

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian eksplorasi keberadaan mikroba pelarut fosfat dilaksanakan di ekowisata Mangrove kelurahan Wonorejo, kecamatan Rungkut, kota Surabaya sebagai tempat pengambilan sampel tanah dan Laboratorium Mikrobiologi Departemen Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga Surabaya sebagai tempat analisis mikroba pelarut fosfat. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Agustus 2010 sampai dengan April 2011.

3.2 Bahan dan Alat Penelitian

3.2.1 Bahan penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Sampel penelitian.

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanah mangrove di kawasan Mangrove Wonorejo, Surabaya

Media dan bahan kimia.

a. Media dasar pertumbuhan bakteri

Media spesifik *Pikovskaya* yang terdiri dari glukosa 10 g/L, KCl 0,2 g/L, MgSO₄ 0,1 g/L, MnSO₄ 0,1 g/L, FeSO₄ 0,1 g/L, Ca₃(PO₄)₂ 5 g/L, (NH₄)₂SO₄ 0,5 g/L, Agar 15 g/L.

b. Bahan pewarnaan Gram

Larutan ammonium oksalat kristal violet, larutan yodium lugol, larutan aseton alkohol, larutan safranin.

c. Bahan identifikasi

Senyawa uji *Lysine*, *Ornithine*, *H₂S*, *Glucose*, *Mannitol*, *Xylose*, *O-nitrophenyl-β-D-galacto-pyranoside* (ONPG), *Indole*, *Urease*, *Voges-Proskauer*, *Citrate*, *Tryptophan deaminase* (TDA), *Gelatin*, *Malonate*, *Inositol*, *Sorbitol*, *Rhamnose*, *Sucrose*, *Lactose*, *Arabinose*, *Adonitol*, *Rafinose*, *Salicin*, *Arginine*, reagen indol, reagen KOH, reagen Alfa-Naftol, Media 3%, *Nutrient Agar* (NA), *Nutrient broth* (NB), Kertas uji oksidatif.

d. Bahan kimia

Aquades, spirtus dan alkohol 70%.

3.2.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *autoclave* (Ogawa Seiki), neraca analitik (*Shimadzu AEL-200*), *Laminar Air Flow* (LAF), kompor listrik, labu *Erlenmeyer*, mikroskop cahaya, botol kultur, spatula, tabung reaksi, cawan petri, pipet volume, pipet mikro, gelas *Beaker*, gelas obyek (*object glass*), gelas penutup (*cover glass*), pembakar bunsen, jarum ose, rak tabung reaksi, gelas ukur, oven, kapas, *incubator*, lemari es, kertas label dan *aluminium foil*, *soil tester*, *silinder crof*, *pH indicator Mac Nagel*, *salinometer*.

3.3 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian terdiri atas empat tahapan, yaitu sebagai berikut:

3.3.1 Preparasi media dan alat

Pada tahapan ini menyiapkan alat untuk mengambil sampel dan media, ada beberapa media yang digunakan, diantaranya:

a. Media *Pikovskaya*

Menimbang semua bahan yang digunakan untuk membuat media spesifik *Pikovskaya* dengan menggunakan timbangan analitik dan dilarutkan dengan aquades steril hingga larut, kemudian memanaskan larutan media tersebut di penangas air hingga terlarut.

b. Media NA

Menimbang 2,8 g NA dengan menggunakan timbangan analitik dan dilarutkan dengan menggunakan aquades steril sebanyak 100 mL kemudian memanaskan larutan media tersebut di penangas air hingga terlarut.

c. Aquades Steril

Membuat 225 mL aquades steril dalam botol 500 mL sebanyak 4 buah, lalu membuat 90 mL aquades steril dalam botol 200 mL sebanyak 4 buah.

3.3.2 Pengambilan Sampel Tanah

Penentuan titik sampling dilakukan secara subyektif dan didasarkan pada jenis tanaman mangrove yang dominan dan pada setiap tanah dilakukan pengambilan di daerah rhizosfer tanah dengan cara sebagai berikut :

1. Mengambil ± 250 g sampel tanah dengan menggunakan *cylinder crof* pada kedalaman ± 20 cm dari permukaan tanah

2. Memasukkan sampel tanah pada plastik dan memberi label pada bungkus plastik

Bersamaan dengan sampling pengambilan tanah dari rhizosfer tanaman mangrove, dilakukan pula pengukuran faktor fisik dan kimia disetiap titik pengambilan sampel meliputi :

- pH

- Salinitas menggunakan *salinometer*

- Kelembapan tanah dengan menggunakan *soil tester*.

4. melakukan kegiatan yang sama pada jenis mangrove yang berbeda

3.3.3 Tahap Isolasi Bakteri Pelarut Fosfat

Terdapat 4 sampel tanah mangrove yang akan diuji, untuk setiap sampel dilakukan perlakuan sebagai berikut:

1. Menimbang 25 g sampel tanah mangrove dengan menggunakan timbangan analitik dan mensuspensikan sampel tanah mangrove dengan aquades steril sebanyak 225 mL didalam labu erlenmeyer (Pengenceran 10^{-1}).

2. Menghomogenkan suspensi pupuk organik dengan *shaker* selama ± 30 menit agar bakteri yang terdapat dalam tanah mangrove terlarut dalam aquades steril.

3. Melakukan seri pengenceran yaitu pengenceran 10^{-2} dengan cara mengambil 10 mL dari pengenceran 10^{-1} , memasukkan pada botol yang berisi 90 mL aquades steril dan menghomogenkan (pengenceran 10^{-2}).
4. Menumbuhkan pada media selektif dengan cara mengambil masing-masing 1 mL suspensi tanah mangrove setiap sampel lalu menuangkannya kedalam cawan petri, kemudian menambahkan media *Pikovskaya* dan menghomogenkan.
5. Memberi label dan menginkubasi pada suhu 37°C selama 2-3 hari. Keberadaan bakteri pelarut fosfat positif apabila terdapat zona jernih atau zona halo pada media *Pikovskaya* tersebut.

Dalam pemeriksaan isolat ini meliputi beberapa hal :

- a) Setelah diinkubasi selama 3-5 hari pada cawan petri yang berisi media *Pikovskaya* kemudian melakukan pengamatan pada koloni yang tumbuh pada cawan petri, keberadaan bakteri pelarut fosfat dikatatakan positif apabila terdapat zona jernih pada media *Pikovskaya*. Kemudian koloni tersebut dimurnikan dengan cara mengambil satu ose pada koloni yang memiliki zona jernih dan di tanam pada media miring NA dengan metode *streak* untuk mendapatkan biakan murni.
- b) Setelah isolat bakteri dimurnikan dan ditumbuhkan ke dalam media miring NA dan diinkubasikan pada suhu 34°C sebagai stok bakteri. Kemudian melakukan pengamatan koloni yang tumbuh pada media miring NA dilakukan mulai hari ke-2 setelah penanaman.

- c) Setelah mendapatkan isolat murni kemudian melakukan tahap identifikasi melalui uji morfologis dan uji fisiologis.

3.3.4 Tahap identifikasi

1. Uji morfologi

Uji morfologi meliputi pengamatan secara makroskopis pada koloni yang meliputi: bentuk, warna, tepi dan elevasi serta pengamatan secara mikroskopis yang didapatkan dari hasil pengecatan Gram untuk mengetahui bentuk bakteri dan jenis Gram bakteri. Untuk pengecatan Gram, prosedur yang dilakukan adalah sebagai berikut:

1. Menyiapkan alat dan bahan untuk pewarnaan Gram bakteri.
2. Mengambil 1 ose pada setiap biakan yang telah dimurnikan pada media miring NA.
3. Membuat sediaan bakteri pada *object glass* dengan cara mengoreskan ose pada *object glass* dan diberi satu tetes aquades kemudian dibiarkan kering.
4. Melakukan fiksasi sediaan dengan cara melewatkan di atas nyala api bunsen beberapa kali.
5. Meneteskan larutan A (larutan ammonium oksalat kristal violet) pada sediaan dan dibiarkan 1 sampai 2 menit.
6. Larutan Gram A dibersihkan dengan cara mengalirkan aquades diatas sediaan, lalu meneteskan dengan Gram B (larutan yodium lugol) dan dibiarkan 1 sampai 2 menit.

7. Larutan Gram B dibersihkan dengan cara mengalirkan akuades diatas sediaan, lalu meneteskan dengan Gram C (larutan aseton alkohol) selama 30 detik lalu dibersihkan dengan cara mengalirkan akuades diatas sediaan.
8. Meneteskan Gram D (larutan safranin) pada sediaan dan dibiarkan selama 1 sampai 2 menit.
9. Mencuci sediaan dengan air mengalir dan dibiarkan kering.
10. Mengamati karakteristik mikroskopis sedian dibawah mikroskop cahaya.

Sel yang telah melalui pengecatan Gram jika bersifat Gram positif sel akan berwarna biru gelap atau ungu dan apabila bersifat Gram negatif sel akan berwarna merah muda.

2. Uji fisiologis

Untuk uji fisiologis menggunakan 24 senyawa uji yaitu: *Lysine, Ornithine, H₂S, Glucose, Mannitol, Xylose, O-nitrophenyl-β-D-galacto-pyranoside (ONPG), Indole, Urease, Voges-Proskauer, Citrate, Tryptophan deaminase (TDA), Gelatin, Malonate, Inositol, Sorbitol, Rhamnose, Sucrose, Lactose, Arabinose, Adonitol, Rafinose, Salicin, Arginine*. Untuk cara pembuatan dan cara kerja dapat dilihat pada Lampiran. 1