selama 3 sampai 5 jam.
- Ambil udara dalam tabung menggunakan *syringe*, lalu diinjeksikan ke dalam GC.

### Perhitungan

$$SIR = (S - K)V_{fi} \times 60 \times 1000/mV_{as} \times 100 \text{ (Ananyeva et al. 2011)}$$

$$MB_{SIR} = SIR \times 40,04 + 0,37 \text{ (Anderson \& Domsch 1978)}$$

Keterangan:

- SIR = laju respirasi yang diinduksi substrat ( $\mu\text{l CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ tanah jam}^{-1}$ )  
 S = kandungan  $\text{CO}_2$  dalam tabung berisi tanah (%)  
 K = kandungan  $\text{CO}_2$  dalam tabung tanpa tanah (%)  
 $V_{fi}$  = volume udara dalam tabung berisi tanah (mL)  
 $V_{as}$  = volume sampel udara yang diinjeksikan ke GC (mL)  
 m = bobot kering tanah  
 $MB_{SIR}$  = biomassa mikroba ( $\mu\text{g C g}^{-1} \text{ tanah}$ )

## Metode Phospholipid Fatty Acid Analysis (Frostegård et al. 1991)

### Prinsip

Metode alternatif untuk menilai biomassa mikroba adalah dengan menganalisis kandungan komponen seluler tertentu yang dapat diekstraksi langsung dari sampel. PLFA (*Phospholipid Fatty Acid*) merupakan komponen khas membran sel. Kandungan fosfolipid dalam sel bakteri relatif konstan pada berbagai kondisi pertumbuhan dan cepat terdegradasi setelah kematian sel sehingga dapat digunakan untuk menentukan biomassa bakteri. Analisis PLFA lebih disukai dalam biologi modern untuk karakterisasi komunitas mikroba (Salomonova et al. 2003). PLFA yang diperoleh selanjutnya diubah menjadi FAME (Fatty Acid Methyl Ester) dengan metode penyabunan. FAME diisolasi dan diukur dengan kromatografi gas, lalu hasilnya diidentifikasi dan dibandingkan dengan standar (Leckie et al. 2004). Biomassa bakteri diwakili oleh asam lemak 15:0, a15:0, i15:0, i16:0, 16:1 $\omega$ 7c, 16:1 $\omega$ 7t, 17:0, a17:0, 17:1 $\omega$ 6, cy17:0, 18:1 $\omega$ 5, 18:1 $\omega$ 7 dan cy19:0; biomassa fungi diwakili oleh 18:1 $\omega$ 9; 18:2 $\omega$ 6,9 dan 18:3 $\omega$ 3,6,9; actinomycetes diwakili oleh 10Me16:0 (Schnecker et al. 2012).

### Alat

- Tabung sentrifus kaca
- Shaker
- Corong pisah
- Bekker glass
- Pipet pasteur

- SPE cartridge (SiOH)
- Pengering gas nitrogen
- Gas Chromatography (GC)

Catatan: Peralatan yang digunakan harus terbuat dari kaca, teflon, atau besi (hindari penggunaan peralatan dari plastik). Bilas semua peralatan gelas yang akan digunakan dengan campuran Metanol:CHCl<sub>3</sub> (2:1), lalu keringkan. Ulangi pembilasan saat akan digunakan dengan pelarut yang dipakai.

### Bahan

- Chloroform (CHCl<sub>3</sub>)
- Metanol (MeOH)
- Toluene
- Kalium Hidroksida (KOH)
- Hexane
- Larutan Buffer-fosfat 0,1M pH 7,0
  - Larutkan 6,7938 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> dan 8,3021 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> dengan akuades dalam labu ukur 1 L
- Campuran MeOH:CHCl<sub>3</sub> (2:1)
  - Campurkan 200 mL Metanol (MeOH) dan 100 mL Chloroform (CHCl<sub>3</sub>) dalam botol bertutup
- Campuran MeOH:Toluene (1:1)
  - Campurkan 50 mL Metanol + 50 mL Toluene dalam botol bertutup
- Campuran Hexane:CHCl<sub>3</sub> (4:1)
  - Campurkan 80 mL Hexane + 20 mL CHCl<sub>3</sub> dalam botol bertutup
- Larutan Methanolic-KOH 0,2M
  - Timbang 1 pellet KOH (± 0,191 g), larutkan dalam ± 17 mL metanol --> aduk sampai larut
  - Catatan: Volume Metanol (mL) = massa KOH x 89,12
- Larutan asam asetat 1 M
  - 5,72 mL asam asetat 100% + akuades sampai volume 100 mL
- Larutan stock ISTD C19:0 400 ppm
  - Sebanyak 0,04 g Methylnonadecanoat (C19:0) dilarutkan dengan hexane dalam labu ukur 100 mL
- Larutan ISTD C19:0 8 ppm
  - Larutkan 2 mL larutan stock ISTD 400 ppm dengan 98 mL hexane
- Gas Nitrogen (N<sub>2</sub>)

## Prosedur

- Persiapan sampel: Bersihkan sampel dari batu dan sisa tanaman, lalu segera dikering-bekukan (*freeze-dry*). Simpan sampel dalam freezer.

### 1. Hari ke-1:

- Keluarkan sampel dari *freezer*, giling dengan mortar dan alu untuk menghomogenkan sampel.
- Timbang 2 g sampel tanah yang telah homogen, masukkan dalam tabung sentrifuse. (Jika sampel kaya akan bahan organik, mis: gambut, kompos --> 0,5 g sudah cukup)
- Tambahkan 3,6 mL Buffer-fosfat, 4 mL  $\text{CHCl}_3$ , dan 8 mL Metanol --> vorteks, lalu dikocok dengan shaker selama 1 jam dengan kecepatan 182 putaran/menit ( $\pm 50$  rpm)
- Sampel disentrifuse selama 10 menit (2500 rpm,  $21^\circ\text{C}$ )
- Tuang supernatan ke dalam corong pisah yang berisi campuran 8 mL  $\text{CHCl}_3$  dan 8 mL Buffer-fosfat.
- Pelet/endapan dalam tabung sentrifuse ditambahkan lagi dengan 3,6 mL Buffer-fosfat, 4 mL  $\text{CHCl}_3$ , dan 8 mL Metanol --> vorteks --> shaker --> sentrifuse
- Supernatannya dituangkan lagi ke dalam corong pisah berisi campuran  $\text{CHCl}_3$  dan Buffer-fosfat --> kocok
- Diamkan sampel selama semalam dalam ruang gelap

### 2. Hari ke-2:

- Keluarkan sampel dari ruang gelap
- Ambil lapisan bawah/fase organik sampel (hati-hati, jangan sampai lapisan atas terbawa), masukkan ke dalam tabung sentrifuse kaca.
- Keringkan sampel dengan gas  $\text{N}_2$  0,5 bar (bilas jarum dengan campuran  $\text{MeOH}:\text{CHCl}_3$ ). Gunakan water bath ( $\pm 24^\circ\text{C}$ ) untuk mempercepat pengeringan.
- Siapkan SPE *catridge* (SiOH) untuk menyaring sampel dan beaker glass + tabung sentrifuse kaca untuk menampung filtrat
- Kondisikan SiOH dengan 3 mL  $\text{CHCl}_3$
- Larutkan sampel yang telah kering dengan  $\text{CHCl}_3$  (3-4 kali, sampai larutan bening), setiap 1 pipet --> vorteks --> tuang ke penyaring SiOH (filtrat ditampung dalam beaker glass)
- Tambahkan 4 mL  $\text{CHCl}_3$  ke penyaring SiOH, biarkan --> tiup dengan bulb
- Tambahkan 5 mL aseton ke penyaring SiOH (2 kali) --> tiup dengan bulb
- Ganti penampung filtrat dengan tabung sentrifuse kaca (bilas dengan Metanol)
- Tambahkan 5 mL metanol ke penyaring SiOH, biarkan sampai semua metanol turun (tersaring)

- Filtrat terakhir (metanol) dikeringkan dengan gas  $N_2$  0,5 bar (bilas jarum dengan MeOH). Setelah kering, biarkan beberapa detik terkena  $N_2$  lalu segera tutup tabung sampel ( $O_2$  tidak baik untuk PLFA)
- Simpan sampel kering dalam *freezer* -20°C

### 3. Hari ke-3:

- Keluarkan sampel kering dari *freezer*, biarkan sampai mencapai suhu ruang
- Larutkan sampel kering dengan menambahkan 1 mL MeOH:Toluene dan 1 mL Methanolic-KOH --> vorteks
- Inkubasi sampel pada suhu 35°C selama  $\geq 15$  menit
- Sampel yang telah diinkubasi ditambah dengan 2 mL Hexane :  $CHCl_3$ , 1 mL asam asetat, dan 2 mL akuades --> vorteks 15-20 detik
- Sentrifuse sampel selama 5 menit pada 2000 rpm, 21°C
- Ambil lapisan atasnya, masukkan dalam tabung reaksi bertutup yang telah dibilas dengan Hexane
- Lapisan bawahnya ditambah 2 mL Hexane :  $CHCl_3$  --> vorteks 15-20 detik --> sentrifuse --> ambil lapisan atasnya (3 kali). Untuk tahap ke-3 volume Hexane :  $CHCl_3$  yang ditambahkan hanya 1 mL.
- Keringkan sampel dengan gas  $N_2$  0,5 bar (bilas jarum dengan Hexane)
- Larutkan sampel kering dengan menambahkan 300  $\mu$ l larutan istd (C19:0) 8 ppm --> vorteks sampai larut
- Catatan: Jika sulit larut, sonikasi dalam ultrasonic bath 5-10 menit (beberapa kali)
- Masukkan ekstrak sampel yang telah larut dalam vial GC (300  $\mu$ l)
- Ukur kadar PLFA/FAME sampel dengan menggunakan alat *Gas Chromatography* (GC)

Catatan: Simpan sampel dalam *freezer* -20°C sampai siap di-*inject* ke-GC (max. 1 minggu)

## 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 ( $\text{BaCl}_2$ ) 3,0 M
- Larutan KOH 0,2 M
- Larutan HCl 0,2 N
- Indikator fenolptalein 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  $\text{CO}_2$  seperti pengukuran  $\text{CO}_2$  pada 3.1.2, kemudian hitung dekomposisinya dan efisiensi mikroba sebagai berikut:

**Perhitungan**

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

Keterangan:

- J =  $\text{CO}_2$  hasil pengukuran dari contoh tanah yang diberi jerami
- K =  $\text{CO}_2$  hasil pengukuran dari contoh tanah yang tidak diberi jerami
- C = Penambahan C-organik jerami =  $500 \times 45\%$

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

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

Keterangan:

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

**Ulasan**

Dari pemakaian metode ini dapat diketahui perubahan bentuk dan besarnya transformasi C-jerami. Sebagian C-jerami ditransformasi menjadi  $\text{CO}_2$  sebesar E, bagian sel mikroba sebesar C-mikroba, dan bagian dari bahan organik tanah sebesar [C-jerami – C- $\text{CO}_2$  – C-mikroba].

## Daftar Pustaka

- Alef K, Nannipieri P. 1995. Microbial biomass. p. 375-381. *In* Alef K, Nannipieri P (Eds.). *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press. Harcourt Brace & Company Pub. London.
- Ananyeva ND, Susyan EA, Gavrilenko EG. 2011. Determination of the soil microbial biomass carbon using the method of substrate-induced respiration. *Eurasian Soil Science*. 44(11):1215–1221. Doi: 10.1134/S1064229311030021.
- Anderson, J. P. E. and Domsch, K. H. (1978) A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. *Soil Biol. Biochem.* 10:215–221.
- Frostegård Å, Tunlid A, Bååth E. 1991. Microbial biomass measured as total lipid phosphate in soils of different organic content. *Journal of Microbiological Methods* 14:151–163.
- Jenkinson DS, Powelson DS. 1976. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil—V. A method for measuring soil biomass. *Soil Biol. Biochem.* 8:209–213.
- Leckie SE, Prescott CE, Grayston SJ, Neufeld JD, Mohn WW. 2004. Comparison of chloroform fumigation-extraction, phospholipid fatty acid, and DNA methods to determine microbial biomass in forest humus. *Soil Biol. Biochem.* 36:529–532. doi:10.1016/j.soilbio.2003.10.014
- Parkinson D, Paul EA. 1982. Microbial biomass. p. 821-830. *In* Page AL, Miller RH, Keeney DR (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.
- Salomonová S, Lamačová J, Rulík M, Rolčík J, Čáp L, Bednář P, Barták P. 2003. Determination of Phospholipid Fatty Acids in Sediments. *Chemica* 42:39–49.
- Schnecker J, Wild B, Fuchslueger L, Richter A. 2012. A field method to store samples from temperate mountain grassland soils for analysis of phospholipid fatty acids. *Soil Biol. Biochem.* 51:81–83. doi:10.1016/j.soilbio.2012.03.029
- Sulaeman, Suparto, Eviati. 2005. *Petunjuk Teknis Analisis Kimia Tanah, Tanaman, Air, dan Pupuk*. Balai Penelitian Tanah. Badan Litbang Pertanian. Kementan RI.
- Vance ED, Brookes PC, Jenkinson DS. 1987. An extraction for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biol. Biochem.* 19: 703–707.
- Wagner HG, Wolf DC. 1998. Carbon transformation and soil organic matter formation. p. 218-257. *In* Silvia DM, Fuhrmann JJ, Hartel PG, Zuberer DA (Eds.) *Principles and Applications of Soil Microbiology*. Prentice Hall New Jersey.

## 3.2

# PENGUKURAN RESPIRASI TANAH

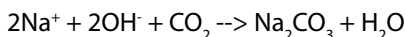
*Edi Husen, Dila Aksani, Sri Widati*

Respirasi tanah merupakan salah satu indikator aktivitas mikroba di dalam tanah. Pada proses respirasi terjadi penggunaan O<sub>2</sub> dan pembebasan CO<sub>2</sub>, sehingga tingkat respirasi dapat ditentukan dengan mengukur O<sub>2</sub> yang digunakan atau CO<sub>2</sub> yang dilepaskan oleh mikroba tanah (Alexander 1977, Anas 1989, Alef 1995). Pengukuran respirasi dapat dilakukan di lapangan pada tanah tidak terganggu (*undisturbed soil sample*) atau di laboratorium dari contoh tanah terganggu (*disturbed soil sample*) yang diambil dari lapangan.

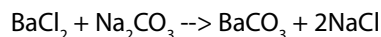
Pengukuran respirasi di lapangan dilakukan dengan sungkup kedap udara yang menutupi permukaan tanah. Pengukuran di lapangan ini bersifat langsung sesuai dengan suhu dan kelembapan tanah saat pengukuran. Sedangkan pengukuran di laboratorium meliputi penetapan respirasi dari contoh tanah yang diambil dengan pengaturan kelembapan, suhu, dan masa inkubasi atau jangka waktu tertentu. Pengaturan kelembapan tanah sangat penting karena kecepatan respirasi tanah sangat ditentukan oleh tingkat kadar air tanah (Davidson *et al.* 2000, Smith 2005, Makiranta *et al.* 2009, Husen *et al.* 2014).

Tingkat respirasi tanah ditentukan oleh tingkat evolusi CO<sub>2</sub>. Evolusi CO<sub>2</sub> tanah dihasilkan dari hasil proses dekomposisi bahan organik. Dengan demikian, tingkat respirasi menjadi indikator tingkat dekomposisi bahan organik yang terjadi pada selang waktu tertentu.

Pengukuran CO<sub>2</sub> dengan NaOH (bisa juga KOH) sebagai penangkap CO<sub>2</sub> mengikuti persamaan berikut:



Karbonat yang terbentuk diendapkan dengan BaCl<sub>2</sub> menjadi BaCO<sub>3</sub> dengan persamaan sebagai berikut:



Residu OH<sup>-</sup> yang terbentuk dititrasi dengan HCl.

### Prinsip

Metode ini didasarkan pada pengukuran CO<sub>2</sub> dalam tanah pada periode waktu tertentu. Larutan NaOH (atau KOH) yang digunakan berfungsi sebagai penangkap CO<sub>2</sub> yang kemudian dititrasi dengan HCl. Jumlah HCl yang diperlukan untuk titrasi setara dengan jumlah CO<sub>2</sub> yang dihasilkan.

## Pengukuran CO<sub>2</sub> dalam Botol Tertutup di Laboratorium (Metode Isermeyer dalam Alef 1995)

### Alat

- Buret atau titrator otomatis
- Stoples plastik kedap udara
- Gelas Beaker
- *Stirer*
- Labu Erlenmeyer

### Bahan

- NaOH 0,05 M
- HCl 0,05 M
- BaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,5 M:
  - Larutkan 61,08 g BaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O dalam 200 mL akuades dan tepatkan 500 mL.
- Indikator phenolphthalein:
  - Larutkan 0,1 g phenolphthalein dalam 80 mL etanol 60% (v/v) dan tepatkan 100 mL.
- Akuades bebas CO<sub>2</sub>:
  - Panaskan 1000 ml akuades selama 2 menit, dinginkan, kemudian tuangkan ke dalam gelas Beaker sekitar 30-40 mL.

### Prosedur

- Masukkan 50 g contoh tanah pada kadar air kapasitas lapang (lembap) ke dalam gelas Beaker, kemudian masukkan ke dalam stoples plastik kedap udara dan tempatkan pada salah satu sisi stoples
- Tempatkan air bebas CO<sub>2</sub> yang sudah disiapkan di bagian sisi lain stoples
- Pipet 25 ml NaOH 0,05N ke dalam gelas Beaker 50 mL dan tempatkan di dalam stoples pada sisi lain yang masih kosong (antara gelas Beaker berisi tanah dan Beaker berisi air bebas CO<sub>2</sub>), kemudian segera tutup stoples dan catat jamnya
- Sebagai kontrol blanko, gunakan 2 stoples yang masing-masing hanya berisi air bebas CO<sub>2</sub> dan 25 ml NaOH 0,05N.
- Tutup semua botol stoples dan inkubasi selama 3 hari pada suhu 25°C.
- Untuk contoh tanah yang tersisa, tetapkan kadar airnya:
  - Penetapan kadar air --> Timbang @ 10 g contoh tanah dari masing-masing perlakuan dan tempatkan dalam piringan/aluminium foil, oven pada suhu 105°C selama 3 jam.
- Setelah inkubasi 3 hari, kemudian buka tutup stoples dan catat jam membuka tutup tersebut untuk menghitung lamanya masa inkubasi.
- Ambil gelas Beaker berisi NaOH dan tambahkan 5 ml BaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,5N, kemudian tambahkan 4 tetes indikator phenolphthalein.

- Selanjutnya titer larutan dengan 0,05N HCl sampai larutan merah berubah menjadi tidak berwarna. Catat volume HCl yang terpakai --> Peniteran untuk kontrol blanko (ada 2 jar) dilakukan masing-masing pada waktu awal (yaitu, sebelum peniteran larutan NaOH pada stoples berisi contoh tanah) dan akhir (yaitu, setelah selesai peniteran semua stoples berisi contoh tanah).

### Perhitungan

Laju respirasi contoh tanah perlakuan dihitung berdasarkan berat kering contoh tanah perlakuan (mg CO<sub>2</sub>/g tanah/jam atau hari), sebagai berikut:

$$\text{CO}_2 \text{ (mg/g tanah kering/jam)} = \{(V_0 - V_1) \times 1,1\} / \text{dwt}$$

Keterangan:

- V<sub>0</sub> = HCl yang diperlukan untuk titrasi NaOH pada kontrol (blanko)
- V<sub>1</sub> = HCl yang diperlukan untuk titrasi NaOH pada contoh tanah
- dwt = Berat kering oven 1 g tanah lembap yang digunakan
- 1,1 = Faktor konversi (1 mL 0,05 M NaOH setara dengan 1,1 mg CO<sub>2</sub>)

### Pengukuran CO<sub>2</sub> di Lapang (Metode Anderson dalam Alef 1995)

#### Alat

- Sungkup yang dapat terbuat dari silinder (ring) PVC atau logam silinder (tinggi lk 30 cm, diameter lk 25 cm) yang bagian atas silindernya tertutup rapat (kedap udara, tidak bocor) dan bagian silinder bawahnya terbuka
- Gelas piala 50 mL atau botol jar gelas bertutup (tinggi lk 7 cm, diameter lk 6,5 cm)
- Tripod (kaki segitiga) terbuat dari logam atau plastik untuk dudukan gelas piala atau botol jar

#### Bahan

- Larutan NaOH 1 M
- Barium klorida (BaCl<sub>2</sub> 3 M)
- HCl 1 M
- Indikator phenolphthalein

#### Prosedur

- Pipet 20 mL larutan NaOH ke dalam gelas Beaker dan tempatkan di atas tripod di permukaan tanah.
- Sebagai kontrol (blanko) pipet 20 mL larutan NaOH ke dalam botol kedap udara yang tertutup rapat dan juga ditempatkan di atas tripod.
- Segera tempatkan sungkup ring PVC menutupi larutan NaOH dan tekan bagian silinder bawah yang terbuka sampai masuk ke dalaman tanah sekitar

2 cm dari permukaan tanah. Perlakuan yang sama juga dilakukan pada perlakuan kontrol (blanko).

- Hindari rangkaian peralatan terkena sinar matahari langsung.
- Setelah 24 jam atau lebih, ambil NaOH pada gelas Beaker dan segera tutup dengan aluminium foil atau plastik agar tidak ada udara luar yang masuk dan keluar, kemudian dibawa ke laboratorium untuk dititrasi dengan HCl.
- Prosedur titrasi NaOH sama seperti prosedur yang diuraikan di atas pada pengukuran respirasi tanah dengan stoples tertutup di laboratorium.

### Perhitungan :

Evaluasi jumlah CO<sub>2</sub> yang dihasilkan dengan persamaan sebagai berikut :

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

B = HCl yang diperlukan untuk titrasi NaOH pada kontrol (Blanko).

V = HCl yang diperlukan untuk titrasi larutan NaOH pada contoh

N = Normalitas HCl yang digunakan (=1N)

E = Berat equivalent (22 untuk CO<sub>2</sub> dan 6 untuk C)

### Ulasan

Pelepasan CO<sub>2</sub> sangat tergantung pada sifat fisik dan kimia tanah yang diteliti. Suhu dan kandungan air tanah mempengaruhi kecepatan produksi CO<sub>2</sub>. Kadar CO<sub>2</sub> yang diukur pada dasarnya merupakan hasil dari respirasi mikroba, fauna tanah, akar tanaman, dan produksi CO<sub>2</sub> abiotik. Dalam pengukuran di lapang perlu diusahakan agar struktur tanah tidak terganggu.

### Daftar Pustaka

- Alef K. 1995. Estimation of soil respiration. p 464-467. *In* Alef K, Nannipieri P (Eds.) *Methods in Applied soil microbiology and Biochemistry*. Academic Press. London.
- Alexander M. 1977. *Introduction to Soil Microbiology*. 2nd edition, John Wiley and Sons. New York.
- Anas I. 1989. *Petunjuk Laboratorium Biologi Tanah dan Praktek*. Pusat Antar Universitas Bioteknologi. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Davidson EA, Trumbore SE, Amundson R. 2000. Soil warming and organic carbon content. *Nature* 408:789–790.
- Husen E, Salma S, Agus F. 2014. Peat emission control by groundwater management and soil amendments: evidence from laboratory experiments. *Mitig. Adapt. Strateg. Glob. Change* 19: 821–829.
- Makiranta P, Laiho R, Fritze H, 2009. Indirect regulation of heterotrophic peat soil respiration by water level via microbial community structure and temperature sensitivity. *Soil Biol. Biochem.* 41: 695-703.
- Smith VR. 2005. Moisture, carbon and inorganic nutrient controls of soil respiration at a sub-Antarctic island. *Soil Biol. Biochem.* 37:81–91.



Tabel 1. Pengekstrak formazan dan panjang gelombang pengukuran absorbansi

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

(1968) yang telah dimodifikasi (Öhlinger 1996) 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 CaCO<sub>3</sub> hanya dikhususkan untuk tanah-tanah masam. Keuntungan menggunakan larutan ekstraksi methanol karena tidak merusak bahan kuvet dan hasilnya sama baiknya dengan aseton.

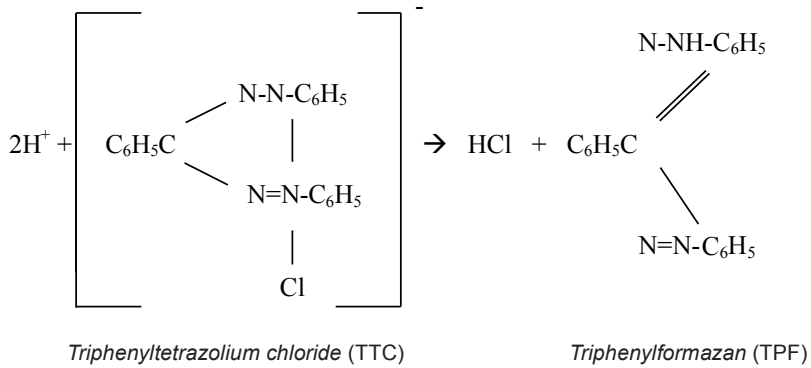
### Aktivitas Dehidrogenase dengan Substrat TTC (modifikasi metode Casida 1964, Öhlinger 1996)

#### 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.

#### 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



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

### 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,
  - 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<sup>-1</sup>)
  - 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 masukkan 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 ke-empat (kontrol) hanya mengandung 5 ml bufer Tris-HCl (tanpa TTC).
- Aduk campuran reaksi dengan vorteks (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  $\mu\text{g TPF mL}^{-1}$ . 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  $\mu\text{g TPF}$  dalam filtrat dengan cara mengonversikan 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,

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

BK = berat kering 1 g tanah lembap

5 = berat tanah yang digunakan (g)

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

## 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 dimetil-formamida 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<sup>-1</sup>)
  - 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  $\mu\text{g INTF per gram berat kering dan waktu inkubasi}$ .

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

$$S1 = \text{INTF contoh } (\mu\text{g})$$

$$S0 = \text{INTF kontrol } (\mu\text{g})$$

$$\text{Bk} = \text{berat kering 1 g tanah}$$

### 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  $\text{O}_2$  yang dipakai dan  $\text{CO}_2$  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  $\text{Fe}^{2+}$ , 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* Alef K, Nannipieri P (Eds.) *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press. London.
- Camiña F, Trasar-Cepeda C, Gil-Sotres F, Leirós C. 1998. Measurement of dehydrogenase activity in acid soils rich inorganic matter. *Soil Biol Biochem* 30:1005–1011.
- Casida LE Jr, Klein DA, Santoro T. 1964. Soil dehydrogenase activity. *Soil Science* 98:371-376.
- Friedel JK, Molter K, Fischer WR. 1994. Comparison and improvement of methods for determining soil dehydrogenase activity by using triphenyl tetrazolium chloride and iodinitrotetrazolium chloride. *Biol. Fertil. Soils* 18:291-296.
- Ghaly AE, Kok R, Ingrahm JM. 1989. Growth rate determination of heterogeneous microbial population in swine manure. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 22: 59-78.
- Gottschalk G. 1979. *Bacterial Metabolism*. Springer-Verlag. New York Heidelberg Berlin.
- Öhlinger H, Von Mersi W. 1996. Enzymes Involved in Intracellular Metabolism. *In* Schinner F, Öhlinger R, Kandeler E, Margesin R (Eds) *Methods in Soil Biology*. Springer, Berlin, Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-60966-4\\_15](https://doi.org/10.1007/978-3-642-60966-4_15)

- Ohlinger R. 1995. Enzymes involved in intracellular metabolism. p. 235-245. *In* Schinner F, Öhlinger R, Kandeler E, Margesin R (Eds) *Methods Soil Biology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Tabatabai 1994. Soil enzymes. p 820-823. *In* Weaver RW, Angle S, Bottomley P, Bezdicek D, Smith S, Tabatabai A, Wollum A (Eds.) *Methods of Soil Analysis (Microbiological and Biochemical Properties)*. SSSA. Wisconsin, USA.
- Thalman A. 1968. Zur Methodik der bestimmung der dehydrogenase aktivität im boden mittels triphenyltetrazoliumchlorid (TTC). *Landwirtsch. Forsch*, 21, 249- 258.
- Velmourougane K, Venugopalan MV, Bhattacharyya T, Sarkar D, Pal DK, Sahu A, Ray SK, Nair KM, Prasad J, Singh RS. 2013. Soil dehydrogenase activity in agro-ecological sub regions of black soil regions in India. *Geoderma*. 197–198 : 186–192.
- Von Mersi W, Schinner F. 1991. An improved and accurate method for determining the dehydrogenase activity of soils with idonitro-tetrazolium chloride. *Biol. Fertil.* 11(3): 216-220.
- Wolińska A, Stepniewska Z. 2012. Dehydrogenase Activity in the Soil Environment. *In* Canuto R.A. (Ed.). *Dehydrogenase*. Chapter 8, p. 183-210. Intech Publisher.

# 3.4

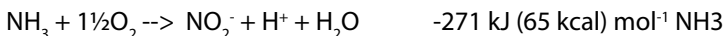
## AKTIVITAS NITRIFIKASI

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 *Nitrosospira* (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  $\text{NH}_4^+$  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 dan Rosswall (1985) dan Schmidt dan Belser (1994).

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

### **Prinsip**

Pengukuran laju nitrifikasi dengan metode ini didasarkan atas penetapan nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) setelah contoh tanah diinkubasi dengan larutan natrium klorat ( $\text{NaClO}_3$ ), dengan atau tanpa ammonium sulfat, selama 5 atau 24 jam pada suhu  $25^\circ\text{C}$ . Penambahan klorat bertujuan untuk memblokir oksidasi lanjutan dari nitrit yang terbentuk. Dengan demikian, laju  $\text{NO}_2^-$  yang terbentuk setara dengan laju oksidasi  $\text{NH}_4^+$ , sehingga hanya kandungan  $\text{NO}_2^-$  saja yang perlu diukur.

### **Bahan dan Alat**

- Tabung Erlenmeyer (ukuran 100 mL)
- Kertas saring
- Inkubator dengan pengatur suhu  $25^\circ\text{C}$
- Spektrofotometer

### **Bahan kimia dan larutan**

- Larutan natrium klorat I (1,5 M  $\text{NaClO}_3$ )
  - Larutkan 15,97 g  $\text{NaClO}_3$  dalam 70 mL akuades, kemudian tambahkan akuades sampai volume mencapai 100 mL.
- Larutan natrium klorat II (75 mM  $\text{NaClO}_3$ )
  - 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  $\text{NH}_4\text{Cl}$  dalam akuades, atur pH sampai 8,5 dengan  $\text{NH}_4\text{OH}$ , 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  $4^\circ\text{C}$ .
- Larutan standar nitrit ( $10 \mu\text{g N ml}^{-1}$ )
  - Encerkan 5 mL larutan stok nitrit dengan akuades sampai volume mencapai 500 mL.

## Prosedur

### 1. 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  $25^\circ\text{C}$ . Tabung ketiga sebagai kontrol disimpan pada suhu  $-20^\circ\text{C}$ .
- 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).

### 2. 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  $25^\circ\text{C}$ . Tabung ketiga sebagai kontrol segera disimpan pada suhu  $-20^\circ\text{C}$ .
- 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:

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

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).

## 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<sub>3</sub>) 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:

$$dS/dt = [k_0SX/(K_m + S)]$$

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  $k_0$  adalah aktivitas maksimum per sel ( $k_0X = V_{max}$ , velositas maksimum ekspresi Michaelis-Menten standar). Dalam kondisi  $S \gg K_m$ , maka  $X$  dapat diestimasi dengan hanya mengetahui data  $k_0$  dan  $dS dt^{-1}$  dengan persamaan:

$$X = (dS dt^{-1}) / k_0$$

Laju oksidasi substrat  $dS dt^{-1}$  ditetapkan seperti metode yang telah diuraikan. Nilai  $k_0$  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*, *Nitrospira*, *Nitrosolobus*, dan *Nitrobacter*.

### Daftar Pustaka

- Alef K. 1995. Nitrogen mineralization in soils. p 234-257. In Alef K, Nannipieri P. (Eds.) *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press. London.
- Belser LW, Schmidt EL. 1980. Growth and oxidation of ammonia by three genera of ammonium oxidizers. *FEMS Microbiol. Lett.* 7:213-216.
- Berg P, Rosswall T. 1985. Ammonium oxidizer numbers, potential and actual oxidation rates in two Swedish arable soils. *Biol Fert Soils* 1:131-140.
- Myrold, DD. 1997. Transformation of nitrogen, p 259-294. In Silvia DM, Fuhrmann JJ, Hartel PG, Zuberer DA (Eds.) *Principles and Applications of Soil Microbiology*. Prentice Hall. New Jersey.
- Roper MM, Ophel-Keller KM. 1997. Soil microflora as bioindicators of soil health. p 157-177. In Pankhurst C, Doube BM (Eds.) *Biological Indicators of Soil Health*. CAB International. New York.
- Schmidt EL, Belser LW. 1994. Autothrophic nitrifying bacteria. p 159-177. In Weaver RW, Angle S, Bottomley P, Bezdicsek D, Smith S, Tabatabai A, Wollum A. (Eds.) *Methods of Soil Analysis (Microbiological and Biochemical Properties)*. SSSA. Wisconsin, USA.

*It were not best that we should all think alike; it is difference of opinion that makes horse-races.*

Mark Twain

# 3.5

## AKTIVITAS DENITRIFIKASI

Edi Husen, Etty Pratiwi, Erny Yuniarti, Dila Aksani,  
RDM Simanungkalit

Denitrifikasi secara sederhana disebut proses reduksi nitrat menjadi gas nitrogen. Prosesnya terjadi bertahap yang melibatkan mikroba yaitu dari nitrat menjadi *nitrit* ( $\text{NO}_2^-$ ), *nitric oxide* ( $\text{NO}$ ), *nitrous oxide* ( $\text{N}_2\text{O}$ ), dan, akhirnya gas dinitrogen ( $\text{N}_2$ ) yang difasilitasi oleh enzim nitrat reduktase, nitrit reduktase, nitric oxide reduktase, dan nitrous oxide reduktase. Bakteri denitrifikasi ini mencakup 0,1 sampai 5% dari total bakteri tanah dan mencakup grup taksonomi yang beragam (Myrold 1997), antara lain *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Paracoccus*, dan *Pseudomonas*. Pengukuran aktivitas denitrifikasi yang disajikan dalam buku ini adalah pengukuran laju aktivitas denitrifikasi aktual dan potensial dari contoh tanah yang diambil dan pengukuran in situ di lapangan.

Pada kondisi oksigen terbatas dalam tanah, berbagai bakteri aerobik menggunakan nitrat sebagai akseptor hidrogen alternatif. Nitrat direduksi lewat nitrit menjadi oksigen nitrous dan akhirnya menjadi molekul dinitrogen. 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  $\text{N}^{15}$  dengan menaksir senyawa berlabel  $\text{N}^{15}$  yang tidak dapat diperoleh (*non-recovery*). Pada metode ini hanya evolusi gas yang berlabel  $\text{N}^{15}$ , yang berasal dari pupuk yang ditetapkan (Chichester & Smith 1978). Metoda 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.* 1979). Metode yang ketiga berdasarkan penghambatan reduksi  $\text{N}_2\text{O}$  menjadi  $\text{N}_2$  oleh bakteri dengan memberikan asetilen ( $\text{C}_2\text{H}_2$ ) dan menetapkan denitrifikasi semua N-nitrat tanpa memperhatikan asalnya. Teknik penghambatan asetilen dapat dipakai untuk penelitian laboratorium maupun untuk penelitian lapang (Ryden *et al.* 1979, Nieder *et al.* 1989). Dalam bab ini hanya metode ketiga yang dikemukakan.

### **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 lapang 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<sup>-1</sup>
- Gas pembawa untuk ECD: nitrogen 5,0, laju alir 45 mL menit<sup>-1</sup>
- Make up gas untuk ECD: nitrogen 5,0, laju alir 8 mL menit<sup>-1</sup>
  - 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 : N<sub>2</sub>O ; 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 N<sub>2</sub>O dalam N<sub>2</sub> atau He. Sesuai dengan gas pembawa)
- Asetilen (solvent-free)

#### **Prosedur**

- Timbang 30 g tanah lapang 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°C. 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°C.

- Untuk menetapkan pengaruh bahan kimia terhadap denitrifikasi, aktifitas dapat ditingkatkan dengan penambahan nitrat ( $200 \mu\text{g N g}^{-1} \text{ dm}$ ) dan glukosa ( $180 \mu\text{g C g}^{-1} \text{ dm}$ )
- 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  $50 \mu\text{L}$  gas murni untuk TCD, atau  $1\text{-}10 \mu\text{L}$  gas murni untuk ECD) beberapa kali.
- Bila campuran gas kalibrasi (rasio campuran diketahui) digunakan untuk kalibrasi,  $\mu\text{L N}_2\text{O}$  harus dihitung dari volume yang diinjeksikan. Bila gas murni yang dipakai untuk kalibrasi,  $\mu\text{L N}_2\text{O}$  yang diinjeksikan diketahui, dan volume  $\text{N}_2\text{O}$  ( $\mu\text{L}$ ) yang diinjeksikan harus dikonversikan menjadi  $\mu\text{g}$  (lihat Rumus 1 di bawah).
- Untuk membuat kurva kalibrasi, letakkan  $\mu\text{g N}_2\text{O}$  yang diinjeksikan pada kondisi standar  $\{20^\circ\text{C}$  ( $293^\circ\text{K}$ ) dan  $760 \text{ T}$  ( $101\ 300 \text{ Pa}$ )}, yang dihitung dengan Rumus 1, terhadap daerah puncak terukur. Dengan cara ini, memungkinkan untuk membandingkan contoh-contoh pada level standar. Hitung  $\mu\text{g N}_2\text{O}$  contoh dari kurva kalibrasi, dan konversikan menjadi  $\mu\text{g N}_2\text{O-N g}^{-1} \text{ dm h}^{-1}$  (lihat Rumus 2 di bawah).

$\mu\text{g N}_2\text{O}$  yang diinjeksikan (standar) =  $(P.V_N \cdot 10^{-9} \cdot \text{mw} \cdot 10^6) / (R.T)$  --- Rumus 1

$X.V.0,6363.100 = IV.t.SW.\% \text{ dm}$  --- Rumus 2

P = tekanan atmosfer standar (101 300 Pa)

$V_N$  = volume  $\text{N}_2\text{O}$ -standar ( $\mu\text{L}$ ) yang diinjeksi

$10^{-9}$  = faktor konversi volume ( $1 \mu\text{L} = 10^{-9} \text{ m}^3$ )

mw = berat molekul  $\text{N}_2\text{O}$

$10^6$  = faktor konversi ( $1 \text{ g} = 10^6 \mu\text{g}$ )

R = konstanta gas ( $8,31 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ )

T = suhu standar (293 K)

X =  $\mu\text{g N}_2\text{O}$  volume sampel yang diinjeksikan

V = volume total labu inkubasi – volume tanah (mL)

- 0,6363 = faktor untuk mengubah  $N_2O$  menjadi  $N_2O-N$   
 IV = volume contoh yang diinjeksikan (mL)  
 T = waktu inkubasi (jam)  
 SW = berat awal tanah  
 $100.\%^{-1} dm$  = faktor untuk bahan kering tanah oven  $105^\circ C$

#### Catatan

- ECD sebagai pengganti TCD haruslah dipakai untuk menentukan denitrifikasi pada kondisi aktual. TCD kurang sensitif untuk mendeteksi  $N_2O$  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 lapang dengan adaptasi khusus (Ryden *et al.* 1979b)
- Dengan bentuk eksperimen yang sama, pengukuran gas-gas lain, seperti  $CO_2$ ,  $N_2$  atau  $O_2$  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.

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

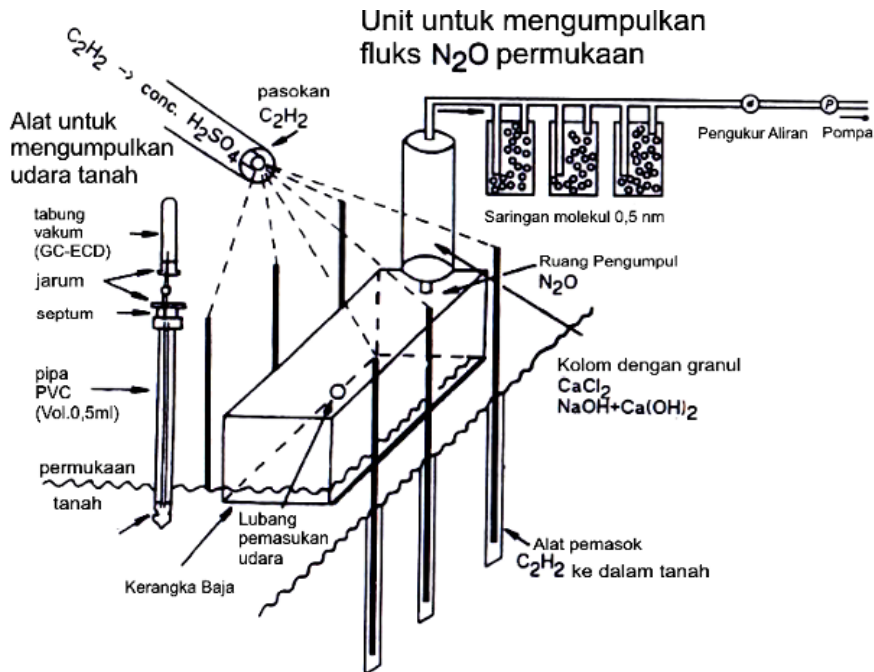
### **Prinsip**

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 ( $HC = CH$ ). Reduktase  $N_2O$  memiliki afinitas yang tinggi terhadap  $C_2H_2$ , karena  $C_2H_2$  memiliki struktur yang sama dengan  $N_2O$  ( $N = N - O$ ). 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 (lihat 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 nm).
- Sumbat karet
- Pipa gelas (garis tengah 0,5 mm)
- Pipa karet (garis tengah 0,5 mm)
- Pengukur aliran ( $0-70 L min^{-1}$ ) dengan katup jarum
- Pompa vakum
- Pipa PVC (panjang 1 m, garis tengah 6 mm untuk memasukkan  $C_2H_2$  ke dalam tanah
- Pipa polietilen (garis tengah 6 dan 10 mm)
- Bor tanah listrik (10 mm x 60 cm)
- Labu Erlenmeyer (1000 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  $N_2O$ , gunakan GC yang dilengkapi dengan ECD dan/atau TCD. Untuk ECD, kisaran deteksi adalah 0,1 – 400 ng  $N_2O-N$ , sedang untuk TCD kira-kira 0,1 – 50  $\mu g N_2O-N$ .

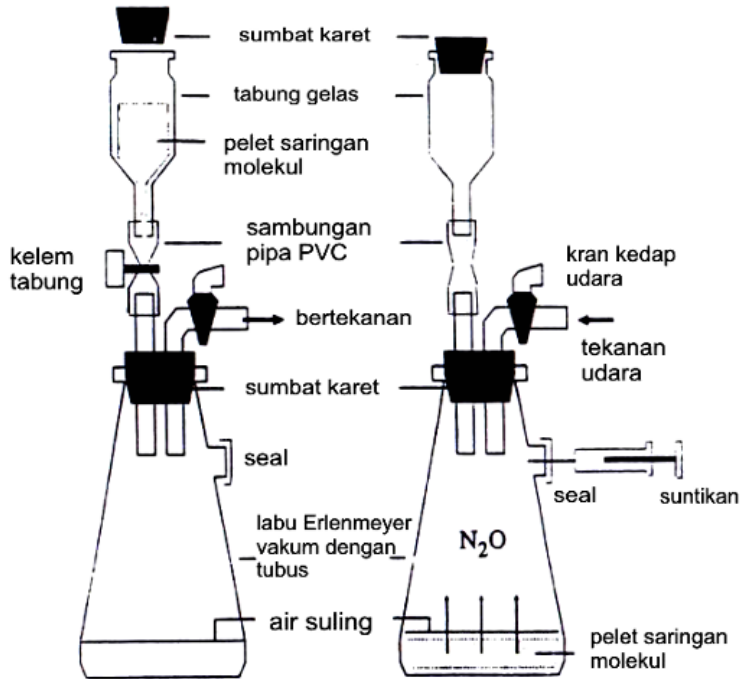


Gambar 1. Alat untuk penetapan jumlah total kehilangan karena denitrifikasi dengan TPA (Ottow et al. 1995)

- Kolom metal: panjang 2 m, Filling : Porapak Q, 60 – 80 mesh
- Gas pembawa untuk ECD:  $N_2$  (ECD bermutu) atau campuran  $Ar/CH_4 = 95/5$ , laju alir: 30 mL menit<sup>-1</sup>
- Gas susulan (make up) untuk ECD:  $N_2$  atau  $Ar/CH_4 = 95/5$ , laju alir: 40 mL menit<sup>-1</sup>
- Gas pembawa untuk TCD : He, laju alir: 30 mL.menit<sup>-1</sup>
- Suhu oven : 40°C
- Suhu injektor : 60°C
- Suhu ECD : 300°C
- Suhu TCD : 150°C

### Bahan kimia dan reagen

- Asetilen (mutu: teknis)
- $N_2$  (mutu ECD)
- He (kemurnian 99,996% v/v)
- Gas kalibrasi
  - $N_2O$  dilarutkan dalam  $N_2$  (100 ppmv, 99,995 v/v)
  - $CO_2$ ,  $O_2$  dan  $N_2O$  (99,995 v/v)



Gambar 2. Alat untuk melepaskan  $N_2O$  yang diadsorpsi dengan saringan molekuler (pellet 0,5 nm) yang telah dikumpulkan di lapang (Ottow et al. 1995)

- Saringan molekuler (0,5 nm, pellet 2mm)
- $CaCl_2$  granul
- NaOH dan  $CaCl_2$  (dalam bentuk granul yang tersedia secara komersial)
- $H_2SO_4$  pekat (96-98%)

### 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 fotosintesis 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 ekuilibrase (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 1000 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 dikurang, hitung fluks  $N_2O$  permukaan dalam  $g N_2O-N ha^{-1} hari^{-1}$  (lihat penjelasan di atas). 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

#### 1. 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  $N_2O-N$  alami pada tempat yang sama tanpa mendirius asetilen
2. Keterbatasan TPA
- heterogenitas tanah (terutama pada sebaran bahan organiknya) dan juga variabilitas temporal dan spatial proses denitrifikasi pada keadaan lapang.
  - 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 lapang perlu.

### Daftar Pustaka

- Bauernfeind G. 1995. Actual and potential denitrification rates by acetylene-inhibition technique. p. 151-155. *In* Schinner F, Öhlinger R, Kandeler E, Margesin R. (Eds.) *Methods in Soil Biology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Chichester FW, Smith SJ. 1978. Disposition of  $^{15}N$  labeled fertilizer nitrate applied during corn culture in field lysimeters. *J. Environ. Qual.* 7: 227 – 232.
- Myrold DD. 1997. Transformation of nitrogen, p 259-294. *In* Silvia DM, Fuhrmann JJ, Hartel PG, Zuberer DA (Eds.) *Principles and Applications of Soil Microbiology*. Prentice Hall. New Jersey.
- Nieder R, Scholl-Mayer G, Richter J. 1989. Denitrification in the rooting zone of cropped soils with regard to methodology and climate : a review. *Biol. Fertil. Soils* : 8: 219 – 226.
- Ottow JCG, Benckiser G, Lorch HJ. 1995. In situ quantification of total denitrification losses by acetylene-inhibition technique. p. 155-161. *In* Schinner F, Öhlinger R, Kandeler E, Margesin R. (Eds.) *Methods in Soil Biology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Ryden JC, Lund LJ, Focht DD. 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 JC, Lund LJ, Focht DD. 1979b. Direct measurement of denitrification loss from soils. II. Development and application of field methods. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 43: 110 – 118.

- Tiedje JM. 1982. Denitrification. p. 1011-1026. In Page AL, Miller RH, Keeney DR. (Eds.) Methods of Soil Analysis. Part 2. Am. Soc. Agron, Soil Sci. Soc. Am. Madison, Wisconsin.
- Wilhelm E, Battino R, Wilcock RJ. 1977. Low pressure solubility of gases in liquid water. Chem. Rev. 77: 219 –262.

# 4

## AKTIVITAS ENZIM

---

---

Aktivitas enzimatis di dalam tanah terutama berasal dari mikroba, yang berasal dari intraseluler, enzim yang berasosiasi dengan sel atau enzim bebas. Oleh karena itu mikroba dapat dinilai bertindak sebagai indikator utama kesehatan tanah, karena memiliki efek aktif pada siklus nutrisi, juga mempengaruhi sifat fisik dan kimia tanah. Enzim tanah ini berperan penting bagi kesehatan tanah sebagai mediator langsung untuk katabolisme biologis komponen organik dan mineral tanah dan mereka sering terkait erat dengan bahan organik tanah, sifat fisik tanah, dan aktivitas mikroba atau biomassa.

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 atau anorganik, yaitu kitinase, ligninase, selulase, fosfatase, protease, dan urease.

*Yeasts, molds, mushrooms, mildews, and the other fungi pervade our world. They work great good and terrible evil, upon them, indeed hangs the balance of life; for without their presence in the cycle of decay and regeneration, neither man nor any other living thing could survive.*

Lucy Kavalier

# 4.1

## KITINASE

Rohani Cinta Badia Ginting

Kitin merupakan homopolimer  $\beta$ -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 (Jeuniaux, 1966, Cabib 1987) yaitu:

- Berdasarkan pengurangan substrat.
  - Metode viskosimetri yaitu aktivitas kitinase terhadap kitosan, glikol kitin,

atau karboksimetilkitin yang ditunjukkan oleh pengurangan viskositas substrat.

- 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).
- 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.
- Pengujian spektrofotometer yaitu menggunakan kromogen 3,4, *dinitrophenil tetra-N asetilkhitotetraose*.
- Pengujian radiomotor.

### **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 37°C. 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 100°C
- 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 *stirrer*

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  $\text{NaN}_3$  per 1.000 mL. Simpan larutan pada suhu 4°C.

- Bufer fosfat 0,12M, pH 6,0
  - Larutkan 16,13 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,2 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; dan 0,2 g  $\text{NaN}_3$  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  $\text{H}_3\text{BO}_3$  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  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .
- Selanjutnya tentukan kerapatan optis masing-masing konsentrasi N-asetil glukosamin seperti langkah-langkah tersebut untuk mendapatkan kurva kalibrasi.

### Perhitungan

Aktivitas kitinase diekspresikan oleh banyaknya ( $\mu\text{g}$ ) 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:

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

Keterangan:

- C = konsentrasi N-asetil glukosamin yang diukur dalam  $\mu\text{g}$  per mL.
- V = volume akhir larutan yang ditambahkan ke dalam tanah (20 mL).
- bk = berat kering 1 g tanah.

## Ulasan

- Waktu inkubasi antara 4 dan 24 jam menghasilkan reaksi linier (Rossner 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 ( $\text{NaN}_3$ ) sebagai pengganti toluena, nilai pH buffer, konsentrasi substrat, ekstraksi N-asetilglukosamin dengan KCl, dan reaksi pewarnaan.
- Rossner (1991) menggunakan  $\text{NaN}_3$  sebagai pengganti toluena untuk menghambat aktivitas mikroba.

## 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 ( $4^{\circ}\text{C}$ ) 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  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  dengan cara melarutkan 27,6 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  dalam 1 L akuades dan stok larutan 0,2M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  dengan cara melarutkan 28,4  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  dalam 1 L akuades. Selanjutnya campur 81,5 mL stok larutan 0,2M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  dengan 19,5 mL stok larutan 0,2M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ . 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 4°C.
- 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 4°C, 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 37°C 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 (1995).

### Perhitungan

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

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

Keterangan:

A = Aktivitas kitinase (unit)

[N-AGA] = Konsentrasi N-asetilglukosamin

BM N-AGA = Berat molekul N-asetilglukosamin

T = waktu inkubasi

### Daftar Pustaka

- Alef K, Nannipieri P. 1995. Chitinase activity. p. 360-361. In Alef K, Nannipieri P (Eds.) *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Acad. Press. London.
- Berges LR, Reynolds DM. 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 Meister A (Ed.) *Advances in Enzymology*. Vol. 59. An Interscience Publ. John Wiley and Sons Inc. N.Y.
- Chernin L, Ismailo Z, Haran S, Chet I. 1995. Chitinolytic *Enterobacter agglomerans* antagonistic to fungal plant pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1720-1726.
- Harman GE, Hayes CK, Lorito M, Broadway RM, Di Pietro D, Peterbauer C, Tronsmo A. 1993. Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*: Purification of

- chitobiosidase and endochitinase. *Phytopathology* 83: 313-318.
- Inbar J, Chet I. 1991. Evidence that chitinase produced by *Aeromonas caviae* s 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* Neufeld EF, Ginburg V (Eds.) *Complex Carbohydrates, Methods in Enzymology*. Vol. VII. Acad. Press. N.Y.
- Monreal J, Reese ET. 1968. The Chitinase of *Sereia marcescens*. *Can. J Microbiol.* 15:689-696.
- Reissig JL, Strominger JL, Leloir LF. 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., Godoy G, Morgan-Jones G, Shelby RA. 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* Schinner F, Öhlinger R, Kandeler E, Margesin R (Eds.) *Methods in Soil Biology*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Scopes RK. 1944. *Protein Purification Principles & Practice.* 3rd Ed. Springer-Verlag, New York.
- Tsujibo H, Yoshida Y, Miyamoto K, Hasegawa T, Inamori Y. 1992. Purification and properties of two types of chitinase produced by alkalophilic actinomycete. *Bisci. Biotech. Biochem.* 56: 1304-1305.
- Veon K, Mikiyeshite, Sawado Y, Obe Y. 1990. Assay chitinase and N-acetylglucosamidase activity in forest soils with 4-methylumbelliferyl derivates. *Z. Pflanzenernähr Bodenkd.* 154: 171-175.
- Yanai K, Kojima N, Takaya N, Horiuchi H, Ohta A. 1994. Isolation and characterization of twon chitin synthase genes from *Aspergillus nidulans*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56:1828-1835.

## 4.2

# LIGNINASE

Surono, Erny Yuniarti, Rasti Saraswati

Lignin merupakan polimer aromatik kompleks yang menyusun 20-30% tanaman kayu dan jaringan vaskuler lainnya, yang biasanya menjadi limbah di pertanian jika tidak dikelola atau dikomposkan sebagai sumber bahan organik (Huang *et al.* 2008). Polimer lignin tersusun atas monomer fenilpropana yang umumnya terdiri atas monomer p-kumaril alkohol, koniferil alkohol, dan sinapil alkohol (Gambar 1, Buswell & Odier 1987). 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 (Buswell & Odier 1987, Palonen 2004).

Ikatan eter merupakan ikatan yang paling banyak pada polimer lignin (dua pertiga) atau lebih dan sisanya adalah ikatan karbon dengan karbon (Sjostrom 1995). Gugus fungsional yang mempengaruhi reaktivitas lignin meliputi gugus hidroksi fenol, metoksil, benzil alkohol, dan gugus karbonil (Sjostrom 1995). 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 (Martinez *et al.* 2005). Karakterisasi enzim-enzim ligninolitik telah banyak dilakukan terhadap basidiomisetes terutama fungi pelapuk putih (*white rot fungi*) (Kameshwar & Qin 2017). 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 (Okhuma *et al.* 2001, Góralczyk-Binkowska *et al.* 2020). 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 (Guillen *et al.* 2000). Oksidasi metoksihidrokuinon selama degradasi lignin



Tabel 1. Enzim ligninolitik dan fungsi reaksinya

Enzim dan singkatan	Kofaktor	Substrat, mediator	Reaksi
Lignin peroksidase, LiP	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Veratril alkohol	Cincin aromatik dioksidasi menjadi radikal kation
Manganase peroksidase, MnP	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Mn, asam-asam organik, kelator, tiol, 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 <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	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 <sub>2</sub>	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 <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Aril alkohol oksidase, AAO		Aromatik alkohol (anisil, veratril alkohol)	Aromatik alkohol dioksidasi menjadi aldehid; produksi H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Enzim-enzim lain yang memproduksi H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		Banyak senyawa organik	O <sub>2</sub> dioksidasi menjadi H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>

Sumber: Lankinen (2004)

supernatan biakan dideterminasi secara kualitatif dan cepat dengan metode plate assay menggunakan medium agarose (0,5%) cawan mengandung 14 µmol mL<sup>-1</sup> 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.

## Pengukuran Aktivitas Ligninase

### Alat

- Spektrofotometer
- Kuvet
- Sentrifus dan ultrasentrifus
- Mikropipet (5 ml, 1 mL, 200  $\mu$ L, 20  $\mu$ L)
- Ultrafilter Amicon

### Bahan

- Media produksi (Glenn & Gold 1985, modifikasi)
  - Larutkan 0,6 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,5 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,4 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 0,1 g  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ; 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  $\text{MnSO}_4$ , 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  $\mu$ L akuades dari 100 ml akuades dalam botol gelap lalu masukkan ke dalamnya 11,85  $\mu$ 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

- $\text{H}_2\text{O}_2$  50  $\mu$ M
  - Ambil 510  $\mu$ L akuades dari 100 ml akuades dalam botol gelap lalu masukkan ke dalamnya 11,85  $\mu$ L  $\text{H}_2\text{O}_2$  (9,79 M), kocok dengan magnet pengocok.
- $\text{MnSO}_4$  0,2 mM
  - Larutkan 30,204 g  $\text{MnSO}_4$  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  $\mu$ L 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

1. Penyiapan enzim ekstrak kasar dari Supernatan biakan murni
  - Tumbuhkan fungi dalam medium produksi enzim Glenn dan 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.).
2. Penyiapan enzim ekstrak kasar dari kompos
  - Siapkan 2,27 kg kompos yang ditumbuhi miselium fungi lalu pres dengan pres hidraulik kecil (660 lbs in<sup>-2</sup>) 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.
3. 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  $\mu\text{mol}$  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  $\mu\text{L}$  larutan biakan uji, lubang kedua dengan 20  $\mu\text{L}$  larutan biakan uji yang dipanaskan pada air mendidih selama 5 menit dan digunakan sebagai kontrol negatif. Kemudian isi lubang ketiga dengan 2  $\mu\text{L}$  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.
4. Mangan peroksidase (MnP) dengan guaiakol sebagai substrat (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 $\mu\text{M}$ $\text{H}_2\text{O}_2$	-
0,2 mM $\text{MnSO}_4$	-
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 mmol guaiakol per menit. Jumlah guaiakol yang hilang dihitung dengan rumus sbb:

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

Keterangan:

$\Delta c$  = jumlah guaiakol yang hilang selama pengamatan ( $\text{mol L}^{-1}$ )

$A_0$  = 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)

Aktivitas total enzim =  $\Delta c_1 \times 10^6 \times \text{vol. LT} \times 10^3 / \text{menit} \times \text{vol. LE (mL)}$

Aktivitas lakase =  $\Delta c_2 \times 10^6 \times \text{vol. LT} \times 10^3 / \text{menit} \times \text{vol. LE (mL)}$

Keterangan:

$\Delta c_1$  = perubahan absorbansi campuran reaksi I sebelum dan sesudah inkubasi

$\Delta c_2$  = perubahan absorbansi campuran reaksi II sebelum dan sesudah inkubasi

vol. LT = Volume larutan total

vol. LE = Volume larutan enzim

#### 5. 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  $\text{H}_2\text{O}_2$
- Kocok perlahan campuran reaksi dengan vortex lalu diinkubasi selama 15 menit pada suhu ruang.
- Untuk larutan kontrol, didihkan campuran reaksi pada  $60^\circ\text{C}$  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 1mmol veratral alkohol menjadi veratraldehid per menit. Jumlah veratraldehid yang dihasilkan dihitung dengan rumus sbb:

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

Keterangan:

$\Delta c$  = jumlah veratraldehid yang terbentuk selama t menit ( $\text{mol L}^{-1}$ )

$A_0$  = 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)

$$\text{Uni aktivitas LiP} = \Delta c \times 10^6 \times \text{vol. LT} \times 10^3 / \text{menit} \times \text{vol. LE (mL)}$$

6. 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 siringaldazina 0,075 mM
  - 0,5 mL larutan enzim
- Kocok perlahan campuran reaksi dengan vortex lalu inkubasi selama 15 menit pada suhu ruang.
- Untuk kontrol, dididihkan 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  $\mu\text{mol}$  siringaldazina menjadi kuinon per menit. Jumlah kuinon yang dihasilkan dihitung dengan rumus sbb:

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

Keterangan:

$\Delta c$  = 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)

$$\text{Unit aktivitas lakase} = \Delta c \times 10^6 \times \text{vol. LT} \times 10^3 / \text{menit} \times \text{vol. LE (mL)}$$

### 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 AM, Anton LH, Orth AB. 1994. Lignin-degrading enzymes of the commercial button mushroom, *Agaricus bisporus*. Applied and Environmental Microbiology 60: 960-965.
- Boominathan K, Das SB, Randall TA, Redy CA. 1990. Lignin peroxidase-negative mutant of the White Rot Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. J. Bacteriology. 172: 260-265.
- Buswell JA, Odier E. 1987. Lignin biodegradation. Rev. Biotechnol. 6: 1-60.
- Conesa A, Punt PJ, Van den Hondel CA. 2002. Fungal peroxidase: molecular aspects and application. J. Biotechnol. 93: 143-158.
- Dey S, Maiti TK, Bhattacharya BC. 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 CU, Temp U, Eriksson KE. 1996. Laccase-producing white-rot fungus lacking lignin peroxidase and manganese peroxidase. ACS Symp. Ser. 655: 130-150.
- Glenn JK, Gold MH. 1985. Purification and characterization of an extracellular Mn(II)-dependent peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete. *Phanerochaete chrysosporium*. Arch. Biochem. Biophys 242: 329-341.
- Góralczyk-Binkowska A, Jasinska A, Długonski A, Płocinski P, Długonski J. 2020. Laccase activity of the ascomycete fungus *Nectriella pironii* and innovative strategies for its production on leaf litter of an urban park. PloS One 15 (4), e0231453.
- Guillen F, Munot C, Gomes-Toribio V, Martinez AT, Martinez MJ. 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.
- Huang DL, Zeng GM, Feng CL, Hu S, Jiang XY. 2008. Degradation of lead-contaminated lignocellulosic waste by *Phanerochaete chrysosporium* and the reduction of lead toxicity. Environ Sci Technol 42: 4946-4951.
- Kameshwar AKS, Qin W. 2017. Qualitative and quantitative methods for isolation and characterization of lignin-modifying enzymes secreted by microorganisms. BioEnergy Res. 10 (1), 248-266.
- 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].
- Martinez AT, Speranza M, Ruiz-Duenas FJ, Ferreira P, Camarero S. 2005. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack

of lignin. *Int Microbiol* 8: 195–204.

Okuhuma M, Maeda Y, Johjima T, Kudo T. 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, D'souza TM, Boominathan K, Reddy CA. 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 Applications*, second edition.

Thurson CF. 1994. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*. 140: 61-73

Tuor U, Winterhalter K, Fiechter A. 1995. Enzyme of white rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. *J. Biotechnol.* 41: 1-17.

## 4.3

# SELULASE

*Selly Salma, Rosmimik*

Reaksi hidrolisis selulosa secara enzimatik memegang peranan penting dalam siklus karbon di alam. Selain disebabkan oleh sedikitnya jumlah mikroba pendegradasi selulosa di alam, juga disebabkan adanya senyawa rekasiltran sebagai komponen penyusun dinding sel tanaman. Mikroba selulolitik dan enzim selulase sangat besar keragamannya, hal ini disebabkan substrat yang dijumpai di alam terutama komponen dinding sel tanaman juga bervariasi (Wilson 2011).

Selulase adalah nama trivial enzim yang menghidrolisis ikatan  $\beta$ -1,4 glikosidik pada suatu polimer yang melepaskan unit-unit glukosa (Nishida *et al.* 2007). Ada beberapa bentuk dari selulosa yang digunakan sebagai substrat untuk mengukur aktivitas selulase. Selulosa mikrokristalin merupakan bentuk selulosa yang tidak larut dalam air, sedangkan carboxymethyl cellulose (CMC) larut dalam air. Selulosa mikrokristalin didegradasi dengan sangat lambat, sedangkan CMC dan turunannya relatif lebih cepat terdegradasi oleh fungi (Wilson 2011).

Enzim selulase merupakan suatu kompleks enzim yang terdiri atas tiga komponen enzim (Bisaria & Mishra 1989), yaitu:

- Exo- $\beta$ -1,4-glukanase / selobiohidrolase / CBH /  $\beta$ -1,4-D-glukan-4-selobiohidrolase, EC 3.2.1.91) yang reaktif pada substrat serat kapas dan avicel (mikrokristal selulosa) dengan struktur dimana ikatan hidrogennya sangat kuat.
- Endo-  $\beta$ -1,4-glukanase (endo- $\beta$ -1,4-D, 4-glukanohidrolase, E.C.3.2. 1-1) yang reaktif pada substrat selulosa yang telah dilonggarkan dengan asam seperti *carboxymethyl cellulose* (CMC) atau hydroxy ethyl cellulosa (HEC) merupakan substrat untuk mengukur degradasi dari selulosa amorf.
- $\beta$ -glukosidase (E.C.3.2.1.21) yang reaktif pada substrat selobiosa, nitrophenyl- $\beta$ -D-glukosa atau aryl glukosa lainnya.

Ketiga komponen enzim tersebut bekerja secara sinergis dalam mendekomposisi substrat selulosa. selodekstrin, selobiosa dan turunan selulosa lainnya (Fogarly & Kelly 1982). Selulase yang dihasilkan oleh mikroba, khususnya fungi, bersifat ekstraselular dimana proses hidrolisis selulosa dilakukan di luar sel mikroba. Selulase hanya diproduksi bila mikroba ditumbuhkan pada selulosa atau glukosa lain dengan ikatan  $\beta$ -1,4 seperti selobiosa, laktosa atau sophorosa. Fraksinasi dari protein selulase yang terdapat pada filtrat kultur fungi selulolitik berbeda dengan bakteri. Sistem selulolitik pada bakteri lebih sederhana dibandingkan dengan fungi, karena bakteri hanya mampu menghasilkan endoglukanase dan  $\beta$ -glukosidase saja, sedangkan selulase yang dihasilkan fungi terdiri atas tiga komponen enzim secara lengkap ( Enari 1983).

## Pengukuran Aktivitas Selulase

### Prinsip

Selulase adalah enzim yang mengkatalisis reaksi hidrolisis pada substrat yang merupakan polimer dari glukosa, dan termasuk tipe enzim adaptif. Reaksi enzimatik selulase pada substrat melepaskan gula pereduksi yg diukur dengan metode DNS. Sumber enzim yang digunakan adalah ekstrak enzim kasar yang dapat berasal dari tanah maupun dari mikroba.

### Alat

- Mikropipet P-1000 dan P-200
- Mikrotip 1000  $\mu$ l dan 200  $\mu$ L
- Tabung reaksi
- Inkubator shaker
- Neraca analitik ketelitian 2 desimal
- Autoklaf
- Pembakar bunsen
- pH meter
- Sterile cabinet / Laminar Air Flow (LAF)
- Vortex
- Tabung sentrifus
- Spektrofotometer

### Bahan

- Contoh sampel
- Medium Czapek
- Medium Hatami
- CMC (*Carboxymethyl cellulose*)
- Selulosa mikrokristalin (*avicel*)
- Salicin
- Pereaksi *3,5 Dinitro Salisilic Acid* (DNS)

### Prosedur

1. Penumbuhan fungi selulolitik dan bakteri selulolitik pada media pengayaan
  - Untuk menstimulasi pertumbuhan fungi selulolitik, media yang digunakan adalah media cair Czapek Dox steril dengan komposisi per L 2 g  $\text{NaNO}_3$ , 0,5g KCl, 0,5 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,01 g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . Selanjutnya media dibagi menjadi 3, masing-masing ditambahkan sumber selulosa 1) 0,1% selulosa mikrokristalin (*avicel*), 2) 0,1% CMC, dan 3) 0,1% salicin (Oetari *et al.* 2018). pH dari ketiga media tersebut diatur 6,0 ( $\pm$  0,2).
  - Untuk menstimulasi pertumbuhan bakteri selulolitik, media yang digunakan adalah media Hatami *et al.* (2008) dengan komposisi per L 1 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,2g

MgSO<sub>4</sub>, 2-5 mg CaCl<sub>2</sub>, 15-20g Fe<sub>2</sub> (SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>. Selanjutnya media dibagi menjadi 3, masing-masing ditambahkan sumber selulosa 1) 0,5% selulosa mikrokristalin (*avicel*), 2) 0,5% CMC, dan 3) 0,5% salicin. pH media diatur 7,0-7,5.

- Inokulasikan pada 20 mL dari masing-masing media tersebut sebanyak 1 gram sampel (tanah, kotoran hewan, pupuk organik dan lain sebagainya) atau 1 ml kultur cair dari isolat murni yang akan diuji aktivitas enzimnya
  - Inkubasikan pada shaking incubator suhu 30°C (±0,2), selama 3-5 hari untuk bakteri dan 7-10 hari untuk fungi.
2. Penetapan aktivitas enzim selulase dari contoh tanah dan kultur
- Suspensi sampel dan media dari tahapan di atas disentrifus pada 2500g selama 10 menit. Filtrat (ekstrak ezim kasar sebagai sumber enzim) disimpan pada refrigerator untuk selanjutnya diukur aktivitasnya.
  - Untuk sampel yang berasal dari tanah atau humus, tambahkan 0,5 g Polychlal AT untuk menghilangkan warna yang disebabkan oleh warna humus atau tanah (Kanazawa & Miyashita 2012).
  - Penetapan aktivitas selulase dilaksanakan dengan metode Adney & Bake (1996). Masukkan 0,5 mL selulosa mikrokristalin, 5 ml buffer sitrat pH 5,0 dan 1 mL filtrat dalam tabung reaksi berkapasitas 20 mL.
  - Tabung ditutup dan diinkubasi pada suhu 50°C selama 60 menit, untuk kontrol dilakukan tanpa inkubasi.
  - Reaksi dihentikan dengan menambahkan 3 ml pereaksi DNS dan tabung dipanaskan dalam air mendidih selama 15 menit
  - Selanjutnya tabung reaksi didinginkan dan ditambah akuades hingga volumenya 10 mL kemudian dikocok agar homogen. Absorbansi tiap larutan diukur pada 540 nm.
  - Selanjutnya data absorbansi contoh yang diperoleh diekstrapolasikan dengan persamaan fungsi konsentrasi glukosa.
  - Aktivitas selulase = (konsentrasi glukosa sampel – konsentrasi glukosa kontrol) / waktu inkubasi.
  - 1 unit aktivitas Exo-β-1,4-glukanase (U/mL) adalah banyaknya glukosa yang dihasilkan dari hidrolisis substrat selulosa mikrokristalin yang dikatalisis oleh 1 mL ekstrak ezim kasar per menit.
  - 1 unit aktivitas Endo-β-1,4-glukanase (U/mL) adalah banyaknya glukosa dari hasil hidrolisis substrat CMC yang dikatalisis 1 mL ekstrak ezim kasar per menit.
  - 1 unit aktivitas β-glukosidase (U/mL) adalah banyaknya glukosa dari hasil hidrolisis substrat salicin yang dikatalisis 1 mL ekstrak ezim kasar per menit.

### 3. Penetapan standar glukosa

Kurva standar diukur dengan mengencerkan larutan larutan standar glukosa 10 mg/mL menjadi 0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,75 mg/mL, 1,0 mg/mL, 1,5 mg/mL, 1,75 mg/mL dan 2 mg/mL. Selanjutnya dilakukan penetapan kadar gula pereduksi

menggunakan metode DNS seperti langkah-langkah berikut ini :

- Pipet 1 mL dari masing-masing larutan tersebut dan masukkan ke setiap tabung reaksi kosong. Sebagai kontrol digunakan 1 mL akuades.
- Tambahkan lagi 2 mL akuades pada setiap tabung, diikuti dengan menambahkan 1mL larutan DNS.
- Semua tabung reaksi dipanaskan di dalam air mendidih 100°C selama 15 menit.
- Dinginkan semua tabung tambahkan akuades hingga volumenya 10 mL, kemudian dikocok agar homogen.
- Absorbansi tiap larutan diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm.
- Buat grafik fungsi antara absorbansi dan konsentrasi glukosa  $Y = aX + b$ , dimana  $Y =$  absorbansi dan  $X$  adalah konsentrasi glukosa.

### Daftar Pustaka

- Adney B, Baker J. 1996. Measurement of cellulase activities. Laboratory Analytical Procedure (LAP) Issue Date: 08/12/1996. A national laboratory of the U.S. Department of Energy Office of Energy Efficiency & Renewable Energy.
- Bisaria VS, Mishra S. 1989. Regulatory aspects of cellulase biosynthesis and secretion. Crit. Rev. Biotechnol. Issue 2(9):61-103.
- Enari TM. 1983. Microbial Cellulase. p 183 – 223. In Fogarty WM (Ed.) Microbial Enzymes and Biotechnology. Appl. Sci Interscience Publisher, New York.
- Fogarty WM, Kelly CJ. 1979. Developments in microbial extracellular enzymes. In Wiseman A (Ed.). Topics in enzyme and fermentation biotechnology. Ellis Horwood Ltd. Publishers, England.
- Hatami S, Alikhani HA, Besharati H, Salehrastin N, Afrousheh M, Yazdani JZ. 2008. Investigation on aerobic cellulolytic bacteria in some of north forest and farming soils. American-Eurasian J. Agric. Environ. Sci. 3 (5): 713-716.
- Hope CFA, Burns RG. 1987. Activity, origins and locations of cellulose in a silt loam soil. Biol. Fertil. Soil 5:164-170.
- Kanazawa S, Miyashita K, 2012. Cellulase activity in forest soils. Soil Sci. Plant Nutr. 33:3, 399-406, DOI: 10.1080/00380768.1987.10557585
- Oetari A, Fitri R, Rachmania MK. 2018. Use of microcrystalline cellulose and carboxymethyl cellulose for the detection of cellulolytic fungi from old Chinese manuscripts. AIP Conf. Proc. 2023, 020163 (2018); <https://doi.org/10.1063/1.5064160>
- Nishida Y, Suzuki K, Kumagai Y, Tanaka H, Inoue A, Ojima T. 2007. Isolation and primary structure of a cellulase from the Japanese sea urchin *Strongylocentrotus nudus*. Biochimie. 89(8):1002-11. doi: 10.1016/j.biochi.2007.03.015.
- Wilson DB. 2011. Microbial diversity in cellulose hydrolysis. Curr. Opin. Microbiol. 14:259–263.

## 4.4

# FOSFATASE

*Rohani Cinta Badia Ginting, Ety Pratiwi, Edi Santosa*

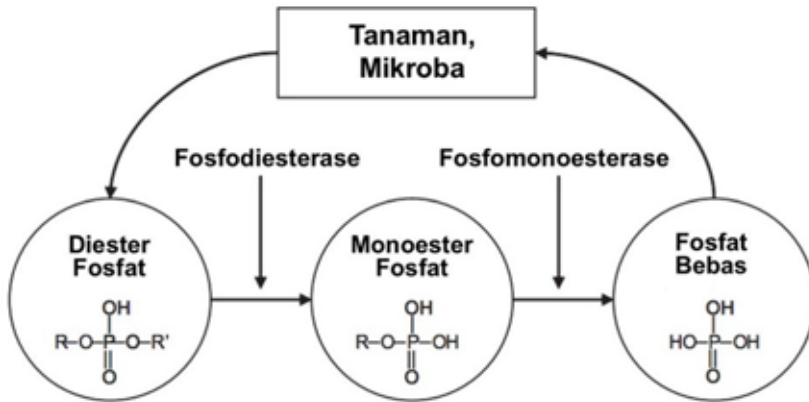
Masalah utama fosfor dalam tanah adalah hanya sebagian kecil dari fosfor yang tersedia bagi tanaman. Ketersediaan fosfor tanah tergantung pada karakteristik dan sifat tanah dan juga pada pengelolaan tanah oleh manusia. Aplikasi P dalam jumlah besar pada tanah marginal sebagai pupuk tidak tersedia bagi tanaman dan mungkin terakumulasi sebagai fraksi P anorganik dan difiksasi melalui proses adsorpsi dan pengendapan secara kimia serta fraksi P organik yang diimobilisasi sebagai bahan organik tanah.

Kandungan P organik dalam tanah berkisar antara 20 – 80% dari P total tanah (Mengel *et al.* 2001). P organik merupakan sumber P tersedia yang potensial bagi tanaman. Namun P dalam bentuk organik tidak dapat digunakan oleh tanaman dan harus diubah menjadi bentuk P anorganik melalui proses mineralisasi dan dikatalisis oleh enzim tanah (Whitelaw 2000).

Mikroba pelarut fosfat memiliki kemampuan menghasilkan kelompok enzim fosfatase ekstraseluler yang mampu memineralisasi P organik menjadi P anorganik, membuat P tanah menjadi tersedia bagi tanaman (Whitelaw 2000). Terdapat beberapa macam fosfatase tanah yang diketahui (Cookson 2002), yang paling umum adalah: fosfomonoesterase, fosfodiesterase dan fitase. Fosfomonoesterase bekerja pada monoester fosfat dan menurut pH optimumnya dibagi menjadi fosfomonoesterase asam dan basa. Keduanya merupakan enzim adaptif: fosfomonoesterase asam mendominasi di tanah asam sedangkan fosfomonoesterase basa mendominasi di tanah netral dan basa.

Fosfodiesterase terlibat dalam degradasi fosfolipid dan asam nukleat, yang merupakan penyusun utama P organik di tanah (Cosgrove 1967). Fosfomonoesterase dan fosfodiesterase keduanya diperlukan untuk melepaskan fosfat bebas dari diester fosfat. Hidrolisis awal oleh fosfodiesterase melepaskan monoester fosfat, yang kemudian harus dihidrolisis oleh fosfomonoesterase untuk melepaskan fosfat bebas (Gambar 1). Sedangkan fitase adalah enzim yang mengkatalisis mineralisasi – konversi P organik dari fitat menjadi P anorganik, yang dapat dengan mudah diserap oleh tanaman (Azeem *et al.* 2014).

Aktivitas enzim fosfatase dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu jumlah dan jenis substrat, pH, suhu, bahan inhibitor dan aktivator, konsentrasi enzim dan produk, serta jenis pelarut yang digunakan (Saparotka 2003). Selain itu, aktivitas fosfatase tanah juga dipengaruhi oleh sifat kimia dan fisik tanah yaitu jenis tanah, kandungan bahan organik, kandungan N total, rasio C/N dan kandungan P total (Djordjevic *et al.* 2003).



Gambar 1. Hidrolisis senyawa P organik oleh enzim fosfatase

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 fosfomono-esterase 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 literature 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 fosfo-monoester di dalam tanah seperti  $\beta$ -gliserofosfat,  $\beta$ -naftil fosfat, fenilfosfat, dan p-nitrofenil fosfat (Tabatabai 1982).

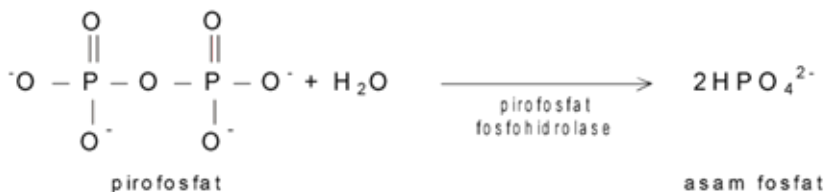
Enzim fosfodiesterase (orthofosforik diester fosfohidrolase) di dalam tanah mengkatalisis reaksi:



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.

## Prinsip

Fosfatase adalah enzim yang mengkatalisis hidrolisis ester dan anhidrida asam fosfat (Schmidt & askowski 1961) yang melepaskan fosfat (P) yang dapat diserap oleh tanaman atau mikroba (Quiquampoix & Mousain 2005).

Aktivitas fosfatase dapat diukur menggunakan substrat p-nitrofenil fosfat (pNPP) ke dalam contoh tanah. Enzim fosfatase memutus gugus fosfat dan menghasilkan p-nitrofenol (pNP) yang terekstrak dalam larutan tanah (Atlas & Bartha 1981). Produk terhidrolisis ini sensitif terhadap cahaya. Oleh karena itu, sampel harus tetap ditutup dengan aluminium foil untuk mencegah fotolisis.

Penggunaan kolorimetri pada pengukuran aktivitas fosfo-monoesterase 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 fosfomono-esterase dipakai larutan 0,5 M KOH. Alasannya karena substrat fosfo-diesterase yaitu bis p-nitrofenil fosfat (BPNP) tidak stabil pada larutan NaOH, lama-lama BPNP terhidrolisis dengan adanya NaOH. Fungsi  $\text{CaCl}_2$  adalah untuk mengekstraksi p-nitrofenol pada pengujian fosfodiesterase, fungsinya sama dengan fungsi  $\text{CaCl}_2\text{-NaOH}$  pada pengujian fosfomono-esterase.

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:

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

Penggunaan pereaksi 1 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  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.

## Aktivitas Fosfomonoesterase

### (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 ( $H_3BO_3$ ) 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 ( $\text{CaCl}_2$ ) 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.
- Natrium hidroksida ( $\text{NaOH}$ ) 0,5 M
  - Larutkan 20 g  $\text{NaOH}$  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  $\text{CaCl}_2$  dan 4 mL 0,5 M  $\text{NaOH}$ , 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  $\text{CaCl}_2$  dan 4 mL 0,5 M  $\text{NaOH}$ , 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  $\mu\text{g}$  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  $\text{CaCl}_2$  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-nitrofenol  $\text{g}^{-1}$  tanah) =  $\mu\text{g}$  kurva x fk x 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 [ $100\% / (100 - \text{kadar air}\%)$ ], perhitungan kadar air seperti pada sub bab 2.2.

fp = faktor pengenceran

## 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 ( $\text{NaCH}_3\text{COOH}$ ) dalam 700 mL akuades dan



Gambar 2. Inkubator atau penangas air dengan pengatur suhu

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  $\text{mL}^{-1}$ .

### Prosedur

- Masukkan 10 g contoh tanah lembab (< 2mm) 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  $\text{mL}^{-1}$ ), gunakan 0–20 mL larutan standar fenol.

## Perhitungan

Sebelum dihitung, hasil pengukuran dikoreksi dengan blanko

$$\text{Fenol } (\mu\text{g g}^{-1} \text{ btk}^{-1}) = (C \times 100) / (\text{Bkt} \times t \times 10)$$

Keterangan:

- C = fenol terukur.  
 Bkt = berat tanah kering.  
 t = waktu inkubasi.  
 100 = volume suspensi tanah (mL).  
 10 = berat contoh tanah yang dipakai.

### (3) Aktivitas Fosfodiesterase (Tabatabai 1982)

#### 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 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<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. 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<sub>2</sub>) 0,5 M
  - Larutkan 73,5 g CaCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O dalam 700 mL akuades dan encerkan menjadi 1.000 mL dengan akuades.
- Larutan tris (hidroksimetil) aminometan-natrium hidroksida (THAM-NaOH), 0,1 THAM, 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 CaCl<sub>2</sub> 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 CaCl<sub>2</sub>, 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

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

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) Fosfotriesterase (Eivazi & Tabatabai 1977)

##### Alat

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

##### 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 ( $\text{CaCl}_2$ ) 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  $\text{CaCl}_2$  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  $\text{CaCl}_2$  dan 0,5 M NaOH dan lakukan dengan cepat sebelum penyaringan suspensi tanah.
- Buat kurva kalibrasi (0-200  $\mu\text{g}$  fenol  $\text{mL}^{-1}$ ) dengan menggunakan 0-20 mL larutan standar fenol.

## (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 ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 1N
  - Larutkan 250 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  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 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 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<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. 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 PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-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 PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-P, buat grafik kalibrasi dari deret larutan standar yang terdiri atas 0, 5, 10, 15, 20, dan 25 µg PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-P.
- Pipet dan masukkan sebanyak 0, 5, 10, 15, 20, dan 25 mL aliquot dari larutan stok PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-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 µg PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-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 PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-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<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 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 PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-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

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

## Ulasan

Hasil pengukuran enzim fosfatase dapat digunakan sebagai:

### 1. 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.

### 2. 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.

### 3. Indikator keberlangsungan siklus biogeokimia.

Enzim fosfatase dipakai untuk perkiraan kemampuan mengkatalisis siklus P dalam tanah.

### 4. 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.

### 5. 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 RM, Nannipieri P, Trazar-Copeda C. 1995. Phosphatase activity. p. 335-344. *In* Alef K, Nannipieri P (Eds.) *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press. Harcourt Brace & Co. Pub. London.
- Atlas RM, Bartha R. 1981. *Microbial ecology. Fundamentals and Applications*. Addison-Wesley Pub. Company. London, Amsterdam, Don Mills, Ontario, Sydney.
- Azeem M, Riaz A, Chaudhary AN, Hayat R, Hussain Q, Tahir MI, Imran M. 2015. Microbial phytase activity and their role in organic P mineralization. *Arch. Agron. Soil Sci.* 61(6): 751-766.
- Cookson P. 2002. Variation in phosphatase activity in soil: A case study. *Agric. Sci.* 7(1): 65-72.
- Cosgrove DJ. 1967. Metabolism of organic phosphatase in Soil. *J. Soil. Biol.* 1: 216-228.
- Djordjevic S, Djukic D, Govedarica M, Milosevic N, Jarak M. 2003. Effects of chemical and physical soil properties on activity phosphomonoesterase. *Acta Agric. Serb.* 8(16): 3-10.
- Eivazi F, Tabatabai MA. 1977. Phosphatases in soils. *Soil Biol. Biochem.* 9: 167-172.
- Horikoshi K. 1991. *Microorganisms in Alkaline Environments*. Kodansha, Tokyo.
- Lynch MJ. 1983. *Soil Biotechnology Microbiological Factors in Crop Productivity*. Blackwell Scientific Pub. Oxford, London, Edinburgh, Boston, Melbourne.
- Mengel K, Kirkby EA, Kosegarten H, Appel T. 2001. Phosphorus. *In* Mengel K, Kirkby EA, Kosegarten H, Appel T. (Eds.) *Principles of Plant Nutrition*. Springer, Dordrecht. [https://doi.org/10.1007/978-94-010-1009-2\\_9](https://doi.org/10.1007/978-94-010-1009-2_9).
- Mullen DM. 1998. Transformation of other elements. pp: 369-386. *In* Silvia DM, Fuhrmann JJ, Hartel PG, Zuberer DA (Eds.) *Principles and Applications of Soil Microbiology*. Prentice Hall New Jersey.
- Quiquampoix H, Mousain D. 2005. Enzymatic hydrolysis of organic phosphorus. p. 89–112. *In* Turner BL, Frossard E, Baldwin DS (Eds.) *Organic Phosphorus in the Environment*, Wallingford, UK: CAB International. doi: 10.1079/9780851998220.0089
- Richards NB. 1978. *Introduction to the Soil Ecosystem*. Longman. London and New York.
- Saparatka B. 2003. *Phosphatase Activities (ACP, ALP) in Agroecosystem Soils*. Doctoral Thesis. Swedish University of Agricultura Science. Uppsala.
- Schmidt G, Laskowski M. 1961. Phosphate ester cleavage (survey). pp. 3–35. *In* Boyer PD, Lardy H, Myrback K (Eds.), *The Enzymes*, second ed., Academic Press, New York.
- Tabatabai MA. 1982. Soil Enzymes. p. 903-947. *In* Page AL, Miller RH, Keeney DR (Eds.), *Methods of Soil Analysis*, ASA, SSSA, Publisher, Madison, WI.
- Tabatabai MA, Bremner JM. 1969. Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biol. Biochem.* 1: 301-307.

Tate III RL. 1995. *Soil Microbiology*. John Wiley & Sons, Inc. New York-Chichester-Brisbane-Toronto-Singapore.

Whitelaw MA. 2000. Growth promotion of plants inoculated with phosphate solubilizing fungi. *Adv. Agron.* 69: 99–151.

# 4.5

## PROTEASE

Erny Yuniarti

Protease, yang juga dikenal sebagai proteinase atau enzim proteolitik, adalah kelompok hidrolase yang mengkatalisis pemutusan ikatan peptida dalam protein menghasilkan peptida dan/atau asam amino. Protease (= peptidase, EC 3.4) dapat mengkatalisis hidrolisis asam amino terminal pada rantai polipeptida (eksopeptidase) atau ikatan peptida internal (endopeptidase, sinonim dengan proteinase). Eksopeptidase melepaskan asam amino yang terdapat di N atau C terminal dari polipeptida. Enzim yang dapat melepaskan satu, dua dan tiga asam amino dari N terminal, masing-masing disebut aminopeptidase (EC 3.4.11), dipeptidyl-peptidases (EC 3.4.14), dan tripeptidyl-peptidases. Sedangkan enzim yang membebaskan satu dan dua asam amino dari C terminal, masing-masing adalah karboksipeptidase dan peptidil-dipeptidase (EC 3.4.15). Karboksipeptidase dibagi lagi berdasarkan mekanisme katalitik (karboksipeptidase tipe serin, metalokarboksipeptidase, dan karboksipeptidase tipe sistein). Endopeptidase (proteinase) dikenali berdasarkan sifat kimia gugus yang bertanggung jawab untuk aktivitas katalitik. Empat kelas proteinase yang telah diidentifikasi, yaitu serin (EC 3.4.21), sistein (EC 3.4.22), aspartate (EC 3.4.23), dan metalloendopeptidase (3.4.24). Berdasarkan pH optimal, proteinase diklasifikasikan sebagai proteinase asam, netral, atau basa. Kelompok kelima, *Endopeptidases of unknown type* (EC 3.4.99) ditetapkan untuk proteinase dengan mekanisme katalitik yang tidak diketahui dan untuk yang tidak sesuai dengan salah satu dari empat kelompok lainnya (Landi *et al.* 2011).

Tanaman mensekresikan protease yang aktivitasnya berkaitan dengan permukaan akar. Aktivitas protease akar tidak terstimulasi pada kondisi defisiensi N di dalam tanah. Akar tanaman sereal berkontribusi seperlima dari aktivitas protease rizosfer. Serapan N tanaman hanya berfungsi ketika protein tanah bersentuhan langsung dengan permukaan akar. Kurangnya respon protease perakaran tanaman pada defisiensi N menunjukkan bahwa aktivitas protease akar tidak berhubungan dengan peningkatan serapan N tanah (Greenfield *et al.* 2020).

Mikroorganisme tanah menghasilkan protease berfungsi untuk 1. mendaur ulang bahan organik tanah, sehingga menjamin nutrisi mikroba, 2. berinteraksi dengan organisme tanah lain dengan cara membelahan protein dinding sel, termasuk protease anti jamur (yang berasal dari bakteri) dan alkaline serine protease (misalnya VCP1) (dari bakteri dan jamur, nematoda atau entomopatogen), 3. mendaur ulang residu keratin (protease serin keratinolitik dari bakteri dan jamur tanah), 4. kelangsungan hidup mikroorganisme dalam kondisi yang tidak menguntungkan seperti *heat shock proteins* periplasmik dari *E. coli* (HtrA) memiliki aktivitas proteolitik yang memungkinkan kelangsungan hidup pada suhu tinggi, dan 5. Serina endopeptidase juga terlibat

dalam perkembangan patogenesis, dan biokontrol mikroorganisme (endopeptidase) (Vranova *et al.* 2013).

Nilai pH untuk aktivitas katalitik optimum dari protease mikroba berkisar antara 3,0 - 12 (Pekkarinen *et al.* 2000, Singh *et al.* 2011), sementara sebagian besar mikroorganisme yang diisolasi dari tanah memiliki aktivitas protease optimum pada 40-60°C dan pH 8-9 (Barata *et al.* 2002, Shankar *et al.* 2011).

Di dalam tanah, protease dan peptidase dapat berada pada lokasi yang berbeda, yaitu berada dalam sel hidup dan aktif; atau sel mati; atau bisa sebagai enzim bebas; dan teradsorpsi pada partikel organik, anorganik, atau organomineral. Enzim-enzim ini dapat distabilkan dan tetap aktif ketika teradsorpsi pada molekul humat dan partikel lempung, dan senyawa berprotein (protein, glikoprotein, peptida, dan asam amino) mewakili 40% dari total N dalam tanah sehingga aktivitas protease dan peptidase dapat sangat mempengaruhi laju mineralisasi N organik, suatu proses yang mengatur jumlah N yang tersedia bagi tanaman. Protease ekstraseluler mengkatalisis hidrolisis protein eksogen/N organik menjadi molekul yang lebih kecil sebelum penyerapan seluler sedangkan protease intraseluler terlibat dalam pergantian protein intraseluler. Degradasi protein oleh protease ekstraselular menghasilkan oligopeptida, yang selanjutnya menghasilkan asam amino yang diasimilasi oleh mikroba. Asam amino ditransfer ke dalam sel dengan sistem transfer spesifik dan mengalami deaminasi dengan melepaskan ammonium (Landi *et al.* 2011).

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 (Fornasier *et al.* 2011).

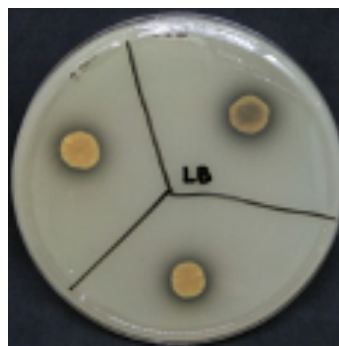
Metode yang dikembangkan untuk pengujian aktivitas protease tampak berbeda dalam hal substrat, kondisi inkubasi (pH, jenis dan konsentrasi buffer, suhu, masa inkubasi, dll.) dan prosedur analisis. Secara umum, aktivitas proteolitik tanah dapat dideteksi melalui: (i) penurunan substrat awal, atau lebih sering (ii) peningkatan peptida atau asam amino yang dilepaskan selama periode inkubasi tertentu menggunakan substrat dengan berat molekul tinggi dan rendah atau substrat fluorogenik, dengan pengukuran secara spektrofotometri atau fluorometri senyawa kromogenik atau fluorogenik yang dilepaskan. Substrat yang biasa digunakan untuk pengukuran aktivitas protease tanah dan sifat-sifat dasarnya ditampilkan di Table 1 seperti yang telah dijelaskan oleh Wang dan Cheng (2017).

Metode enumerasi jumlah mikroba pendegradasi protein di dalam tanah dilakukan dengan cara menginokulasikan sampel tanah ke dalam media susu skim agar atau skim milk agar setelah sampel dibuat pengenceran serial seperti dilakukan pada enumerasi jumlah mikroba di bab sebelumnya.

Tabel 1. Substrat untuk pengukuran aktivitas protease (Wang &amp; Chen 2017)

Subtrat	Metode Pengukuran Protease	Mekanisme hidrolisis	Nomor EC	Produk yang diukur
Leucine-7-amino-4-methylcoumarin (AMC)	Fluorometri	Leucine aminopeptidase Exopeptidase (N-terminus)	3.4.11	AMC
Kasein	Kolorimetri	Trypsin Endopeptidase	3.4.21-25	Tyrosine
N-benzoyl L-arginine amide (BAA)	Kolorimetri	Trypsin Endopeptidase	3.4.21-25	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
Glycine p-nitroaniline (pNA)	Kolorimetri	Glycine aminopeptidase Exopeptidase (N-terminus)	3.4.11.-	pNA
Benzoyloxycarbonyl phenylalanyl leucine (Z-phe-leu)	Kolorimetri	Carboxypeptidase Exopeptidase (C-terminus)	3.4.21-25	Leucine
Gelatin	Kolorimetri			Glycine

Metode pengukuran aktivitas protease secara kuantitatif yang dijelaskan di sini adalah metode kolorimetri Fenol Folin-Ciocalteu (Alef & Nannipieri 1995, Kandeler 1995), metode kolorimetri (Wang 2021), dan metode fluorometri standar (Lori *et al.* 2020).



Gambar 1. Koloni bakteri *Streptomyces andamanensis* LB yang menghidrolisis protein susu skim pada media susu skim agar ditandai zona jernih sekitar koloni

## Aktivitas Protease Kuantitatif Metode Kolorimetri Phenol Folin-Ciocalteu

### 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 phenol 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.

### Alat

- Spektrofotometer
- Penangas dengan mesin pengocok (shaking waterbath) 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. 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  $\text{CCl}_3\text{COOH}$  (TCA) dengan akuades dalam labu ukur 200 mL dan cukupkan volumenya dengan akuades menjadi 200 ml.
- Reagen A
  - larutkan 50 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (bebas  $\text{H}_2\text{O}$ ) 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 ( $C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$ ) 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 phenol folin-ciocalteu (33%)
  - Encerkan 167 ml reagen phenol 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, vorteks, lalu inkubasi selama 2 jam pada suhu 50°C dalam penangas.
- Setelah inkubasi, tambahkan larutan TCA, lalu aduk dengan vorteks. Untuk tabung kontrol, tambahkan 5 mL larutan natrium kaseinat sebelum penambahan larutan TCA. Suspensi tanah disentrifus pada 10.000-12.000 rpm 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 campuran reaksi disentrifus 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

Aktivitas protease ( $\mu\text{g}$  tirosin  $\text{g}^{-1}$  (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)

## Ulasan

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

- Kompleks warna stabil selama waktu yang relatif pendek (90 menit). Oleh karena itu, ikuti dengan tepat interval waktu yang ditentukan tersebut. Setelah penambahan reagen folin-cioalceu biarkan tabung reaksi selama 90 menit, lalu ukur absorbansi.
- Filtrat bisa disimpan paling cepat 5 jam pada suhu  $4^\circ\text{C}$ .
- 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.

## Aktivitas Protease Kuantitatif Metode Kolorimetri Ninhidrin (Wang *et al.* 2021)

### Prinsip

Gugus amino dari asam amino yang dibebaskan oleh aktivitas protease tanah bereaksi dengan ninhidrin (agen pengoksidasi) sehingga asam amino mengalami deaminasi oksidatif, menghasilkan pelepasan  $\text{CO}_2$ ,  $\text{NH}_3$ , dan aldehida bersama dengan

hidrindantin (ninhidrin tereduksi). Amonia bereaksi dengan molekul ninhidrin lain membentuk diketohidrin (kompleks Ruhemann) yang berwarna biru tua.

### Alat

- Spectro-photometrically (Shimadzu, UV-3600, Kumamoto, Japan)
- Water bath
- Sentrifus

### Bahan

- Toluena
- Gelatin
- $H_2SO_4$  0,05 M
- $Na_2SO_4$  20%
- Glycine
- Larutan nin-hidrin 2%
  - Sebanyak 2 g ninhydrin dilarutkan dengan 50 mL etanol absolut dalam gelas piala 100 mL, lalu dimasukkan dalam labu takar 100 mL yang kering. Volume larutan dalam labu takar dicukupkan sampai 100 mL dengan akuades. Setelah labu takar ditutup, larutan dikocok beberapa kali dan larutan dipindahkan ke dalam botol gelap.

### Prosedur

Sebanyak 2 g sampel tanah ditempatkan dalam labu segitiga, ditambahkan 0,5 mL toluena, dicampur, dan dibiarkan tidak terganggu selama 15 menit. Selanjutnya, sekitar 10 mL gelatin putih 1% ditambahkan ke sampel tanah, kemudian dikocok dengan baik. Setelah dikocok, labu segitiga dikultur dalam penangas air pada suhu 30 selama 24 jam sebelum sampel disentrifus 3000 rpm selama 15 menit dan disaring. Sebanyak 5 mL filtrat dipipet ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 0,5 mL 0,05 M  $H_2SO_4$  dan 3 mL  $Na_2SO_4$  20% untuk mengendapkan protein, dan sampel disaring kembali. Sekitar 2 mL filtrat dimasukkan ke dalam tabung reaksi, yang ditambahkan 1 mL larutan nin-hidrin 2%, dan tabung reaksi dipanaskan dalam penangas air mendidih selama 10 menit. Setelah mendidih, larutan diencerkan hingga 50 mL dengan air suling. Selain itu, sampel kontrol disiapkan menggunakan proses di atas tanpa penambahan sampel tanah. Aktivitas protease ditentukan secara spektrofotometer (Shimadzu, UV-3600, Kumamoto, Jepang) pada panjang gelombang 560 nm. Aktivitas protease sampel tanah dihitung menggunakan kurva standar untuk glisin. Aktivitas enzim protease tanah dinyatakan sebagai mikrogram glisin yang dilepaskan dalam 1 g sampel tanah per jam.

$$\text{Glycine } (\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}) = (c \times 50 \times t_s) / m$$

Glycine ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ): jumlah mikrogram glycine di dalam 1 g sampel tanah setelah 24 jam inkubasi

- c = konsentrasi glycine yang didapat pada kurva standar,  $\mu\text{g mL}^{-1}$   
 50 = produk cair berwarna (mL)  
 ts = perkalian (2 detik, 10/5)  
 m = berat segar tanah (g).

## Pengukuran Aktivitas Protease Metode Fluorometri Standar (Lori *et al.* 2020)

### Prinsip

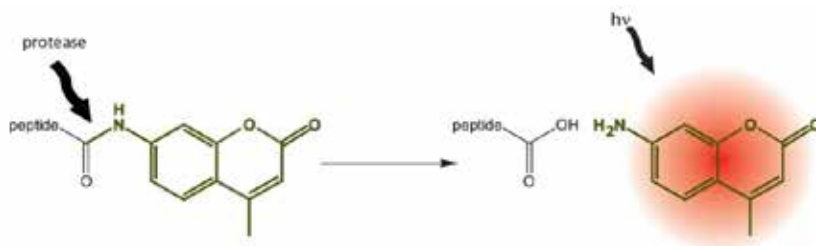
Subtrat sintetis, L-leucine 7-amino-4-methylcoumarin hidroklorida memiliki bagian senyawa pewarna 7-amino-4-methylcoumarin (AMC atau MUC). AMC memiliki gugus amida yang terikat pada salah satu cincin benzena dan bukan gugus hidroksida, memungkinkan asam amino untuk berikatan dengan gugus amida melalui ikatan amida. Subtrat yang terikat AMC ini, ditambahkan ke sampel tanah. Selama inkubasi, enzim aminopeptidase sampel tanah menghidrolisis ikatan amida menghasilkan asam amino dan AMC bebas. Selanjutnya, AMC pada *microplate reader* mengalami eksitasi oleh sinar UV pada 330-380 nm, dan memancarkan fluoresensi pada 440-480 nm.

### Alat

- Cary Eclipse Fluorimeter (Agilent Corp., Santa Clara, CA)
- Microplate 96 sumur

### Bahan

- Buffer Sodium asetat (100 mM, pH 5.5,)
  - Larutkan 272 g sodium asetat dalam 500 air dengan pemanasan 35°C. Dinginkan dan tambahkan 50 ml asetat glasial, lalu cukupkan air menjadi 1 L.
- Subtrat (Leu-MCA (*l-leucine-4-methyl-7-coumarinylamide*) (10 mM))
  - Larutkan Leu-MCA dengan 500  $\mu\text{l}$  di atas shaker pada suhu ruang. Laitan substrat kemudian ditambah air suling sampai volume akhir 7.8 mL. Larutan substrat disimpan dalam keadaan gelap pada suhu -2°C sampai digunakan.
- Standar
  - AMC (*7-amino-4-methylcoumarine*) dilarutkan dengan dimethyl (oxido) sulfur (DMSO) sampai konsentrasinya 10 mg/L.



Gambar 2. Prinsip substrat fluorogenik yang dilabel AMC

### Prosedur

Sebanyak 2,75 g tanah dihomogenkan (1 menit dalam blender Waring) dalam 200 mL larutan buffer natrium asetat yang disesuaikan dengan pH rata-rata sampel tanah yang diukur pada T0. Suspensi tanah (800  $\mu$ l) kemudian ditambahkan ke dalam lubang/sumur microplate 96-lubang yang mengandung 200  $\mu$ L substrat (Leu-MCA (*l-leucine-4-methyl-7-coumarinylamide*)). Untuk setiap sampel tanah, kurva standar (konsentrasi 0-100 M) dibuat dengan mencampur 800  $\mu$ L suspensi tanah dengan 200  $\mu$ L 7-amino-4-methylcoumarin (AMC) dalam microplate 96-sumur. Microplate diinkubasi pada 20°C dalam kondisi gelap (3 jam) pada pengocok orbital (150 rpm) sebelum disentrifus pada kecepatan 2900 g selama 3 menit. Supernatan (250  $\mu$ L) dipindahkan ke *microplate Greiner* hitam dengan dasar datar dan fluoresensi diukur pada pembaca *microplate* (Varioscan Flash, Thermo Scientific) dengan panjang gelombang eksitasi 365 nm dan emisi 450 nm. Setelah mengoreksi dengan kontrol negatif, aktivitas enzim potensial dinyatakan sebagai nmol g tanah<sup>-1</sup> jam<sup>-1</sup>.

### Kurva Kalibrasi

Standar AMC (7-amino-4-methylcoumarine) diukur secara terpisah untuk setiap sampel tanah untuk memperhitungkan quenching fluoresensi oleh quencher asal tanah. Standar diencerkan ke dalam bubur tanah untuk memberikan konsentrasi akhir 0, 0,5, 1,0, 5,0, 10, 25, dan 50 M dalam volume akhir 200  $\mu$ L. Kurva standar menyatakan hubungan antara fluorescence read standar dan sampel dengan konsentrasi standar AMC ( $\mu$ mol).

### Kuantifikasi

Aktivitas enzim kuantitatif dihitung berdasarkan pengukuran fluoresensi. Nilai fluoresensi dari enzim uji dan pengukuran blanko dibandingkan dengan kurva standar dan konsentrasi AMC dihitung. Rata-rata dari empat ulangan blanko dikurangi dari pengukuran aktivitas enzim. Aktivitas enzim dihitung berdasarkan rumus sbb:  $\mu$ mol AMC g tanah<sup>-1</sup> jam<sup>-1</sup>.

## Daftar Pustaka

- Alef K, Nannipieri P. 1995. Protease activity. p.313-315. *In* Alef K, Nannipieri P (Eds.) *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press. London.
- Bonmati M, Ceccanti B, Nannipieri P. 1991. Spatial variability of phosphatase, urease, protease, organic carbon and total nitrogen in soil. *Soil Biol. Biochem.* 23: 391-396.
- Fuka MM, Engel M, Gattinger A, Bausenwein U, Sommer M, Munch JC, Schloter M. 2008. Factors influencing variability of proteolytic genes and activities in arable soils. *Soil Biology & Biochemistry.* 40: 1646–1653.
- Greenfield LM, Hill PW, Paterson E, Baggs EM, Jones DL. 2020. Do plants use root-derived proteases to promote the uptake of soil organic nitrogen? *Plant Soil.* 456:355–367.
- Kandeler E. 1995. Protease activity. p.165-168. *In* Schinener F, Kandeler E, Ohlinger R, Margesin R (Eds.). *Methods in Soil Biologi*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Kandeler E, Luxhùib J, Tscherkoc D, Magidb J. 1999. Xylanase, invertase and protease at the soil litter interface of loamy sand. *Soil Biol. Biochem.* 31:1171-1179.
- Kumar K, Rosen CJ, Russelle MP. 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].
- Lori M, Piton G, Symanczik S, Legay N, Brussaard L, Jaenicke S, Nascimento E, Reis F, Sousa JP, Mäder P, Gattinger A, Clément J-C, Foulquier A. 2020. Compared to conventional, ecological intensive management promotes beneficial proteolytic soil microbial communities for agro-ecosystem functioning under climate change-induced rain regimes. *Scientific Reports, Nature Research.* 10:7296, p.1-15. | <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64279-8>.
- Vranova V, Rejsek K, Formanek P. 2013. Review Proteolytic activity in soil: A review. *Applied Soil Ecology.*70: 23– 32.
- Wang L, Kaur M, Zhang P, Li J, Xu M. 2021. Effect of Different Agricultural Farming Practices on Microbial Biomass and Enzyme Activities of Celery Growing Field Soil. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 18, 12862 <https://doi.org/10.3390/ijerph182312862> <https://www.mdpi.com/journal/ijerph>.
- Ward OP. 1983. Properties of microbial proteinase. p 251 *In* W Fogarty WM (Ed.) *Microbial Enzymes and Biothecnology*. Applied Science Publishing, London.

# 4.6

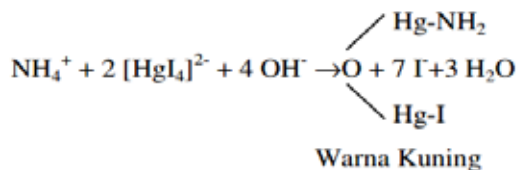
## UREASE

Selly Salma

Urease (aminohidrolase, EC 3.5.1.5) merupakan enzim yang mengkatalisis hidrolisis urea menjadi amonium dan CO<sub>2</sub>. Amonia dapat terhidrolisis lebih lanjut menjadi ammonium, dengan reaksi sebagai berikut (Tabatabai 1992) :



Urease memegang peranan penting dalam siklus Nitrogen terutama di lahan pertanian. Tingginya tingkat hidrolisis urea dapat mengakibatkan berkurangnya amonia karena penguapan. Dalam konsentrasi yang tinggi, amonia dan nitrat dapat meracuni tanaman. Hidrolisis urea berlangsung pada pH 7,0-8,0 (Schinner *et al.* 1996). Enzim urease di tanah terikat kuat dengan bahan organik dan mineral tanah (Alef & Nannipieri 1995). Aktivitas enzim urease dapat ditentukan dengan mengukur amonium yang dihasilkan. Untuk menetapkan jumlah amonium yang dihasilkan dapat digunakan pereaksi Nessler (Vogel 1990). Setiap gugus amonium hasil aktivitas urease diikat oleh larutan merkuri iodida yang diindikasikan dengan adanya perubahan intensitas warna. Perubahan intensitas warna tersebut dapat diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 420 nm (Alexander 1977). Untuk menentukan standar digunakan larutan amonium klorida. Reaksi antara amonium yang dibebaskan oleh enzim urease dengan pereaksi Nessler adalah sebagai berikut:



Penetapan aktivitas urease pertama kali ditetapkan berdasarkan metode Kandeler dan Gerber (1988), kemudian berkembang beberapa metode seperti yang dilakukan oleh Sinsabaugh *et al.* (2000) menggunakan metode *microplate assay*. Metode ini berdasarkan inkubasi menggunakan suspensi tanah yang sedikit jumlahnya dengan substrat urea pada 96 *well plates*, dan langsung mengukur amonia yang dihasilkan tanpa tahapan sentrifugasi. Selanjutnya Cordero *et al.* (2019) mengembangkan metode ini dengan mengadopsi metode Kandeler dan Gerber (1988) yaitu dengan penambahan KCl dan setrifugasi, sebelum penetapan kadar ammonia.

## Penetapan Aktivitas Urease (Kandeler & Gerber 1988)

Prinsip : amonia yang dihasilkan setelah contoh dan substrat urea diinkubasi 2 selama jam pada suhu 37°C dapat diukur secara kolorimetrik

### Alat

- Mikropipet P-1000 dan P-200
- Mikrotip 1000  $\mu\text{L}$  dan 200  $\mu\text{L}$
- Tabung reaksi
- Inkubator goyang
- Neraca Analitik (ketelitian 2 desimal)
- Autoklaf
- Pembakar bunsen
- pH Meter
- Sterile cabinet / Laminar Air Flow (LAF)
- Vortex
- Tabung sentrifus
- Spektrofotometer

### Bahan

- 40 mM urea
  - 0,24 g urea
  - 100 mL buffer sodium asetat pH 5,5)
- 0,3 M NaOH
- Larutan Na salisilat
  - 17 g Na salisiat
  - 120 mg Na nitroprusside
  - 100 ml air bebas ion
- Larutan Na salisilat/NaOH (dibuat sesaat akan digunakan)
  - 1 bagian 0,3M NaOH
  - 1 bagian Na salisilat solution
  - 1 bagian air bebas ion
- Larutan Na dikloroisianidin (dibuat sesaat akan digunakan)
  - 0,1 g Na dikloroisianidin
  - 100 mL air bebas ion
- Pereaksi Nessler
  - Pereaksi Nessler dari berbagai merk telah banyak dijual, dan cara menggunakannya mengikuti aturan dari merk yang dipilih.

## Prosedur

### 1. Preparasi contoh

- Campurkan 2 g tanah basah dalam 60 mL 50 mM buffer sitrat pH 5 menggunakan alat pencampur (*blender*) selama 1 menit dan suspensi dituangkan dalam botol Nalgene yang tertutup rapat (menggunakan *screw-cap*).
- Sambil suspensi tetap diaduk menggunakan magnetic stirrer, pipet 750  $\mu\text{L}$  suspensi ke tabung sentrifus berkapasitas 2mL sebanyak 3-4 ulangan. Untuk kontrol hanya menggunakan bufer sitrat saja sebanyak 2 ulangan.
- Tambahkan 750  $\mu\text{L}$  larutan urea pada setiap tabung, kecuali kontrol. Konsentrasi akhir dari substrat adalah 20mM urea.
- pH optimum untuk penetapan urease adalah 7,0-8,0

### 2. Pembuatan kurva standar

- Standar ammonium menggunakan standar Alpkem 1000 ppm  $\text{NH}_4$  (71,43 mM N), encerkan 100x menggunakan bufer asetat sehingga diperoleh konsentrasi 714  $\text{nmol mL}^{-1}$ . Lakukan pengenceran 2x sehingga diperoleh konsentrasi 357, 179, 89,3, 44,6 dan 23,3  $\text{nmol/mL}$ . Buat kurva standar berdasarkan rentang konsentrasi tersebut.
- Semua tabung dinkubasikan dalam inkubator goyang pada suhu ruang selama 2-18 jam.
- Tabung disentrifugasi pada 10.000 rpm selama 1 menit

### 3. Penetapan ammonium (Kandeler & Gerber 1988)

Metode penetapan ini dilakukan tanpa penambahan KCl untuk mengakhiri reaksi.

- Pipet 0,5 mL supernatan atau standar ke dalam tabung reaksi berkapasitas 10 mL, tambahkan 2,5 mL NaOH/Na salisilat dan 1 mL pelarut Na isosianidin. Blanko dibuat dengan menambahkan bufer asetat sebagai pengganti supernatan.
- Tabung diinkubasikan pada suhu ruang selama 30 menit.
- Lakukan pembacaan OD menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 690 nm.
- Hitung aktivitas urease melalui  $\text{nmol ammonium}$  yang dilepaskan per jam per gram contoh.

OD final = (rata-rata OD sampel – rata-rata OD kontrol – rata-rata OD kontrol substrat)

Aktivitas urease dihitung dalam satuan  $\mu\text{mol NH}_4$  atau  $\text{nmol NH}_4 \text{ jam}^{-1}\text{g}^{-1}$

## Pengukuran Aktivitas Enzim Urease (Schinner *et al.* 1996)

### Prosedur

- Tanah ditimbang sebanyak 5 gram, dimasukkan ke dalam botol, kemudian tambahkan 2,5 mL substrat urea.
- Sebagai control 5 gram tanah, ditambahkan 2,5 mL akuades sebagai pengganti substrat.
- Botol ditutup dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 2 jam.
- Lanjutkan dengan penambahan 2.5 mL akuades ke dalam sampel dan 2,5 mL substrat ke dalam contoh kontrol.
- Untuk mengakhiri reaksi tambahkan 50 mL larutan KCl pada semua tabung dan dikocok selama 30 menit dan disaring.
- Supernatan dipipet sebanyak 1 mL ke dalam tabung reaksi, kemudian tambahkan 0,2 mL pereaksi Nessler dan 9 mL akuades ke semua dalam tabung reaksi dan dihomogenkan.
- Diamkan selama 10 menit, absorbansinya diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 420 nm.

### Pembuatan kurva standar

- Larutan standar amonium dipipet masing-masing 0.00, 0.50, 0.75, 1.00, 1.25, 1.50, dan 2,5 mL ke dalam labu takar 50 mL dan ditera dengan akuades.
- Setiap deret konsentrasi larutan standar ammonium, tambahkan masing-masing 1 mL ke dalam tabung reaksi,
- Selanjutnya tambahkan 9 mL akuades dan 0,2 mL pereaksi Nessler ke dalam tabung reaksi, dan dihomogenkan.
- Inkubasikan selama 10 menit, absorbansinya diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 420 nm.

Pengukuran aktivitas enzim urease dinyatakan sebagai unit/gram tanah, dihitung berdasarkan rumus:

$$\text{Aktivitas urease} = \{(S - C).10.A.100\} / (B.\%dm.a.b)$$

Keterangan :

- S = konsentrasi sampel ( $\mu\text{g NH}_4^+$ )
- C = konsentrasi kontrol ( $\mu\text{g NH}_4^+$ )
- 10 = faktor pengenceran
- A = volume ekstrak (mL)

- B = bobot tanah (g)  
%dm = faktor untuk bobot kering tanah  
a = bobot molekul  $\text{NH}_4^+$  ( $\text{g mol}^{-1}$ )  
b = waktu inkubasi

### Daftar Pustaka

- Alef K, Nannipieri P. 1995. Urease activity. p 316-320 *In* Alef K, Nannipieri P (Eds.). Methods in Applied Soil Microbiol. Biochem. Academic Press, London.
- Alexander M. 1977. Introduction to Soil Microbiology. New York: Cornell University.
- Cordero I, Snell H, Bardgett RD. 2019. High throughput method for measuring urease activity in soil. Soil Biol. Biochem. 134 : 72-77.
- Kandeler E, Gerber H. 1988. Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium. Biol. Fertil. Soils 6: 68–72.
- Sinsabaugh RL, Reynolds H, Long TM. 2000. Rapid assay for amidohydrolase (urease) activity in environmental samples. Soil Biol. Biochem. 32: 2095–2097.
- Schinner F, Kandeler E, Öhlinger R, Margesin R. 1996. Methods in Soil Biology. Springer German.
- Tabatabai M. 1982. Soil enzymes. p 903-947. *In* Page AL, Miller RH, Keeney DR (Eds.), Methods of Soil Analysis, Part 2. American Society of Agronomy, Madison,
- Vogel. 1990. Buku Teks Analisis Anorganik Kualitatif Makro dan Semimikro. Edisi ke-5. Penerjemah L. Setiono & A. Hadyana Pudjastmaka. Jakarta: Kalman Media Pustaka.

*The remarkable capacity of the immune system to respond to many thousands of different substances with exquisite specificity saves us all from certain death by infection.*

Martin C. Raff

# 5

## FAUNA TANAH

---

---

Pada edisi kedua ini, tidak banyak yang berubah pada bab fauna tanah. Belum ada penambahan subbab/topik baru, tetapi ada beberapa pembaharuan di masing-masing subbabnya. 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.

*Nothing is more agreeable to those devoted to a scientific career than to increase the number of discoveries, but when the results of these observations are demonstrated by practical utility, their joy is complete.*

Louis Pasteur

# 5.1

## PROSEDUR PENGAMBILAN CONTOH UNTUK PENELITIAN FAUNA TANAH

*Jati Purwani, Surono, Sarmah, Ea Kosman Anwar<sup>†</sup>*

Tanah kaya akan berbagai komponen biotik, salah satunya adalah fauna tanah yang terdiri dari berbagai ukuran dan bentuk kehidupan. Komponen biotik di dalam tanah memberi sumbangan terhadap proses aliran energi dari ekosistem tanah antara lain dengan melakukan penguraian sisa-sisa tumbuhan dan hewan yang telah mati (dekomposisi). Ketersediaan energi seperti bahan organik dan biomassa hidup yang semuanya berkaitan dengan aliran siklus karbon dalam tanah mempengaruhi keberadaan dan kelangsungan hidup fauna tanah (Hilwan & Handayani 2013). Ketersediaan energi dan hara bagi fauna tanah memberikan efek positif untuk perkembangan dan aktivitas fauna tanah dan akan memberikan dampak positif juga bagi kesuburan tanah (Suheriyanto 2012).

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). Wallwork (1970) membedakan berdasarkan ukuran yaitu mikrofauna (< 100 µm, mesofauna (100 µm – 2 mm), dan makrofauna (> 2 mm) yang berperan sebagai pengatur aktivitas mikroorganisme. Makrofauna (> 2 mm) berperan dalam mengolah tanah yang menjadi habitat mikro bagi biota tanah lainnya (Wallwork 1970, Brussaard 1998). 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. 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

<sup>†</sup>*Sudah meninggal dunia*

tingkat kesehatan tanah di suatu daerah pertanian (Adianto 1983). Fauna tanah merupakan indikator yang paling sensitif terhadap perubahan dalam penggunaan lahan, sehingga dapat digunakan untuk menduga kualitas lahan (Rousseau et al. 2013).

## Prinsip

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).

Sebagian besar aktivitas biologis mesofauna tanah ditemukan pada kedalaman 20 cm sesuai dengan lapisan bajak di tanah pertanian (Neher & Barbercheck 1999). Kedalaman pengambilan sampel 10 cm untuk penilaian populasi *invertebrate* tanah (Galli et al. 2014, Parisi et al. 2005, Smith et al. 2008), namun demikian ketika mempertimbangkan sampel tanah pada 10 cm kedalaman tanah mempunyai kelemahan diantaranya ada organisme tanah yang bermigrasi setiap hari dan musiman, seperti mites (klas Arachnida), springtails (kolembola) dan isopoda dapat bergerak mulai dari beberapa milimeter hingga beberapa sentimeter ke permukaan (Menta 2012), symphyla yang bisa turun hingga 40 cm, cacing tanah anesik menggali tanah hingga 1 m di bawah permukaan pada siang hari (Smith et al. 2008).

Metode pengambilan contoh tanah 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)

## 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:

- 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.
- 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.
- 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.
- Metode zigzag yaitu menempatkan titik-titik pengambilan contoh tanah secara zigzag pada kondisi areal pengamatan sesuai keadaan lapangan.

## **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

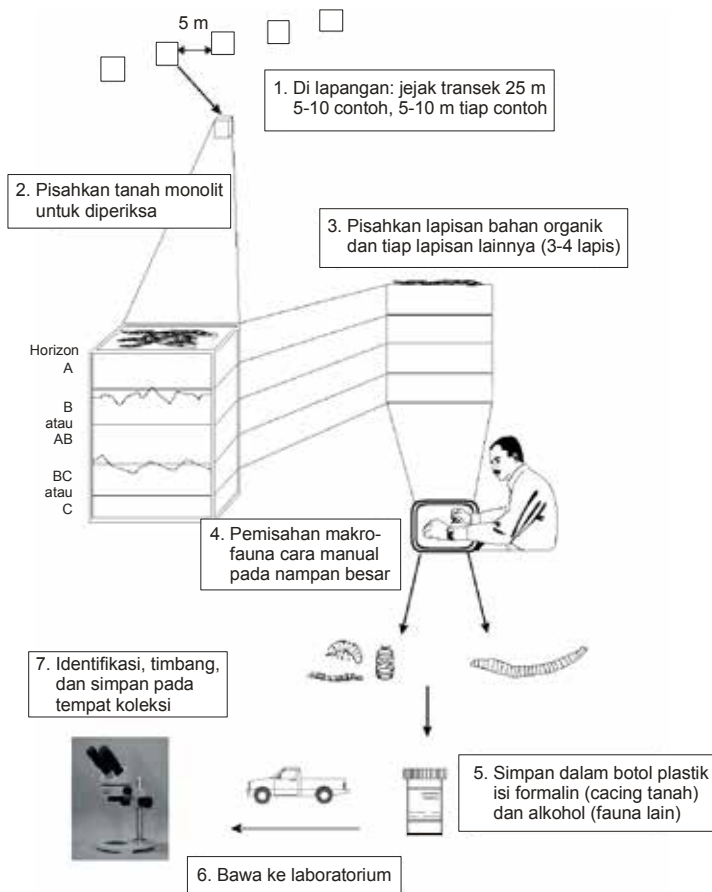
### **Bahan**

- formalin 4%
- alkohol 70%.
- Deterjen

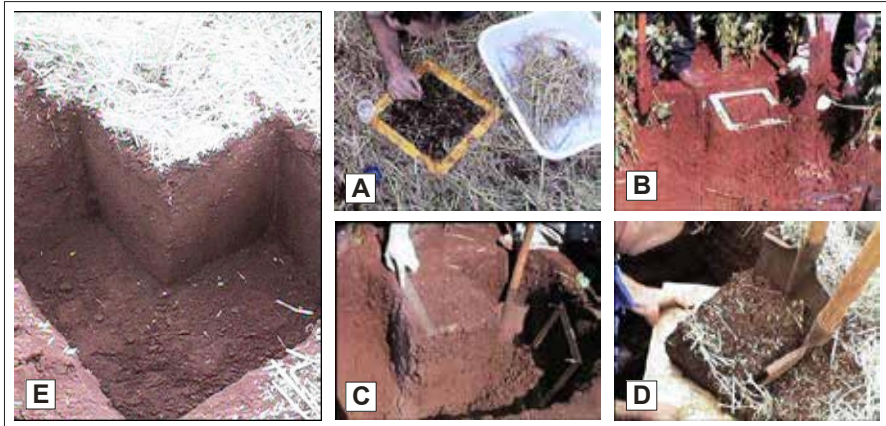
# 1. Pengambilan Contoh Tanah Monolit (Metode TBSF, Anderson & Ingram, 1993)

## Prosedur

- Tahapan pengambilan contoh tanah cara 'monolit' pada tiap titik pengambilan contoh sepanjang garis penarikan contoh (Gambar 1).
- Titik pengambilan contoh ditandai dengan ajir 5-10 titik pengambilan contoh untuk 'monolit', sesuai jarak antara ajir 5-10 m sepanjang garis penarikan contoh. 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.



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)

- 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).
- 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, diwadahi dengan 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 0,42 m<sup>3</sup> 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.

## **2. Pengambilan Contoh Tanah Metode Neuman**

### **Prosedur**

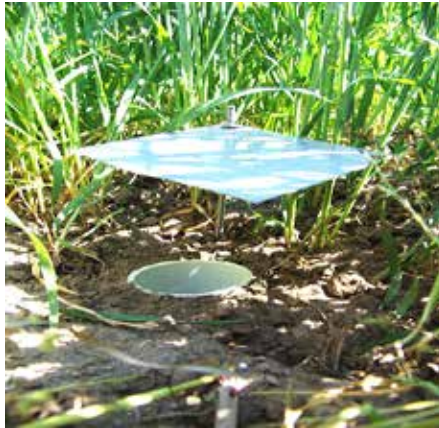
- Tahapan pengambilan contoh tanah metode Neuman (Suin 2003) hampir sama dengan cara 'monolit' yaitu pada tiap pengambilan contoh sepanjang garis penarikan contoh.
- Tentukan dan tandai dengan ajir 5-10 titik pengambilan contoh sesuai dengan jarak 8 m sepanjang garis penarikan contoh. Lebih banyak lebih 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 cm<sup>3</sup> 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.

### **Pengambilan Contoh Fauna di Permukaan Tanah**

Untuk membandingkan populasi fauna tanah antar plot sebagai akibat perlakuan, maupun untuk mengetahui dinamika populasi fauna permukaan tanah



Gambar 3. Barlese Tullgren (kiri), bor tanah (kanan)



Gambar 4. Pitfall trap (perangkap “Barber”) Sumber: [https://id.images.search.yahoo.com/search/images?\\_ylt=AwrPrhBgGCFj3psWgQvLQwx.;\\_ylu=Y29sbwNzZzMEc-G9zAzEEdnRpZAMEc2VjA3Nj?p=photo+pitfall+trap&fr=mcafee#id=10&i-url=https%3A%2F%2Fwww.amentsoc.org%2Fimages%2Fpitfall-trap-photo.jpg&action=click](https://id.images.search.yahoo.com/search/images?_ylt=AwrPrhBgGCFj3psWgQvLQwx.;_ylu=Y29sbwNzZzMEc-G9zAzEEdnRpZAMEc2VjA3Nj?p=photo+pitfall+trap&fr=mcafee#id=10&i-url=https%3A%2F%2Fwww.amentsoc.org%2Fimages%2Fpitfall-trap-photo.jpg&action=click)

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

- Prinsip kerja pitfall trap adalah perangkap hewan yang berkeliaran di permukaan tanah akan jatuh terjebak dalam pitfall trap dan hewan tersebut akan mati dan terawetkan oleh formalin yang ada di dalamnya.
- Pitfall trap ditanam pada setiap plot atau pada sekitar titik- titik monolit atau pada sekitar interval 4 m 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.
- Perangkap diletakkan pada sore hari atau pada permulaan malam hari dan dibiarkan selama 24 jam. Dalamnya perangkap tidak terlalu berpengaruh, tetapi mulutnya harus persis sama rata dengan permukaan tanah.

## 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 masukkan 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.

## 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.

### **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 kantong 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 JM, Ingram JSI. 1993. Tropical soil biology and fertility: A Handbook of Methods, 2nd ed. CAB International. Wallingford. UK.
- Anonymous. 2022. [https://id.images.search.yahoo.com/search/images;\\_ylt= AwrPrhBg-GCFj3ps WgQvLQwx.;ylu=Y29sbwNzZzMEcG9zAzEEdnRpZAMEc2VjA3Nj?p=-photo+pitfall+trap&fr=mcafee#id=10&iurl=https%3A%2F%2Fwww.amentsoc.org%2Fimages%2Fpitfall-trap-photo.jpg&action=click](https://id.images.search.yahoo.com/search/images;_ylt= AwrPrhBg-GCFj3ps WgQvLQwx.;ylu=Y29sbwNzZzMEcG9zAzEEdnRpZAMEc2VjA3Nj?p=-photo+pitfall+trap&fr=mcafee#id=10&iurl=https%3A%2F%2Fwww.amentsoc.org%2Fimages%2Fpitfall-trap-photo.jpg&action=click)
- Anwar EK, Kabar P, 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.
- Galli LM, Capurro C. Menta, Rellini I. 2014, 'Is the QBS-ar index a good tool to detect the soil quality in Mediterranean areas? A cork tree *Quercus suber* L. (Fagaceae) wood as a case of study', Italian Journal of Zoology, vol. 8, no.1, pp. 126-135.
- Hanafiah KA, Anas I, Napoleon A, Ghoffar N. 2003. Biologi Tanah. Ekologi dan Makrobiologi Tanah. Divisi Buku Perguruan Tinggi. PT Raja Grafindo Persada. Jakarta
- Hidayat A. Makarim AK. 1992. Pengambilan dan Persiapan Contoh Tanah dan Tanaman. Bulletin Teknik No.4. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. Balai Penelitian Tanaman Pangan. Bogor.
- Hilwan I, Handayani EP. 2013. Keanekaragaman Mesofauna dan Makrofauna Tanah pada Areal Bekas Tambang Timah di Kabupaten Belitung, Provinsi Kepulauan Bangka-Belitung. Jurnal Silvikultur Tropika, 4(1), 35-41.
- Lembaga Penelitian Tanah. 1979. Penuntun Analisis Fisika Tanah. Departemen Pertanian. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. Bogor.
- Menta C. 2012. Soil Fauna Diversity. Function, Soil Degradation, Biological Indices, Soil Restoration. Biodiversity Conservation and Utilization in a Diverse World. Chapter 3. DOI: 10.5772/51091
- Neher D A, Barberc ME. 1999, Diversity and function of soil mesofauna, Biodiversity in agroecosystems, pp. 27-47.

- Parisi VC, Menta C, Gardi, C, Jacomin, Mozzanica. E 2005. 'Microarthropod communities as a Soil Fauna Extraction approach in Italy', *Agriculture, ecosystems & environment*, vol. 105, no. (1-2), pp. 323-333
- Rousseau LSJ, Fonte O, Tellez, Hoek RVD, Lavelle. 2013. Soil macrofauna as indicator of soil quality and land use impact in smallholder agroecosystems of western Nicaragua. *Ecological indicators*. 27(2013): 71-82
- Smith J, Potts S, Eggleton P. 2008. 'Evaluating the efficiency of sampling methods in assessing soil macrofauna communities in arable systems'. *European Journal of Soil Biology*, vol. 44, no. 3, pp. 271-276.
- Suheriyanto D. 2012. Keanekaragaman Fauna Tanah Di Taman Nasional Bromo Tengger Semeru Sebagai Bioindikator Tanah Bersulfur Tinggi. Malang. *Jurnal Sainstis*, 1 (2), 34-40
- Suin NM. 2003. *Ekologi Hewan Tanah*. Penerbit Bumi Aksara dan Pusat Antar Universitas Ilmu Hayati. ITB
- Thomas CA, Mitchell GH. 1951. Eelworms. *Nemathodes as pest of mushrooms*. *MGA Bull.* 22: 61-7

## 5.2

# ANALISIS KELIMPAHAN DAN KERAGAMAN FAUNA TANAH

Jati Purwani, Sarmah, Dila Aksani, Edi Santosa

Tanah mempunyai keanekaragaman hayati yang tinggi, baik di atas maupun di bawah permukaan tanah. 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), mendorong fungsi ekosistem penting seperti pergantian bahan organik dan siklus hara (Wardle *et al.* 2006, Bardget & Wardle 2010).

Kelompok fauna tanah yang dipisahkan berdasarkan ukuran berguna untuk memahami perannya dalam ekosistem tanah (Wolters 2001). Berdasarkan ukuran, secara garis besar terdapat 3 kelompok Invertebrata yang hidup di dalam tanah, yaitu: mikrofauna (protozoa dan nematoda) ( $< 100 \mu\text{m}$ ), mesofauna ( $100 \mu\text{m} - 2 \text{mm}$ ), dan makrofauna ( $> 2 \text{mm}$ ) (Wallwork 1970). 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. Makrofauna mempunyai peran penting dalam perbaikan sifat fisik, kimia dan biologi tanah serta memberikan fasilitas lingkungan (mikrohabitat) untuk aktivitas dekomposisi bahan organik (Wibowo & Rizkiyah 2014). 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. Menurut Maftu'ah *et al.* (2005) diversitas fauna tanah tergantung pada tipe penggunaan dan pengelolaan lahan, keaneka ragaman tanaman meningkatkan kelimpahan dan keragaman fauna tanah (Yakun *et al.* 2022).

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.

### Prinsip

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-Tulgren 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 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.

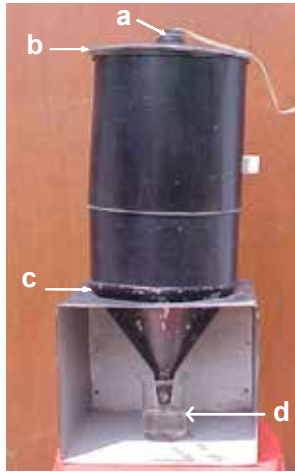
## Analisis Kelimpahan dan Kepadatan Fauna Tanah (Woolley 1982)

### 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 akuades 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).

### Prosedur

1. Pemasangan dan penggunaan alat
  - Masukkan contoh tanah sebanyak  $\pm 1$  kg atau 1 L ke dalam corong Berlese-Tullgren. Corong Berlese-Tullgren menggunakan cahaya untuk mengintensifkan gradien lingkungan untuk mempercepat pemulihan organisme. Panas berasal dari lampu yang diletakkan di atas sampel untuk menghindari kontak langsung akan memaksa pergerakan organisme keluar (Coleman *et al.* 2004). 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 corong dianginkan lebih dahulu pada suhu kamar selama 1 - 4 hari. Sedangkan contoh tanah yang baru diambil dari lapang bisa langsung dimasukkan ke dalam



Gambar 1. Corong Berlese Tullgren modifikasi: (a) tempat bohlam, (b) penutup, (c) letak penyaring (penyaring di dalam tabung), dan (d) botol penampung

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.

## 2. 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 tanah 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%.

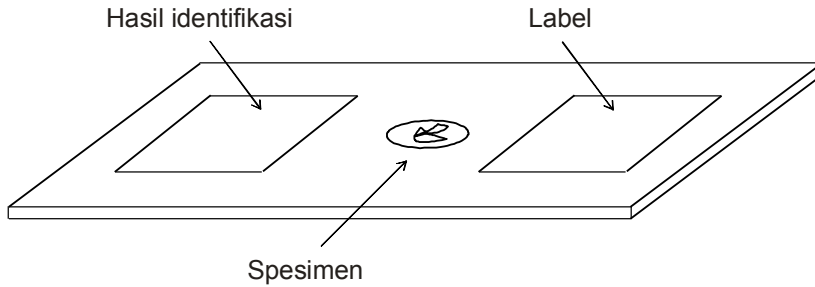
- Contoh makrofauna yang telah dikumpulkan/diperoleh dari hasil koleksi di lapangan, pisah-pisahkan (*sorting*) menurut kelompok/jenis katagori takson tertentu. Pemisahan bagi jenis-jenis makrofauna hasil koleksi di lapangan bisa dilakukan dengan pengamatan mata telanjang atau dengan bantuan kaca pembesar. 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 pada contoh tanah.

### 3. 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 Struktur tubuh Acarina, a) cephalothorax (kepala dan dada bersatu), b) badan (abdomen) c). kaki (1-4 pasang)

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.

#### 4. 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



Interpretasi:

- 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).

$$\text{Indek keragaman} = \sum (ni/N) \ln (ni/N)$$

$$\text{Indek dominansi} = \sum (ni/N)^2$$

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 dominansi 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 dominansi 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.

## Ulasan

Mengingat sulitnya dalam mengidentifikasi semua spesies yang ada di tanah, banyak studi menggunakan pembagian kelompok fungsional dan parameter kelimpahan atau kekayaan spesies untuk memahami peran mereka dalam ekosistem. Klasifikasi berdasarkan ukuran tubuh memiliki dampak luas pada pengambilan sampel dan mempelajari kelompok yang berbeda (Bengtsson 1998, Wolter 2001).

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 dan mudah 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

- Bardget RD, Wardle DA. 2010. Aboveground-belowground linkages: biotic interactions, ecosystem processes, and global change. Oxford University Press, Oxford
- Bengtsson J. 1998. Which species? What kind of diversity? Which ecosystem function? Some problems in studies of relation between biodiversity and ecosystem function. *Appl Soil Ecol* 10: 191-199.
- Coleman DC, Crossly Jr DA, Hendrix PF. 2004. Fundamentals of soil ecology. 2 edn. Elsevier Academic Press, Brlington, San Diego, London
- Curry JP, Good JA. 1992. Soil fauna degradation and restoration. *Adv. Soil Sci.* 17: 171-215.
- Dindal DL. 1990. Soil Biology Guide. A Willy Interscience Pub. John Wiley & Sons. New York. Chicester. Brisbane. Toronto. Singapore.
- Hill BS. 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 GW. 1978. A Manual of Acarology. 2nd Ed. Origion State University Book Store, Inc. Carvalis.
- Lake E, Supak S. 1996. What's the deal with yucky old worms? Sierra Pelona Press. p. 1-2.
- Maftu'ah E, Alwi M, Wilis M. 2005. Potensi Makrofauna tanah sebagai bioindikator kualitas tanah gambut. *Bioscientiae*. 2(1): 1-14.
- Odum EP. 1971. Fundamentals of Ecology. 3rd ed. W.B. Sanders Company Philadelphia, London.
- Schuh RT, Slater JA. 1995. Frue Bugs of the World (Hemiptera: Heteroptera) Classification and Natural History. Comstock Pub. Associates. Cornell University. Ithaca and London.

- Suin NM. 2003. *Ekologi Hewan Tanah*. Bumi Aksara Jakarta. Pusat Antar Universitas Ilmu Hayati. ITB
- Wallwork JA. 1970. *Ecology of soil animals*. McGraw-Hill, London
- Wardle DA. 2006. The influence of biotic interactions on soil biodiversity. *Ecol. Lett.* 9:870-886. doi: 10.1111/j.1461-0248.2006.00931.x
- Witt B. 2004. Using soil fauna to improve soil health. <http://www.hort.agri.umn.edu/h5015/97papers/witt.html> (21-4-2007).
- Woolley TA. 1982. Mites and other soil microarthropods. p. 1131-1142. In Page AL, Miller RH, Keeney DR (Eds.) *Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties*. 2nd ed. Soil Science Society of America, Madison, WI.
- Wolters V. 2001. Biodiversity of soil animals and its function. *Eur. J. Soil Biol.* 37: 221-227
- Yakun Z, Peng S, Chen X, Chen HYH. 2022. Plant diversity increases the abundance and diversity soil fauna: A meta-analysis. 2022. *Geoderma* 411, 115694

## 5.3

# ANALISIS KELIMPAHAN POPULASI DAN KARAKTERISASI CACING TANAH

*Ea Kosman Anwar<sup>†</sup>, Ety Pratiwi*

Cacing tanah merupakan Oligochaeta yang berperan penting dalam proses dekomposisi bahan organik. Cacing tanah memakan serasah daun dan sisa-sisa tumbuhan dan menjadi 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.

Aktivitas 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 kascing dan menggali lubang di dalam tanah untuk sistem 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 lubang masing-masing jenis cacing tanah tidak sama, ada yang dilakukan dengan mendesak massa tanah dan ada pula yang dilakukan dengan memakan langsung massa tanah (Minnich 1977). Kelompok geofagus akan memakan massa tanah, dan kelompok *litter feeder* limifagus biasanya dengan mendesak massa tanah. Lubang 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 lubang cacing dan kotorannya (kascing) pada perlakuan tanpa olah tanah (TOT), sedangkan 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).

<sup>†</sup>*Sudah meninggal dunia*

Beberapa metode sampling kuantitatif dan kualitatif bagi cacing tanah (*Lumbricidae*) adalah metode sortasi dengan tangan, ekstraksi kimia dan ekstraksi listrik. Tidak satu pun 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 dinamis 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.

## **Pengumpulan (Koleksi) Cacing Tanah**

### **Alat**

- Sekop kecil dan besar
- Nampan besar untuk menampung dan membersihkan cacing, nampan be-  
dah 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 mL formalin dalam 998 mL – 996mL 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

### 1. 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
- Hitung kepadatan populasi dan kepadatan relatif yang mengacu kepada Suin (2003)

### 2. 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
- Hitung kepadatan populasi dan kepadatan relatif yang mengacu kepada Suin (2003)

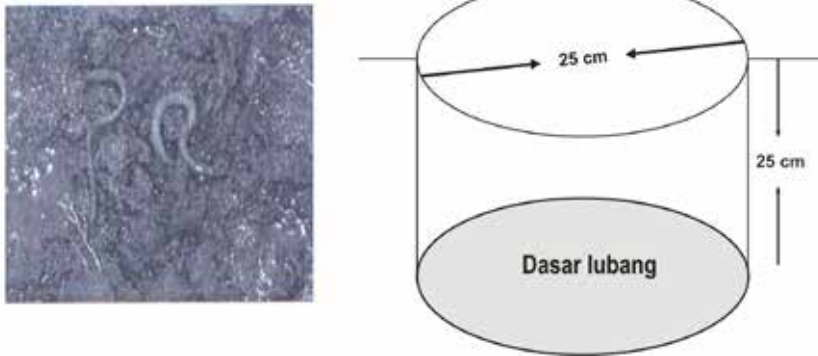
- Keefektifan metode ini sangat ditentukan oleh kandungan air tanah, pada tanah yang kurang mengandung air metode ini akan kurang efektif.
3. Pengumpulan langsung (sortasi dengan tangan)
- Lakukan penghitungan kuantitatif dengan cara mengumpulkan langsung dengan tangan pada tempat sampling seperti pada lapisan serasah organik yang berstruktur lepas, dengan luas yang telah ditentukan 1 m x 0,5 m atau 1 m x 1 m (lebih luas lebih bagus disesuaikan dengan tenaga yang tersedia).
  - Cacing tanah yang ukurannya besar dan masih hidup, identifikasi bisa dilakukan di lapangan.
  - 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
  - Hitung kepadatan populasi dan kepadatan relatif yang mengacu kepada Suin (2003)
  - Metode dianggap lebih efisien.
4. 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 ke dalam tanah sedalam mungkin. Dengan sekop yang lebar gali lebih dalam ke dalam 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 kantong 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
  - Hitung kepadatan populasi dan kepadatan relatif yang mengacu kepada Suin (2003)
  - Metode ini efektif untuk mengetahui populasi cacing tiap lapisan tanah.
5. Dengan pembuatan lubang
- Pilih lokasi tanah yang mewakili (representatif), hindari tempat-tempat yang mungkin memengaruhi populasi cacing tanah, seperti mulsa atau tumpukan

kompos.

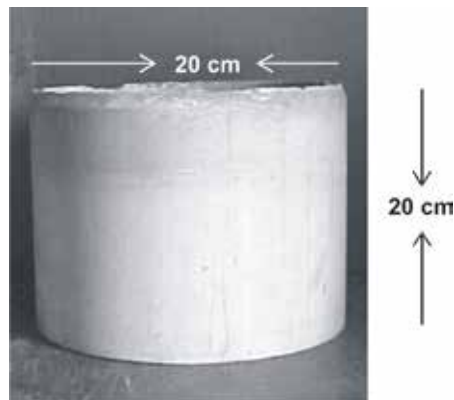
- Menggali tanah (plot)
- Ukur luasan galian tanah (25 cm x 25 cm) dan gali sampai kedalaman 25-30 cm dengan sekop, upayakan seminimal mungkin cacing yang terpotong sekop.
- Sortasi tanah galian dengan tangan untuk diambil cacing tanahnya.
- Hitung jumlah cacing. Sortir lagi sampel tanah pada sebuah 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
- Hitung kepadatan populasi dan kepadatan relatif yang mengacu kepada Suin (2003)
- 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.

#### 6. 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 dimasukkan 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 dikumpulkan dan dimasukkan ke dalam wadah botol yang berisi alkohol 20% selama 5 – 6 menit agar tidak mengerut, kemudian dimasukkan lagi ke dalam botol berisi campuran alkohol 70% 640 mL, boraks 4 g, dan formalin 40 mL.
- Bawa ke laboratorium untuk diidentifikasi
- Identifikasi menggunakan kunci panduan dan masing-masing dihitung jumlah dan ditimbang beratnya.
- Hitung kepadatan populasi dan kepadatan relatif yang mengacu kepada Suin (2003).



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)



Gambar 2. Ring sampel terbuat dari PVC diameter 20 cm tinggi 20 cm

### Penghitungan Kelimpahan Populasi Cacing

Analisis kelimpahan fauna tanah, dikonversi ke luasan, volume atau berat tanah tertentu, misalnya luasan 1 m<sup>2</sup>, 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<sup>2</sup>), 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).

## 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 ke dalam alkohol 50%, angkat kembali setelah cacing tidak bergerak lagi; dan 3) dibius dengan alkohol 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 online 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 klitelum (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 klitelum dekat kepala cacing



Gambar 3. Cacing dewasa (foto kiri); tangan harus selalu dalam keadaan lembap pada saat identifikasi cacing tanah (foto kanan) (Sumber: James 2005)

tanah. Klitelum 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.

### Beberapa hal yang perlu diperhatikan sebelum memulai identifikasi cacing

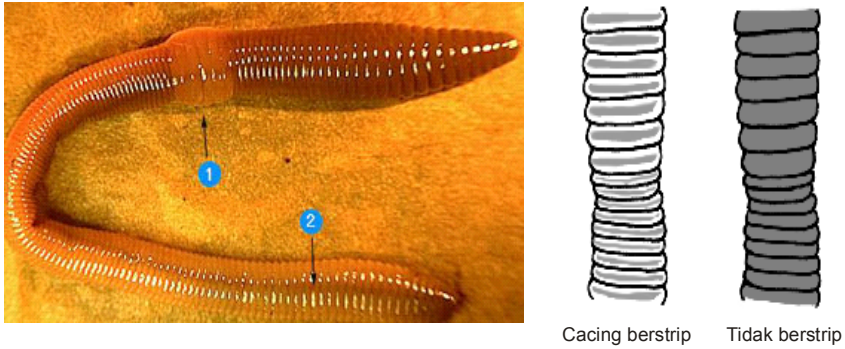
Siapkan Kunci Taksonomi yang akan digunakan sebagai penuntun diagram alur. Dimulai dengan sifat-sifat dasar yang spesifik pada masing-masing level. Ketika pengamatan turun satu cabang dari diagram alur, sisihkan ciri-ciri cacing yang tidak diperlukan dan pilih ciri cacing sedikit saja yang paling penting.

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.

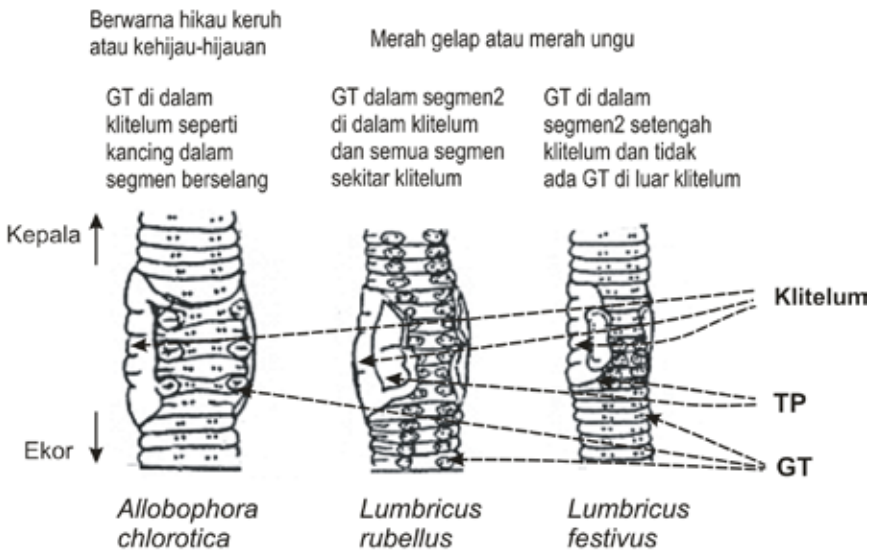
### Memulai identifikasi cacing.

Untuk memulai identifikasi cacing, turun ke halaman berikutnya dan pilih kunci start online (<http://www.nrri.umn.edu.worm/key/diagram.htm>).

- 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.
- Warna cacing. Pastikan yang dilihat bagian belakang (dorsal) dari tubuh cacing. Bagian ventral cacing sebagian besar tidak berwarna, sehingga tidak dapat



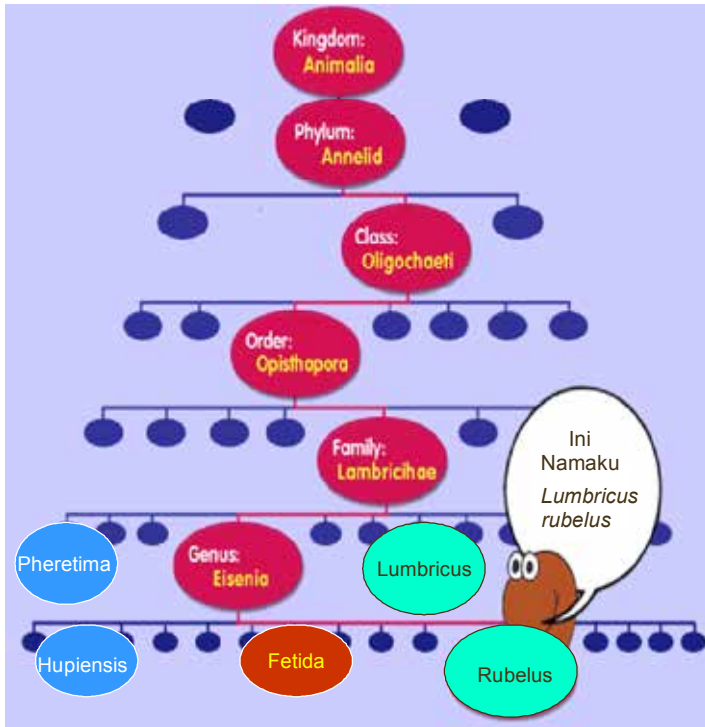
Gambar 4. Penampang belakang cacing tanah: 1. klitelum, 2. segmen (Sumber: James 2005)



Gambar 5. Penampang depan (ventral) genital tumescence (GT), Tubercula pubertatis (TP) dan klitelum cacing tanah (Sumber: James 2005)

digunakan untuk identifikasi. Amati dan perhatikan warna antara kepala dan klitelum. Di bagian ini biasanya terjadi pigmentasi. Warna cacing sebagian besar solid, dan sebagian berstrip-strip. Dalam Kunci Taksonomi Online, *Eisenia foetida* merupakan spesies strip, punya segmen-segmen berwarna merah, dan alur-alur antara segmen berwarna kuning.

- Tubercula pubertatis (TP) dan genital tumescence (GT) yang berada pada sisi bagian depan (ventral) dari klitelum, merupakan ciri taksonomi yang sangat penting. Perhatikan apakah semua GT berlokasi di dalam klitelum, atau beberapa ditemukan di luar klitelum? Apakah ukuran TP seperti segitiga atau batang? Apakah TP lebih panjang dari klitelum atau lebih pendek (Gambar 5).



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 : Opisthopora (pada tiap ruas terdapat sepasang lubang)
- Famili : Lambrichae (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 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 *Online* melalui email.

## 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 piranti reproduksi cacing tanah, apabila klitelum berada
  - di depan segmen ke 15, teruskan ke (2) tetapi jika
  - setelah segmen ke 15 adalah famili *Lumbricidae*, teruskan ke(4)
2. Setae tersusun menurut pola :
  - Perisetin : Genus *Pheretima* (f.Megascolecidae),
  - Lumbrisin, teruskan ke (3)
3. Lubang kelamin jantan pada segmen ke :
  - 17 atau pada 17/18, dan spermathecal di belakang segmen ke10: g *Eudrilus*, ke D
  - 18 dan spermathecal di depan segmen ke 10: g. *Diplocardia* (f. Eudrilidae), ke C;
  - 19 (semiaquatik): g. *Sparganophilus* (f. Sparganophilidae) ke D.
4. Prostomium
  - tanylobous, dan setae berpasangan erat paling tidak di bagian atas tubuhnya: g. *Lumbricus*.
  - Epilobous, atau jika tanylobous, setae berpasangan renggang atau berjarak di seluruh tubuhnya, teruskan ke (5)
5. Klitelum berada pada :
  - segmen ke 28, teruskan ke (6)
  - sebelum segmen ke 28, dan penampang tubuhnya berupa kuadrangul: g. *Eiseniella*.
6. Tubercula pubertatis:
  - tidak ada, meskipun, hanya berupa penebalan seadanya pada ujung klitelum: g. *Bimastos*.
  - ada, berupa tonjolan atau papillae yang terisolasi, teruskan ke (7)
7. Setae berpasangan secara:
  - dekat pada seluruh tubuh, ke (9)
  - dekat di bagian depan (area jantung) dan renggang di bagian belakang, tubercula pubertatis (TP) berupa tonjolan sepasang atau lebih panjang dari klitelum: g. *Octolasion*.
  - Renggang pada seluruh tubuh, TP berupa tonjolan (kecuali seperti tubercula terpisah) yang meluas Pada sebagian klitelum g. *Dendrobaena*

8. Lubang spermathecal :

- segaris dengan setae "d" atau lebih sering dekat garis punggung tengah, dan potongan melintang tubuh berbentuk trapesium g.*Eisenia* dan *Eisenoides*
- terletak antara setae "e" dan "d" atau "a" dan "b" atau "c" dan "d", dan potongan melintang tubuh tidak trapesium, ke (9).

9. Prostomium:

- dengan tonjolan longitudinal: g. *Eophila*.
- Tanpa tonjolan longitudinal, ke (10)

10. Kelenjar kalsiferous:

- dengan dua kantong lateral dalam satu segmen, hidup di daratan: g.*Allolobophora*
- Tanpa kantong lateral, bersifat amfibi: ag.*Helodrilus*.

### Daftar Pustaka

- Drees, LR, Karathanasis AD, Wilding LP, Blevins RL. 1994. Micromorphological Characteristics of Long-Term No-Till and Conventionally Tilled Soils. *Soil Sci. Amer. J.* 58 : 508 – 517.
- Fanning DS, & Fanning MCB. 1989. *Soil Morphology Genesis and Classification*. John Wiley and Sons. New York / Chichester / Brisbane / Toronto / Singapore. 365 p.
- Hanafiah KA, Anas I, Napoleon A, Ghoffar N. 2003. *Biologi Tanah. Ekologi dan Makrobiologi Tanah*. Divisi Buku Perguruan Tinggi. PT Raja Grafindo Persada. Jakarta.
- Herman's Adventure. [www.urbanext.uiuc.edu/worms](http://www.urbanext.uiuc.edu/worms). 6 Sept 2004. [http:// www.nrri.umn.edu/worm/key/diagram.htm](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 (Chapter 4). p.115-149. *In* Minnich, J. (Ed.). *The Earthworm Book, How to Raise and Use Earthworms for Your Farm and Garden*. Rodale Press Emmaus, P.A.
- Parmelee RW, Beare MH, Cheng W, Hendrix PF, Rider SJ, Crossley Jr. DA, Coleman DC. 1990. Earthworm and Enchytraeids in Conventional and No tillage Agroecosystems: A Biocide Approach to Assess Their Role in Organic Matter Breakdown. *Biol. Fertil. Soils* 10: 1–10.
- Schwert DP. 1990. Oligochaeta : Lumbricidae *In* Daniel L. Dindal *Soil Biology Guide*. A Wiley-Interscience Publication. John Wiley & Sons New York.
- Suin NM. 2003. *Ekologi Hewan Tanah*. Penerbit Bumi Aksara dan Pusat Antar Universitas Ilmu Hayati. ITB

## 5.4

# ANALISIS KELIMPAHAN NEMATODA

Sarmah, Rohani Cinta Badia Ginting, Ea Kosman Anwar<sup>†</sup>

Nematoda adalah metazoa paling melimpah di bumi. Nematoda merupakan hewan triploblastik, simetri bilateral, tidak bersegmen, *pseudoselomata* (rongga tubuh semu), *vermiform* (berbentuk cacing), tubuhnya transparan dan tidak berwarna. Dinding tubuh nematoda terdiri dari kutikula, lapisan hipodermis, dan lapisan *somatic musculature* (otot somatik). Nematoda tidak mempunyai organ pernapasan dan peredaran darah (Jenskin & Taylor 1967). Ukuran tubuhnya sangat kecil dengan panjang tubuh tidak lebih dari 2 mm dan diameter 0,05 mm (van Gudhy 1982).

Nematoda dapat dijumpai di darat, air laut, air tawar, dari daerah kutub hingga tropis. Hidupnya ada yang bebas (*free-living*), namun ada pula yang bersifat parasit pada tumbuhan, hewan, dan manusia. Di habitat tanah, nematoda parasit merupakan hama penting bagi sebagian besar tanaman agronomi di seluruh dunia yang dapat menurunkan produksi. Namun nematoda yang hidup bebas memiliki peran sangat penting dalam ekologi tanah, seperti dalam siklus hara, membantu proses dekomposisi, meningkatkan mineralisasi nitrogen dan hara penting lainnya, menyebarkan mikroba ke seluruh tanah, dan memangsa patogen (Cheng *et al.* 2008, Ferris *et al.* 1998, Ingham *et al.* 1985, Neher 2001 2010). Berdasarkan jenis makanannya, nematoda dikelompokkan ke dalam beberapa grup tropik, yaitu nematoda pemakan akar tumbuhan (*herbivore*), nematoda pemakan bakteri (*bacteriovore*), nematoda pemakan fungi (*fungivore*), nematoda pemakan segala (*omnivore*) dan nematoda predator (Yeates *et al.* 1993).

Nematoda merupakan kelompok fauna tanah yang dominan kedua setelah protozoa baik dalam populasi maupun biomassa. Sekitar 90% nematoda berada pada kedalaman 15 cm dari permukaan tanah. Kelimpahan spesifik nematoda  $< 1,1 \text{ g cm}^{-3}$ , pada partikel tanah  $> 2,0 \text{ g cm}^{-3}$ , dan dalam larutan tanah  $1,1-2,0 \text{ g cm}^{-3}$ .

Perkembangbiakan nematoda dapat terjadi secara seksual dan aseksual. Selama siklus hidupnya nematoda mengalami 4 kali pergantian kulit (molting) dan memiliki 4 tahap juvenil antara telur dengan nematoda dewasa. Pada kondisi lingkungan yang cocok, waktu generasi nematoda tanah (dari telur ke telur) berkisar antara 1 sampai 2 bulan (Anderson 1988). Pengamatan terhadap individu yang aktif dan hidup bebas diperlukan dalam studi ekologi.

### Ekstraksi Nematoda

Ekstraksi nematoda dilakukan untuk memisahkan nematoda dari tanah atau jaringan tanaman sehingga dapat diketahui kelimpahan populasi dan spesiesnya. Ini

<sup>†</sup>Sudah meninggal dunia

dilakukan dengan cara mencuci contoh tanah atau tanaman secara langsung sehingga nematoda terpisah dari tanah atau tanaman, atau memancing nematoda bergerak keluar dari tanah atau 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 dipilih dan disesuaikan dengan jenis nematoda, biologi nematoda, tingkat parasit nematoda, jenis contoh tanah, dan data yang diperlukan (kualitatif ataupun kuantitatif). Metode ekstraksi yang digunakan dapat berupa salah satu, kombinasi, atau modifikasi dari metode yang ada. Efisiensi ekstraksi dipengaruhi antara lain oleh jenis tanah, jenis nematoda, dan peralatan ekstraksi.

Metode ekstraksi nematoda dapat dibagi menjadi 3 (Aescht & Foissner 1995) yaitu:

1. Penghitungan secara langsung.
  - Nematoda dihitung langsung dari larutan contoh tanah.
2. 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. Contohnya adalah metode corong Baermann.
3. 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 metode floatasi-sentrifugasi.

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 dengan efisiensi sekitar 85% (Aescht & Foissner 1995).

Prosedur dinamik dilakukan 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. Cara kerja metoda ini sederhana tetapi memerlukan waktu 2–4 hari dan hanya nematoda aktif (bergerak cepat) yang dapat terekstrak, sementara nematoda yang bergerak lamban atau yang berukuran besar dan bentuk tidak aktif tidak dapat terekstrak.

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. Nematoda yang lolos pada penyaringan pertama akan tertangkap pada penyaringan berikutnya. Pemisahan nematoda dari cairan pengekstrak dapat dipercepat dengan sentrifugasi.

Penghitungan jumlah total nematoda dilakukan segera setelah proses ekstraksi selesai. Ekstrak nematoda dapat disimpan pada suhu 4°C selama 1 minggu sebelum diproses lebih lanjut (identifikasi).

### (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

- Bejana kecil (diameter 2–3 cm)
- Pengaduk kaca
- Autoklaf
- Pipet mikro dan tip
- Kaca objek untuk preparasi
- Mikroskop

#### Bahan

- Larutan stok standar ekstrak tanah
  - Rebus 300 g contoh tanah dalam 1 L akuades selama 10 menit. Saring larutan dan sterilisasi menggunakan autoklaf. Ekstrak tanah sangat mudah dikolonisasi oleh bakteri atau fungi, oleh karena itu sebelum digunakan sebaiknya sterilisasi kembali menggunakan autoklaf.
- Ekstrak tanah standar kerja
  - Encerkan larutan stok ekstrak tanah standar dengan akuades dengan perbandingan 1:4 sampai 1:6 dan sesuaikan pH larutan dengan pH tanah yang akan dianalisis menggunakan larutan HCl atau NaOH. Siapkan sekitar 10 mL standar kerja sesaat sebelum digunakan.

#### Prosedur

- Bersihkan contoh tanah dari batu dan sisa bagian tanaman (akar, batang, daun). Ayak menggunakan saringan berdiameter pori 5 mm.
- Masukkan 0,1 g contoh tanah basah ke dalam bejana (diameter 2–3 cm).
- Tambahkan 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 tanpa

- kaca penutup.
- Amati dan hitung jumlah nematoda yang ada pada larutan tanah menggunakan mikroskop dengan perbesaran 40X.
  - Ulangi langkah 2 sampai 5 sebanyak sepuluh kali sehingga jumlah total tanah yang dianalisis sebanyak 1 g tanah.

## (2) Metode Corong Baermann Termodifikasi (Cesarz et al. 2019)

### Prinsip

Nematoda dipancing keluar dari tanah menuju cairan di dasar corong hingga mengendap di ujung selang. Proses ini dapat dimodifikasi dengan menggunakan gradien suhu (misalnya dengan menggunakan lampu) untuk memaksa nematoda berpindah dengan cepat dari bagian tanah atas yang panas ke bagian bawah yang lebih dingin dan lembab. Metode ini hanya memilih nematoda aktif, sehingga tidak termasuk kista dan bentuk tidak aktif. Jumlah sampel yang dibutuhkan relatif kecil (<100 gram) dan hanya membutuhkan sedikit air ( $\pm 200$  mL per sampel) dengan waktu ekstraksi antara 24 sampai 72 jam. Sebanyak 50–80% dari nematoda aktif dapat terekstrak dalam waktu 24 jam, tergantung pada jenis tanah dan spesies nematoda. Untuk hasil terbaik, gunakan corong atau baki dengan diameter yang tepat sehingga tinggi lapisan sampel tidak lebih dari 2–3 mm (EPPO 2013).

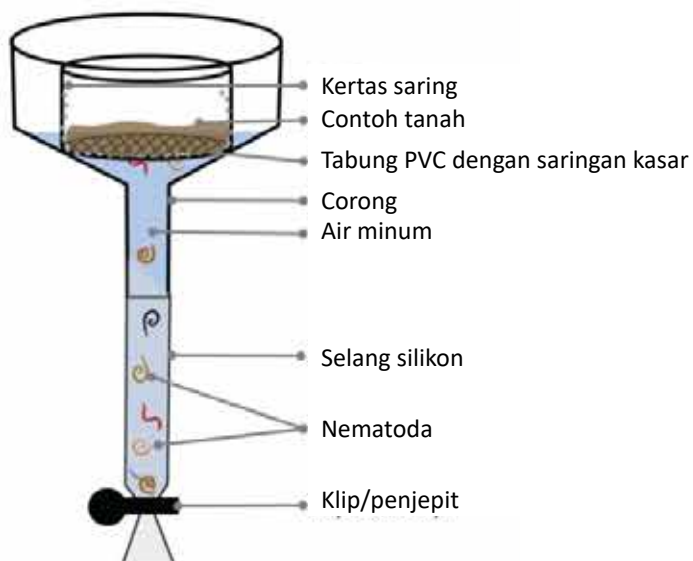
### Alat dan Bahan

- Corong berdiameter 11 cm
- Selang silikon (panjang 12 cm)
- Penjepit (klip)
- Tabung PVC (diameter 7 cm) dengan kasa plastik (saringan berpori 250  $\mu\text{m}$ ) di bagian bawah
- Kertas saring berpori kasar (*milk filter*)
- Lem (untuk merekatkan ujung corong dengan selang silikon)
- Gelas kimia
- Saringan 15  $\mu\text{m}$  (800 mesh)
- Botol koleksi
- Formalin 4%
- Air (gunakan air minum atau air bebas nematoda)

### Prosedur

- Selang silikon dipasang pada ujung corong dan direkatkan dengan lem untuk mencegah kebocoran. Ujung selang silikon dijepit dengan klip.
  - Catatan: Lakukan pengecekan kebocoran sambungan sebelum digunakan.
- Bersihkan contoh tanah dari batu dan bagian tanaman (akar, batang, daun).

- Saring menggunakan saringan dengan diameter pori 5 mm.
- Sebanyak 25 gram tanah diisi ke dalam tabung PVC yang telah dilapisi kertas saring dengan ukuran pori tertentu sehingga memungkinkan nematoda dapat melewatinya. Setelah itu, tabung PVC dengan tanah dimasukkan ke dalam corong (Gambar 2).
  - Sejumlah air ditambahkan dari samping sampai kertas saring pada bagian bawah tabung PVC menyentuh air. Sampel tanah tidak boleh terendam air untuk mencegah keterbatasan oksigen.
    - Catatan: Gunakan air yang bebas dari nematoda, misal air minum
  - Setelah 24 jam, nematoda yang terkumpul di dasar selang dipindahkan ke dalam gelas kimia dengan membuka penjepitnya secara perlahan.
  - Air yang mengandung nematoda disaring dengan saringan 15  $\mu\text{m}$  untuk memisahkan nematoda dari air. Nematoda yang terakumulasi pada saringan dipindahkan ke dalam botol koleksi dengan membilas saringan menggunakan formalin panas (4%) sehingga nematoda yang terekstrak mati.
    - Catatan: jika menghendaki nematoda dalam keadaan hidup, bilas saringan menggunakan air.
  - Ekstrak nematoda dapat disimpan pada suhu 4° sebelum dianalisis lebih lanjut.



Gambar 1. Skema peralatan corong Baermann untuk ekstraksi nematoda dari tanah (Sumber: Cesarz et al. 2019)

### (3) Metode Flotasi-Sentrifugasi (van Bezooijen 2006)

#### Prinsip

Teknik ini memanfaatkan perbedaan berat jenis antara nematoda dan fraksi sampel lainnya. Jika sampel tersuspensi dalam cairan ekstraksi dengan berat jenis yang lebih tinggi dibandingkan dengan nematoda, maka nematoda akan mengapung. Proses pemisahan ini dapat dipercepat dengan sentrifugasi. Dengan metode ini, nematoda yang aktif dan tidak aktif dapat terekstrak. Nematoda tidak aktif dapat berupa stadium tidak aktif dari nematoda simpul akar dan nematoda kista, telur, serta nematoda parasit dan nematoda tetap. Metode ini terdiri atas dua langkah, yaitu:

1. Memisahkan nematoda dari partikel tanah yang besar.

Sampel tanah disuspensikan dalam air untuk memisahkan nematoda dari partikel tanah yang besar. Suspensi nematoda dalam air yang masih mengandung partikel tanah yang kecil, disentrifugasi. Partikel dengan berat jenis lebih tinggi dari 1 (termasuk nematoda) akan mengendap. Supernatan dapat dibuang.

2. Memisahkan nematoda dari sampel tanah yang halus.

Endapan (pelet) disuspensikan dalam cairan ekstraksi (berat jenis = berat jenis nematoda). Setelah sentrifugasi, nematoda mengapung di supernatan, sedangkan sebagian besar partikel lain diendapkan dalam pelet. Supernatan dilewatkan melalui saringan halus untuk memisahkan nematoda dari cairan ekstraksi.

Efisiensi ekstraksi sama antara nematoda yang bergerak aktif dengan nematoda yang bergerak lamban juga nematoda yang tidak aktif. Hasil maksimum diperoleh dengan mengulangi penyaringan filtrat pada langkah 1.

#### Alat dan Bahan

- 1 wadah plastik volume 2 L
- 1 wadah plastik volume 4 L
- Pengaduk kaca
- Botol semprot
- Tabung sentrifus
- Saringan 20, 400, dan 500 mesh (1, 38, dan 25  $\mu\text{m}$ )
- Alat sentrifus
- Larutan gula 40%
- Air

#### Prosedur

- Bersihkan contoh tanah dari batu dan bagian tanaman (akar, batang, daun)
- Masukkan sebanyak 100 g contoh tanah ke dalam wadah plastik 2 L.
- Tambahkan 1 L akuades dan aduk sampai homogen ( $\pm 1$  menit). Diamkan selama 15 detik agar partikel tanah yang besar mengendap.

- Tuangkan supernatan ke dalam wadah plastik 4 L melalui saringan berukuran 20 dan 400 mesh (posisi saringan miring  $\pm 40^\circ$ ).
- Tanah yang tersisa pada wadah plastik 2 L ditambah 1 L akuades lagi dan diaduk sampai homogen. Setelah didiamkan 15 detik, supernatan dituang ke dalam wadah plastik 4 L melalui saringan yang sama.
- Supernatan dalam wadah plastik 4 L disaring kembali dengan saringan 500 mesh.
- Tanah dan nematoda yang tidak lolos saringan 400 dan 500 mesh dibilas dengan akuades dan ditampung dalam tabung sentrifus.
- Pisahkan nematoda dari air dengan cara disentrifus selama 3 menit pada kecepatan 3500 rpm. Supernatan dibuang.
- Pelet yang mengandung nematoda disuspensikan lagi dalam larutan gula 40%, lalu disentrifus lagi selama 2 menit dengan kecepatan 3500 rpm.
- Supernatan yang mengandung nematoda disaring dengan saringan 500 mesh dan dibilas dengan akuades.
- Nematoda yang tertangkap dalam saringan dibilas dengan akuades dan ditampung dalam botol koleksi.
- Ekstrak nematoda dapat disimpan pada suhu 4°C sebelum dianalisis lebih lanjut.

### Ulasan

Larutan pengekstrak dapat berupa larutan sukrosa maupun larutan  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  dengan berat jenis larutan dibuat pada kisaran 1,15 sampai 1,18  $\text{g cm}^{-3}$ . Nematoda dapat menjadi rusak dan sampel menjadi lebih kotor jika larutan pengekstrak dibuat dengan berat jenis yang tidak sesuai. Nematoda juga dapat menjadi rusak jika terlalu lama (>10 menit) berada dalam larutan gula. Oleh karena itulah tahapan setelah penambahan larutan gula harus dilakukan secepat mungkin.

Kecepatan sentrifugasi yang sering digunakan untuk ekstraksi nematoda setara dengan gaya sentrifugal relatif (RCF) 1800. Kisaran kecepatan sentrifugasi yang dapat digunakan adalah 700 – 2900 g dengan waktu 2 – 5 menit (van Bezooijen 2006).

### (4) Metode Blender (Maserasi)-Flotasi-Sentrifugasi (van Bezooijen 2006)

#### 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
- Pisau

- Blender
- Alat Sentrifus dan tabungnya
- Saringan 1200  $\mu\text{m}$  dan 10  $\mu\text{m}$
- Botol koleksi
- Bahan
- Larutan  $\text{MgSO}_4$  (bj 1,18)
- Kaolin

### Prosedur

- Cuci bersih sampel akar dari tanah serta kotoran lain dan potong-potong sepanjang 0,5 sampai 1 cm.
- Sebanyak 10 g potongan akar dimasukkan ke dalam blender dan ditambah 50 mL air, lalu hidupkan blender selama 5 detik.
- Jaringan tanaman yang kasar dipisahkan dari nematoda dan telur dengan menggunakan saringan 1200  $\mu\text{m}$ . Bilas wadah blender sampai bersih. Supernatan ditampung dalam tabung sentrifus. Tambahkan 1% kaolin ke dalam tabung sentrifus untuk membuat pelet lebih padat.
- Sampel disentrifus selama 4 menit pada kecepatan 1800 g. Supernatan disaring dengan saringan 10  $\mu\text{m}$ .
- Tambahkan larutan  $\text{MgSO}_4$  ke dalam tabung sentrifus, aduk sampai seluruh pelet tersuspensi lagi.
- Suspensi disentrifus lagi pada kecepatan 1800 g selama 3 menit. Supernatan disaring dengan saringan 10  $\mu\text{m}$ .
- Nematoda yang tertahan dalam saringan 10  $\mu\text{m}$  dibilas dengan air dan ditampung ke dalam botol koleksi.

### Identifikasi

Identifikasi nematoda dapat dilakukan dengan menggunakan beberapa metode pendekatan mulai dari teknik berbasis morfologi tradisional, biokimia, hingga teknologi tinggi berbasis molekuler. Semua teknik tersebut memiliki kelebihan dan kekurangan tergantung pada asal sampel dan jumlah nematoda yang akan diproses. Kesulitan dalam mengidentifikasi nematoda tidak hanya karena pilihan metode yang paling akurat dan sesuai, tetapi juga karena beberapa parameter yang dapat mempengaruhi kinerja identifikasi seperti ukuran, jumlah dan keragaman serta tidak adanya ciri morfologi yang spesifik (Seesao *et al.* 2017).

Teknik identifikasi berbasis morfologi memiliki kelebihan dalam hal murahnya biaya yang diperlukan, namun teknik ini memerlukan keahlian dan pelatihan khusus untuk dapat melakukannya dengan benar dan tepat. Ciri morfologi dan morfometrik dapat digunakan untuk mengklasifikasikan nematoda sampai tingkat genus bahkan spesies, tetapi identifikasi sampai tingkat spesies tidak dapat dilakukan terhadap telur atau larva nematoda.

## (1) Identifikasi Secara Morfologi

Nematoda diidentifikasi sampai tingkat genus atau spesies dengan cara melihat ciri morfologinya melalui mikroskop pada perbesaran 400 sampai 1000 kali dan mencocokkannya dengan beberapa panduan identifikasi nematoda yang telah ada, antara lain: Tarjan *et al.* (2014), Goodey 1963, dan lain-lain. Ciri morfologi yang diamati antara lain: bentuk kepala/mulut, stilet, letak dan bentuk organ seksual, bentuk ekor, dan esofagus.

Preparat nematoda yang akan diamati ciri morfologinya dapat dibuat dengan menggunakan metode Ryss (2017) yang dimodifikasi. Adapun prosedurnya yaitu:

### Alat:

- Tabung sentrifus 1,5 mL
- *Water bath*
- Kaca arloji
- Pengait nematoda
- Gelas objek dan penutupnya
- Pelubang gabus (*cork borer*)
- Mikroskop stereo
- Bunsen
- Kutex bening

### Bahan:

- Larutan FA 4:1 (formalin 4%, asam asetat 1%)
- Campuran *beeswax-parafin* (1:5)
- Akuades

### Prosedur:

- Siapkan ekstrak nematoda dalam tabung sentrifus 1,5 mL.
- Pekatkan ekstrak nematoda dengan mengurangi jumlah airnya.
  - Caranya: Endapkan nematoda dengan cara sentrifuse pada 3000 rpm selama 30 detik atau diamkan tabung berisi ekstrak nematoda secara vertikal selama minimal 10 menit sehingga nematoda terkumpul di bagian bawah tabung sentrifus. Ambil air bagian atas sedikit demi sedikit secara perlahan dengan menggunakan pipet sehingga volume ekstrak nematoda tersisa 0,15 mL.
- Masukkan sebanyak 1,35 mL larutan FA 4:1 ke dalam tabung sentrifus kosong. Rendam dalam *water bath* ( $\pm 85^{\circ}\text{C}$ ) selama 5 menit.
- Tuang larutan FA 4:1 panas ke dalam tabung sentrifus berisi nematoda dan masukkan ke dalam *water bath* ( $\pm 85^{\circ}\text{C}$ ) selama 1 jam.
- Keluarkan tabung dari *water bath* dan diamkan pada suhu ruang selama  $\pm 48$  jam.

- Cuci nematoda dalam tabung sebanyak 3 kali dengan akuades untuk menghilangkan larutan FA.
  - Caranya: diamkan tabung vertikal selama minimal 10 menit sehingga nematoda terkumpul di bagian bawah tabung sentrifus. Ambil larutan FA pada bagian atas secara perlahan dengan menggunakan mikropipet sebanyak 0,8 mL. Tambahkan akuades 0,8 mL ke dalam tabung, kocok lalu diamkan. Ambil lagi bagian atas larutannya dan gantikan dengan akuades. Ulangi langkah ini sebanyak 3 kali.
- Siapkan gelas objek dan cincin *beeswax-parafin*.
  - Panaskan ujung *cork borer* menggunakan api bunsen lalu masukkan ke dalam wadah berisi *beeswax-parafin* padat dan segera tempelkan ke ujung *cork borer* ke gelas objek sehingga *beeswax-parafin* panas yang menempel berpindah ke gelas objek. Tunggu sampai *beeswax-parafin* mengeras kembali. Lakukan tahapan ini dengan hati-hati sehingga cincin *beeswax-parafin* yang terbentuk memiliki ketebalan yang sama.
- Nematoda dipindahkan pada gelas objek yang telah ada cincin *beeswax-parafin*-nya dengan menggunakan mikropipet.
  - Caranya: Tuang ekstrak nematoda ke dalam kaca arloji, amati menggunakan mikroskop stereo, lalu kumpulkan nematoda sebanyak 10 sampai 30 ekor dengan pengait nematoda, ambil dengan mikropipet (50  $\mu$ L), dan pindahkan ke dalam gelas objek.
- Atur posisi nematoda pada gelas objek menggunakan pengait nematoda sehingga posisinya tidak tumpang tindih (berdekatan). Tutup gelas objek dengan kaca penutup dan panaskan sampai *beeswax-parafin* meleleh.
- Setelah *beeswax-parafin* kembali mengeras, lapi sisi-sisi kaca penutup dengan kutex bening.
- Preparat nematoda siap diamati.

## (2) Identifikasi secara Molekuler

Identifikasi nematoda secara molekuler diawali dengan proses ekstraksi small subunit ribosomal DNA (18S rDNA) nematoda dari sampel nematoda atau dari sampel tanah dan tanaman yang mengandung nematoda. Selanjutnya DNA nematoda diamplifikasi dengan metode PCR (*polymerase chain reaction*). Produk amplifikasi PCR selanjutnya diklon menggunakan kloning kit, dan diekstraksi kembali DNA hasil transformasi, dan dipilih klon unik menggunakan *restriction fragment length polymorphism* (RFLP). Selanjutnya DNA nematode didigest menggunakan enzim restriksi Taq1 untuk memisahkan dengan DNA bakteri pembawa. Klon nematoda murni kemudian disekuon menggunakan sequencer otomatis ABI 370 (Perkin Elmer) dan dianalisis menggunakan program BLAST (*basic local alignment search tool*) untuk

mendapatkan urutan basa DNANYa dalam situs NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Hasil sekuen nukleotida yang diperoleh dianalisis dengan penyejajaran berganda ClustalW pada perangkat lunak Bioedit dan MEGA6 (*Molecular Evolutionary Genetic Analysis*) (Mirsam & Kurniawati 2018, Wait *et al.* 2003).

Primer konsensus nematoda yaitu primer forward, NEMF1 (5'-CGC AAA TTA CCC ACT CTC-3') dan primer reverse, primer S3 (5'-AGT CAA ATT AAG CCG CAG-3') dirancang dengan mengacu pada data base yang tersedia di The Ribosomal Database Project (RDP) (<http://rdp.cme.msu.edu>) dan BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Spesifisitas nematoda ditetapkan dengan menargetkan wilayah variabel V3 dan V5 dari 18S rDNA (Mailwald *et al.* 1994, Wait *et al.* 2003).

### **Ekstraksi DNA nematoda dari sampel tanah (Waite *et al.* 2003)**

#### **Alat:**

- Tabung mikro 1,5 mL
- Tabung ulir 2 mL bertutup silikon yang berisi 0,5 g manik-manik kaca diameter 0,17–0,18 mm.
- Mikro-Disembrator U (Braun, Biotech, International)
- Mesin sentrifugasi
- Spektrofotometer untuk mengukur konsentrasi DNA

#### **Bahan:**

- 120 mM buffer ekstraksi (pH 8,0; 30 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> dan 90 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)
- larutan fenol:kloroform:isoamil alkohol (25:24:1, v/v)
- larutan kloroform:isoamil alkohol (24:1, v/v)
- 3 M natrium asetat
- Isopropanol
- Etanol 70% (v/v)

#### **Prosedur:**

- Masukkan 1 g tanah ke dalam tabung ulir 2 mL bertutup silikon yang berisi 0,5 g manik-manik kaca diameter 0,17–0,18 mm.
- Tambahkan 0,5 mL buffer ekstraksi 120 mM (pH 8,0; 30 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> dan 90 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) dan 0,5 mL larutan fenol:kloroform:isoamil alkohol (25:24:1, v/v)
- Masukkan tabung ke dalam Mikro-Disembrator U (Braun, Biotech, International) selama 2 menit pada 1600 ketukan min-1.
- Sentrifugasi sampel selama 5 menit pada 12000 g dan supernatan dipisahkan dalam tabung bertutup 2 mL yang baru. Langkah tersebut diulang 2 kali dan kumpulkan fase air hasil ekstraksi pertama dan kedua
- Tambah larutan kloroform:isoamil alkohol (24:1, v/v) dengan perbandingan yang sama (v/v), vorteks dan sentrifugasi untuk menghilangkan sisa fenol.
- Pindahkan lapisan atas ke tabung baru dan tambahkan 0,1 volume 3 M

- natrium asetat dan 0,6 volume isopropanol. Biarkan campuran ini pada suhu kamar selama 10 menit
- Sentrifugasi larutan pada 12.000 g selama 10 menit, buang supernatan dan cuci pelet DNA dalam 250  $\mu\text{L}$  etanol 70% (v/v).
  - Sentrifugasi pada 12.000 g selama 5 menit, supernatan dibuang dan sampel dikeringkan di udara pada suhu 37 °C selama  $\pm 10$  menit.
  - Setelah kering, suspensi kembali DNA dalam 30  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  dan simpan pada suhu  $-20$  °C.
  - Sesuaikan semua konsentrasi DNA menjadi 1  $\mu\text{g}$   $\mu\text{L}^{-1}$  sebelum melakukan amplifikasi PCR.

**Ekstraksi DNA nematoda dari ekstrak nematoda (Griffiths et al. 2006, Waite et al. 2003, Zouhar et al. 2000)**

**Alat:**

- Saringan ukuran ( $\mu\text{m}$ ) 250, 150, 75 dan 53
- Corong Baermann.
- Tabung mikro
- Pemanas
- Pendingin
- Vorteks
- Mesin sentrifus
- Spektrofotometer untuk mengukur konsentrasi DNA

**Bahan:**

- Larutan lisis cacing (1% Sodium Dodecyl Sulfate, 50 mM EDTA, 100 mM NaCl, 100  $\mu\text{g}$   $\text{mL}^{-1}$  proteinase K, 1% 2-mercaptoethanol, 100 mM Tris-HCl pH 8,5)
- Larutan kloroform:isoamilalkohol (24:1)
- 3 M natrium asetat
- Isopropanol
- Etanol 70% (v/v)
- $\text{H}_2\text{O}$

**Prosedur:**

- Ekstraksi nematoda dari 200 g sampel tanah segar dengan cara dituang dan disaring melalui saringan 250, 150, 75 dan 53  $\mu\text{m}$  berturut-turut diikuti dengan ekstraksi corong Baermann.
- Diamkan ekstrak nematoda semalam pada suhu 4 °C, lalu buang supernatan sehingga tersisa 10 mL suspensi nematoda.
- Pindahkan sebanyak 2 mL suspensi nematoda ke tabung mikro steril, sentrifugasi pada 3400 g selama 5 menit
- Buang supernatan dan bekukan pelet nematoda pada  $-20$  °C.

- Tambahkan 500  $\mu\text{L}$  larutan lisis cacing ke dalam tabung mikro yang berisi nematoda dan bekukan kembali pada  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  diikuti dengan pencairan dan pemanasan hingga  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  selama 30 menit.
- Setelah dingin, tambahkan 500  $\mu\text{L}$  larutan kloroform:isoamilalkohol (24:1), vorteks selama 10 menit dan sentrifugasi selama 10 menit pada 8000 rpm.
- Pindahkan supernatan ke tabung baru dan tambahkan 0,1 volume 3 M natrium asetat dan 0,6 volume isopropanol.
- Biarkan campuran ini pada suhu kamar selama 10 menit, lalu sentrifugasi pada 12.000 g selama 10 menit.
- Buang supernatan dan cuci pelet DNA dalam 250  $\mu\text{L}$  etanol 70% (v/v).
- Sentrifugasi larutan pada 12.000 g selama 5 menit, buang supernatan dan keringkan sampel pada suhu  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  selama  $\pm 10$  menit.
- Setelah kering, suspensikan kembali DNA dalam 30 mL  $\text{H}_2\text{O}$  dan simpan pada suhu  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- Sesuaikan semua konsentrasi DNA menjadi  $1\text{ }\mu\text{g }\mu\text{L}^{-1}$  sebelum melakukan amplifikasi PCR.

### **Ekstraksi DNA nematoda dari sampel tanaman (Waite *et al.* 2003, Zouhar *et al.* 2000)**

#### **Alat:**

- Mortar dan alu steril
- Tabung mikro 2 mL
- Pemanas
- Pendingin
- Vortex
- Mesin sentrifus
- Spektrofotometer untuk mengukur konsentrasi DNA

#### **Bahan:**

- Nitrogen cair
- Bufer ekstrak (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,7M NaCl; 10 mM EDTA; 1% CTAB; dan 1%  $\beta$ -merkaptotanol)
- Larutan kloroform:isoamilalkohol (24:1)
- 3 M natrium asetat
- Isopropanol.
- Etanol 70% (v/v).
- $\text{H}_2\text{O}$

### Prosedur:

- Hancurkan sampel tanaman dalam nitrogen cair menggunakan mortar dan alu steril.
- Masukkan 0,5 g sampel yang sudah menjadi bubuk ke dalam tabung mikro 2 mL.
- Tambahkan 500  $\mu$ L bufer ekstrak (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,7M NaCl; 10 mM EDTA; 1% CTAB; dan 1%  $\beta$ -merkaptoetanol) dan aduk sampai homogen.
- Panaskan tabung pada suhu 60° C selama 2 jam.
- Setelah dingin, tambahkan 500  $\mu$ L larutan kloroform:isoamilalkohol (24:1), vorteks selama 10 menit dan disentrifus selama 10 menit pada 8000 rpm.
- Pindahkan supernatan ke tabung baru dan tambahkan 0,1 volume 3 M natrium asetat dan 0,6 volume isopropanol.
- Biarkan campuran ini pada suhu kamar selama 10 menit, lalu disentrifus pada 12.000 g selama 10 menit.
- Buang supernatan dan cuci pelet DNA dalam 250  $\mu$ L etanol 70% (v/v).
- Sentrifugasi larutan pada 12.000 g selama 5 menit dan buang supernatan
- Keringkan sampel pada suhu 37° C selama  $\pm$ 10 menit.
- Suspensikan kembali DNA dalam 30  $\mu$ L H<sub>2</sub>O dan simpan pada suhu -20° C.
- Sebelum amplifikasi PCR, sesuaikan semua konsentrasi DNA menjadi 1  $\mu$ g  $\mu$ L<sup>-1</sup>.

### Amplifikasi DNA (Waite et al. 2003)

Ekstrak DNA nematoda diamplifikasi dengan metode PCR dalam volume 30  $\mu$ L, dengan prosedur sebagai berikut:

#### Alat:

- Mesin PCR
- Mesin elektroforesis

#### Bahan:

- Primer forward, NEMF1 (5'-CGC AAA TTA CCC ACT CTC-3')
- Primer reverse, S3 (5'-AGT CAA ATT AAG CCG CAG-3')

### Prosedur:

- Masukkan dalam tabung mikro 9 pM masing-masing primer (NEMF1 dan S3), 7,5 mM setiap dNTP, 45 mM MgCl<sub>2</sub> dan 0,5 unit Taq Polymerase.
- Atur kondisi reaksi PCR sebagai berikut: denaturasi 94 °C selama 1 menit, annealing 53 °C selama 1 menit; ekstensi atau perpanjangan 72 °C selama 2 menit, dan kondisi tersebut dilakukan selama 30 siklus menggunakan thermocycler (Hybaid).
- Selain DNA target, sertakan sampel kontrol 'negatif' (tanpa DNA) dalam setiap proses amplifikasi PCR.

- Elektroforesis produk PCR untuk mengetahui ukuran dan spesifisitasnya pada 1,2% (b/v) agarosa gel dan warnai dengan 3,8-diamino-5-etil-6-fenilfenanthridium bromida (etidium bromida).
- Klon 18S rDNA yang sudah diamplifikasi menggunakan kit kloning Invitrogen TOPO TA (San Diego, CA).
- Pilih koloni putih (sisipan yang mengandung *E. coli*), lalu pindahkan ke tabung mikro yang berisi 3 mL media LB yang mengandung ampisilin ( $100 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ ), dan diinkubasi pada suhu  $37^\circ\text{C}$  selama 16 jam.
- Panen sel *E. coli* yang sudah ditransformasi dengan cara sentrifugasi
- Ekstraksi DNA dari 3 mL kultur menggunakan Qiagen QIA prep 8 Miniprep Kit (Boundary Court, Gatwick Road, Crawley, UK).
- Gunakan *restriction fragment length polymorphism* (RFLP) untuk memilih klon unik untuk analisis sekuen.
- Digest (potong)  $1 \mu\text{g}$  DNA yang sudah diekstraksi dengan enzim restriksi Taq1 dan inkubasi pada  $65^\circ\text{C}$  selama 3 jam (Kramel Biotech, Northumberland, UK).
- Elektroforesis hasil digest pada gel agarosa 2,0% (b/v) dan warnai dengan etidium bromida.
- Visualisasi gel menggunakan *BioRad Fluor Multimager* pada A260 (*Laboratorium BioRad, Hemel Hempstead, UK*).
- Identifikasi klon baru sesuai dengan pola pita dan kemudian sekuen menggunakan sequencer otomatis ABI 370 (*Perkin Elmer*).

### Perhitungan

Penghitungan jumlah nematoda dapat dilakukan di bawah mikroskop stereoskopik pada pembesaran 20 – 100 kali.

#### Kelimpahan atau jumlah populasi

Jumlah populasi dihitung per gram berat kering (bk) tanah atau per luasan tanah ( $\text{m}^2$ ). Sehingga kadar air dan kepadatan tanah (*bulk density*) harus ditetapkan terlebih dahulu.

$$I (\text{g}^{-1} \text{bk}) = \frac{I_{\text{bb}} \times 100}{\text{bb} \times \% \text{bk}}$$

$$I (\text{m}^{-2}) = \frac{I_{\text{bb}} \times B \times D \times 10^4 \times 100}{\text{bb} \times \% \text{bk}}$$

**Keterangan:**

- $I_{bb}$  = jumlah populasi dalam contoh tanah lembap  
 $bb$  = berat tanah lembap (g)  
 $I$  = Kelimpahan (jumlah) populasi  
 $B$  = Bulk densiti ( $g\ cm^{-3}$ )  
 $D$  = Kedalaman lapisan tanah dari contoh tanah yang dianalisis (cm)  
 $10^4$  = Faktor konversi bulk densiti ke  $1\ m^2$  ( $1\ m^2 = 104\ cm^2$ )  
 $100$  = Faktor untuk berat kering tanah  
 $\%bk$  = berat kering tanah (%)

**Biomassa**

Bobot dari satu individu nematoda dihitung dengan cara mengukur minimal 10 individu per spesies (Schinner *et al.* 1995).

$$M = \frac{W^2 \times I}{16 \times 10^5}$$

**Keterangan:**

- $w$  = Lebar maksimum nematoda ( $\mu m$ )  
 $l$  = Panjang nematoda ( $\mu m$ )  
 $16 \cdot 10^5$  = Faktor massa  
 $M$  = Massa ( $\mu g$ )

**Daftar Pustaka**

- Aescht E, Foissner W. 1995. Microfauna. p. 316-337. In Schinner F, Kandeler E, Öhlonger R, Margesin R (Eds.) *Methods in Soil Biology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Germany.
- Anderson JM. 1988. Spatiotemporal effects of invertebrates on soil processes. *Biol. Fertil. Soils*. 6: 216-227.
- Cesarz S, Schulz AE, Beugnon R, Eisenhauer N. 2019. Testing soil nematode extraction efficiency using different variations of the Baermann-funnel method. *Soil Org.* 91(2):61-72. Doi:10.25674/so91201.
- Cheng Z, Grewal PS, Stinner BR, Hurto KA, Hamza HB. 2008. Effects of long-term turfgrass management practices on soil nematode community and nutrient pools. *Appl Soil Ecol.* 38:174-184. doi:10.1016/j.apsoil.2007.10.007.
- Ferris H, Venette RC, van der Meulen HR, Lau SS. 1998. Nitrogen mineralization by bacterial-feeding nematodes: verification and measurement. *Plant Soil.* 203:159-171.

- [EPPO] European and Mediterranean Plant Protection Organization. 2013. Nematode extraction. Bulletin EPPO. 43(3):471–495. Doi:10.1111/epp.12077
- Freckman DW, Baldwin JG. 1990. Nematoda. p. 155–200. *In* Dindal DL (Ed.) Soil Biology Guide. A John Wiley & Sons. New York.
- Goodey JB. 1963. Soil and Fresh Water Nematodes. Butler and Tunner, London. 544 p.
- Griffiths BS, Donn S, Neilson R, Daniell TJ. 2006. Molecular sequencing and morphological analysis of a nematode community. Applied Soil Ecology. 32:325–337. Doi:10.1016/j.apsoil.2005.07.006
- Ingham RE, Trofymow JA, Ingham ER, Coleman DC. 1985. Interactions of bacteria, fungi, and their nematode grazers: effects on nutrient cycling and plant growth. Ecol Monogr. 55(1):119–140.
- Jenkins WR, Taylor DD. 1967. Plant Nematology. Reinhold Publishing Co., New York, Amsterdam, London: 270 pp.
- Lüftenegger G, Petz W, Foissner W, Adam H. 1988. The efficiency of a direct counting method in estimating the numbers of microscopic soil organisms. Pedobiologia 31:95–101.
- Mailwald M, Kappe R, Sonntag HG. 1994. Rapid presumptive identification of medically relevant yeasts to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. Journal of Medical and Veterinary Mycology. 32:115–122.
- Mirsam H, Kurniawati F. 2018. Laporan pertama di Sulawesi Selatan: Karakter morfologi dan molekuler nematoda puru akar yang berasosiasi dengan akar padi di Kabupaten Wajo, Sulawesi Selatan. Jurnal Perlindungan Tanaman Indonesia. 22(1):58–65. Doi: 10.22146/jpti.33108.
- Neher DA. 2001. Role of nematodes in soil health and their use as indicators. Journal of Nematology. 33(4):161–168.
- Neher DA. 2010. Ecology of plant and free-living nematodes in natural and agricultural soils. Annu. Rev. Phytopathol. 48:371–394. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-073009-114439>.
- Ryss AY. 2017. A Simple express technique to process nematodes for collection slide mounts. Journal of Nematology. 49(1):27–32.
- Schinner F, Kandeler E, Öhlinger R, Margesin R. 1995. Methods in Soil Biology. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Germany.
- Seesao Y, Gay M, Merlin S, Viscogliosi E, Aliouat-Denis CM, Audebert C. 2017. A review of methods for nematode identification. Journal of Microbiological Methods. 138:37–49. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2016.05.030>
- Tarjan A, Esser R, Chang S. 2014. Interactive Diagnostic Key to Plant Parasitic, Freelifing, and Predaceous Nematodes. University of Nebraska Lincoln Nematology Laboratory. <http://nematode.unl.edu/key/nemakey.htm>.
- van Bezooijen J. 2006. Methods and Techniques for Nematology. Nederlands: Wageningen University. 112 pp.
- van Guhdy SD. 1982. Nematodes. p. 1121–1131. *In* Miller RH, Keeney DR (Eds.) Methods of Soil Analysis. 2nd ed. Americans Soc. Agronomy, Inc. Soil. Sci. Soc. America, Inc. Publ. Madison, Wisconsin, USA.

- Waite IS, O'Donnell AG, Harrison A, Davies JT, Colvan SR, Ekschmitt K, Dogan H, Wolters V, Bongers T, Bongers M, Bakonyi G, Nagy P, Papatheodorou EM, Stamou GP, Boström S. 2003. Design and evaluation of nematode 18S rDNA primers for PCR and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of soil community DNA. *Soil Biology and Biochemistry*. 35:1165–1173. Doi:10.1016/S0038-0717(03)00177-9
- Yeates GW, Bongers T, de Goede RG, Freckman DW, Georgieva SS. 1993. Feeding habits in soil nematode families and genera – An outline for soil ecologists. *J Nematol*. 25(3):315–331.
- Zouhar M, Rysanek P, Kocova M. 2000. Detection and differentiation of the potato cyst nematodes *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida* by PCR. *Plant Protection Science*. 36(3):81–84.

## 5.5

# ANALISIS KELIMPAHAN ARTHROPODA: COLLEMBOLA DAN ACARINA

*Prastowo Kabar, Ea Kosman Anwar<sup>†</sup>, Edi Santosa, Ety Pratiwi*

Arthropoda tanah adalah kelompok fauna tanah yang mempunyai kaki berbuku-buku, terdiri atas lima kelompok utama, yaitu Isopoda, Myriapoda, Insecta, Acarina, dan Collembola. Dua kelompok yang terakhir, yakni Acarina dan Collembola merupakan kelompok yang paling banyak dan beragam (Culliney 2013). Kelompok fauna ini mempunyai penyebaran luas dan ditemukan di seluruh lokasi yang ditumbuhi tanaman (Hopkin 1998), dapat hidup di daratan yang bertemperatur dari – 60° sampai > 40° 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  $\leq 1$  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 (<https://www.britannica.com/animal/acarid>).

<sup>†</sup>*Sudah meninggal dunia*

Dalam ekologi hewan tanah, baik Collembola maupun Acarina merupakan salah satu komponen dari faktor pembentuk ekosistem tanah sehingga kelimpahan populasinya ikut berperan dalam siklus makanan dan aliran energi di dalam tanah.

### 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 rinci pada bab sebelumnya) didasarkan atas sifat Collembola dan Acarina yang tidak suka cahaya (fototaksis negatif). Alat ini terdiri atas corong yang bertindak sebagai tutup dan sekaligus sebagaiudukan 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.

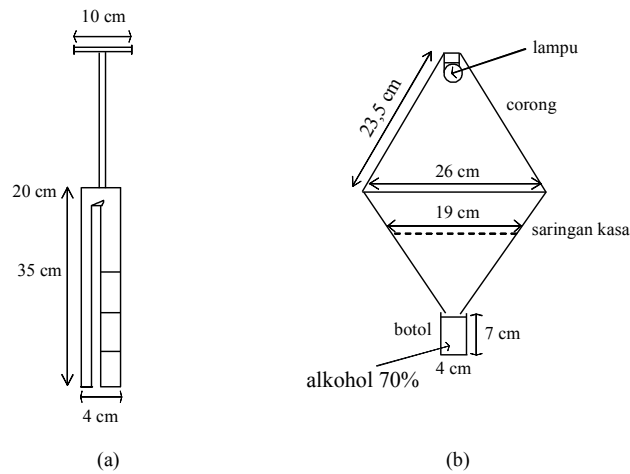
### Analisis Kelimpahan Collembola dan Acarina

#### 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

#### Bahan

- Larutan  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 
  - Larutkan 50 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  dalam 800 ml akuades
- Alkohol 70% (larutan pengawet)



Gambar 1. Bor tanah (a) dan corong Berlese-Tullgren (b) (Adianto 1983)

## Prosedur

### 1. Pengambilan contoh tanah

- Ambil contoh tanah (seperti diuraikan pada bab sebelumnya) dengan bor tanah yang bertanda (0-5 , 5-10, 10-15 dan 15-20 cm) (Gambar 1). Volume contoh tanah  $50 \text{ cm}^3$ .
- 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.

### 2. 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%).
3. 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).
4. Penghitungan
- Hitung masing-masing jenis/spesies Colembola, 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

$$K \text{ jenis } A = \frac{\text{Jumlah individu jenis } A}{\text{Jumlah unit contoh atau luas atau volume tanah}}$$

$$KR \text{ jenis } A = \frac{K \text{ jenis } A}{\text{Jumlah } K \text{ semua jenis}} \times 100\%$$

Keterangan:

$K$  = Kepadatan populasi

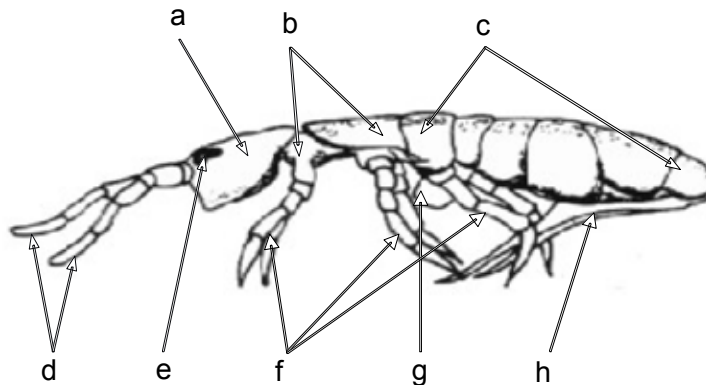
$KR$  = Kepadatan relatif

persatuan volume, atau per satuan penangkapan. Perhitungan kepadatan populasi dan kepadatan relatif Collembola dan Acarina mengacu kepada Suin (2003) sebagai berikut.

## 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.



**Gambar 2.** Struktur tubuh Collembola, a). kepala (caput), b). dada (thorax) terdiri dari 3 ruas (segmen), c). badan (abdomen) terdiri dari  $\geq 6$  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 (Sumber: <https://projects.ncsu.edu/cals/course/ent425/library/compendium/collembola.html>)



Gambar 3. Struktur tubuh Acarina, a) cephalothorax (kepala dan dada bersatu), b) badan (abdomen) c). kaki (1-4 pasang) (Sumber: Dhooria 2016)

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 dan Taylor (1974).

### **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

Contoh spesies Collembola yang ada di Indonesia :

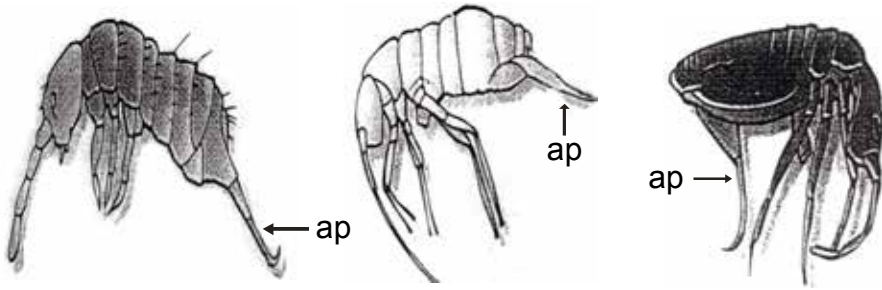
Isotomidae : Folsomia octoculata HANSCHIN

Entomobryidae : Entomobrya proxima FALSOM

Pseudochorutidae : Pseudochorutes javanicus HANDSCHIN

Tomoceridae : Tomocerus montanus

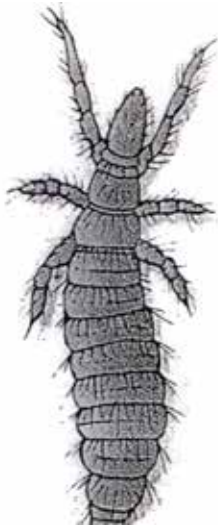
- Punya 1 – 4 pasang kaki, tubuh pendek dan tidak bersegmen yang jelas, dan tidak bersayap .. ..... Ordo Acarina



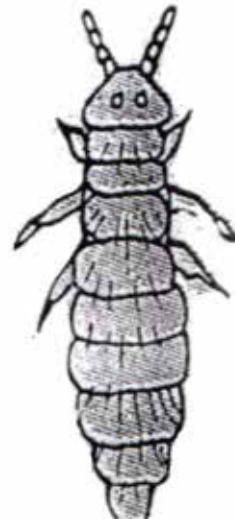
Tomoceridae

Entomobryidae

Poduridae

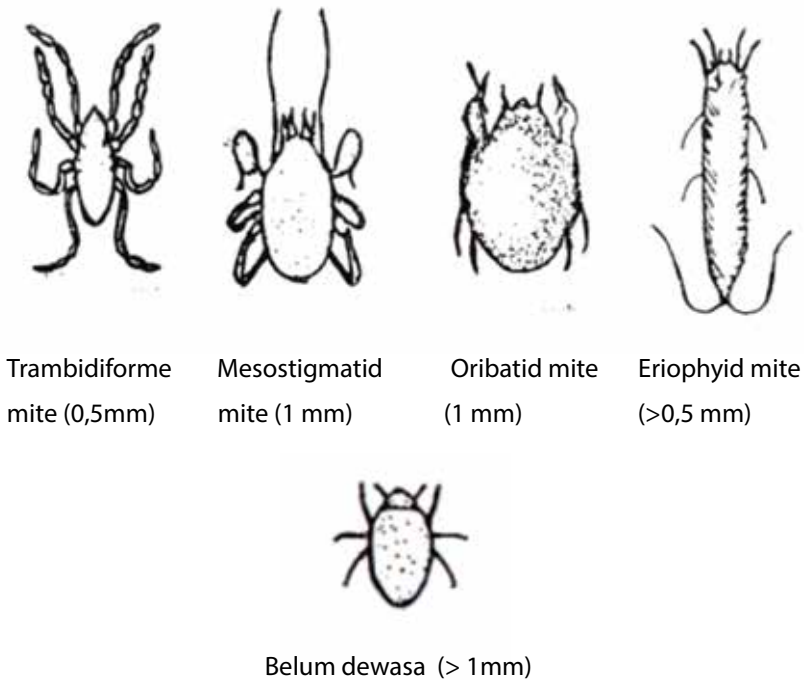


Pseudochorutidae



Isotomidae

Gambar 4. Contoh sebagian anggota Collembola yang mempunyai alat pegas (ap) globular (Gambar bawah) (Sumber: Lewis & Taylor 1974)



Gambar 5. Contoh sebagian anggota Acarina (Sumber: Lewis & Taylor 1974)

### Daftar Pustaka

- Adianto. 1983. Biologi Pertanian. Penerbit Alumni Bandung.
- Culliney, Thomas W. 2013. "Role of Arthropods in Maintaining Soil Fertility" Agriculture 3, no. 4: 629-659. <https://doi.org/10.3390/agriculture3040629>
- Dhooira M.S. 2016. Important Acarine families. p. 73-159. *In Dhooira MS (Ed.), Fundamentals of applied acarology.* Singapore, Springer.
- Hopkin SP. 1998 Collembola: the most abundant insects on earth. *Antenna* 22(3):117-121.
- 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.
- Lewis T, Taylor LR. 1974. *Introduction to Experimental Ecology.* Acad. Press. New York.
- Pfadt RE. 1971. *Fundamentals of Applied Entomology.* Maxmillan Company, New York.
- Southwood TRE. 1966. *Ecological Methods.* Chapman and Hall, London.
- Suin NM. 2003. *Ekologi Hewan Tanah.* Penerbit Bumi Aksara dan Pusat Antar Universitas Ilmu Hayati. ITB.
- Wallwork JA. 1970. *Ecology of Soil Animals.* McGraw Hill Publishing Company Limited. London.
- Yosii R. 1966. Check List of Collembolan Species Reported from Indonesia. *Treubia*. 27: 45 – 52.



ISBN 978-602-8039-50-5

