



1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar UIN Suska Riau.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin UIN Suska Riau.

III. MATERI DAN METODE

3.1. Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei-September 2017. Sampel tanah diambil dari perkebunan jati di Kecamatan Rumbai, Pekanbaru. Tahapan isolasi bakteri dilakukan di Laboratorium Patologi, Entomologi dan Mikrobiologi (PEM) Universitas Islam Negeri Sultan Syarif Kasim Riau, sedangkan tahapan identifikasi dilakukan di Laboratorium Kesehatan dan Lingkungan Dinas Kesehatan Provinsi Riau.

3.2. Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari sampel tanah, NaCl fisiologis 80%, bahan pewarnaan gram bakteri, media *Nutrient Agar* (NA), media selektif *Pikovskaya*, media *Sabaraud agar*, media *Blood agar*, media *MacConkey agar*, median SIM, media TSIA, media *Simmonts Citrate Agar*, gula-gula (glukosa, laktosa, manitol, maltose, sacarosa), larutan *opac* alkohol 70%, kapas, *aluminium foil*, dengan bahan penunjang yaitu spritus + bunsen, dan aquades. Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah terdiri dari tabung erlenmayer, cawan petri, tabung reaksi, *autoclave*, timbangan analitik, LAFC (*Laminar Air Flow Cabinet*), oven, *centrifuge*, pH meter, pipetor, jarum ose, pinset, suntik steril, batang kaca penyebar, *vortex*, *hot plate*, inkubator, kaca objek, *shaker*, karet gelang, sedotan, sendok bahan, bor tanah, *camera digital*, kantong plastik dan alat tulis.

3.3. Metode Penelitian

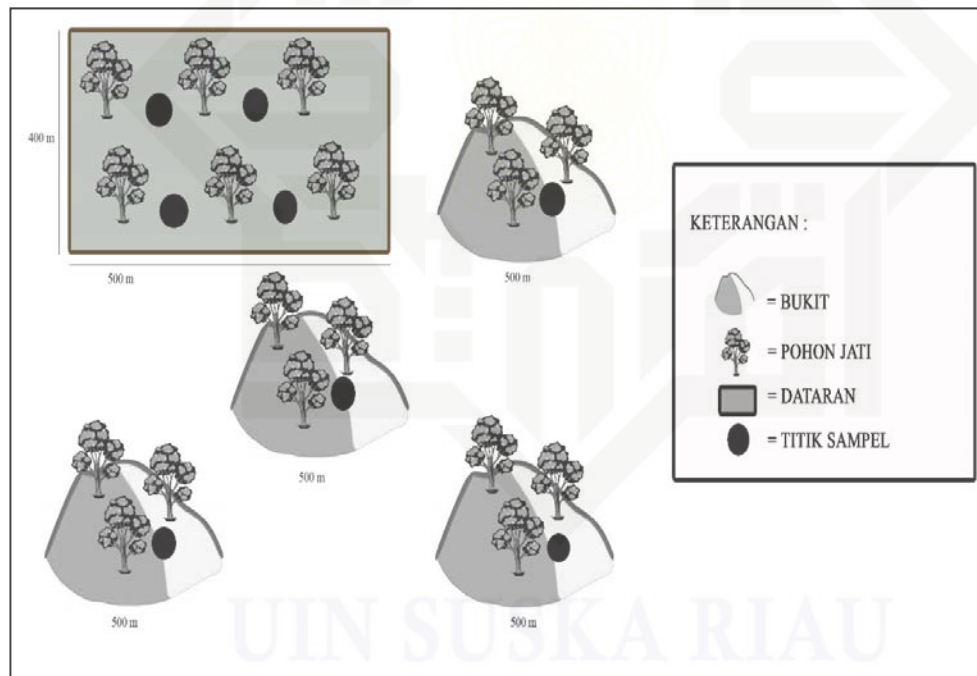
Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif secara kuantitatif dan kualitatif, dimana pengambilan data di lapangan dilakukan secara observasi, yaitu dengan mengambil sampel tanah pada areal pengambilan sampel tanah, kemudian mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri pelarut fosfat yang didapat secara makroskopis dan mikroskopis yang dianalisis di laboratorium untuk mendapatkan data kuantitatif. Parameter yang diamati pada penelitian ini yaitu penghitungan jumlah populasi, pengukuran zona bening, dan identifikasi bakteri.

3.4. Prosedur Penelitian

3.4.1. Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel tanah dilakukan secara *purposive sampling* (Husen, 2007). Penentuan titik sampel dilakukan berdasarkan hamparan areal perkebunan jati, dan kemudian dipisahkan berdasarkan kedalaman. Setiap titik diambil menggunakan bor tanah pada kedalaman 0 - 10 cm, 11 - 20 cm, 21 - 30 cm.

Lokasi pengambilan sampel dibersihkan dari serasah, kemudian bor tanah dibersihkan dengan air dan disemprot dengan alkohol 70%. Selanjutnya pengambilan sampel tanah dilakukan menggunakan bor dengan ditekan kedalam tanah, lalu tanah yang berada didalam bor diambil menggunakan spatula dan dipisahkan sesuai kedalaman. Sampel tanah yang diambil dimasukkan kedalam plastik sampel, lakukan hal yang sama saat pengambilan titik sampel selanjutnya. Sampel yang telah ditutup rapat diberi label dan kemudian dibawa ke laboratorium.



Gambar 3.1. Titik Pengambilan Sampel Tanah Pada Perkebunan Jati

3.4.2. Pengukuran pH Sampel

Pengukuran pH dilakukan dengan rasio 1:5 sampel tanah ditimbang seberat 10 g kemudian dimasukkan ke dalam botol pengocok yang berisi aquades 50 ml.

Setelah itu sampel tanah *dishaker* selama 60 menit dengan kecepatan 100 rpm, kemudian diukur pH menggunakan pH meter.

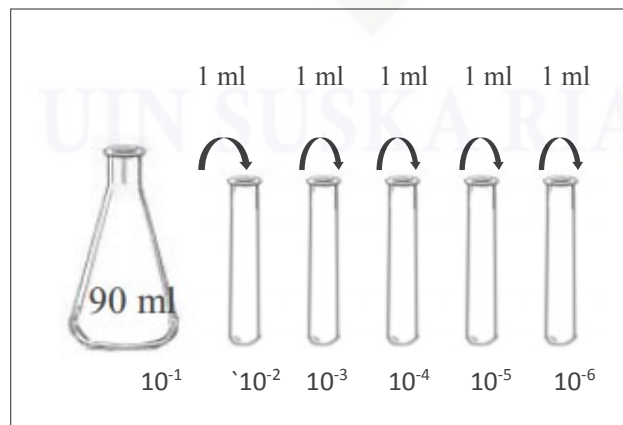
3.4.3. Pembuatan Media Pertumbuhan

Media pertumbuhan yang digunakan pada penelitian ini adalah media *Pikovskaya* Agar. Media *Pikovskaya* merupakan media selektif yang digunakan untuk pertumbuhan mikroorganisme pelarut fosfat. Adapun takaran pembuatan media *Pikovskaya* adalah 31,33 gr/L. Berdasarkan Santosa (2007), berikut cara pembuatan media *Pikovskaya* yang dilarutkan pada volume 1 L:

1. Sterilisasi bahan media tersebut dengan autoklaf pada tekanan 0,1 MPa dan suhu 121°C selama 20 menit. Keluarkan media yang telah disterilkan dan dinginkan (didiamkan) sampai suhu mencapai 45–50°C (hangat-hangat kuku).
2. Tuang secara aseptik sebagian media ke dalam cawan petri steril, goyang/geser supaya permukaan media merata, dan diamkan sampai padat atau beku.

3.4.4. Pengenceran Sampel Tanah

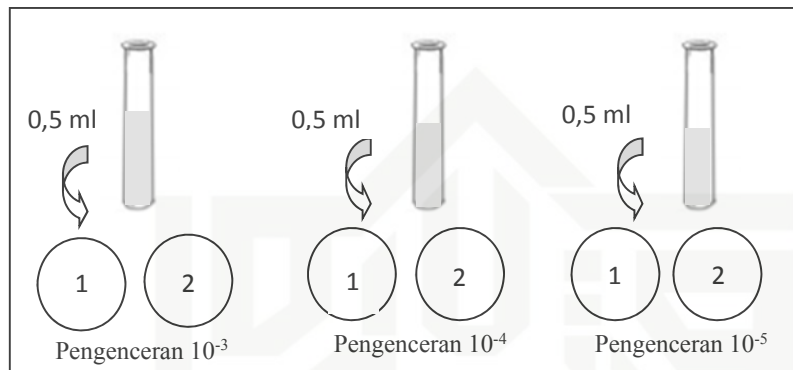
Pengenceran dilakukan secara berseri di *laminar air flow*. Sampel tanah ditimbang sebanyak 10 g lalu dimasukkan ke dalam tabung *erlenmeyer* steril lalu ditambahkan 90 mL NaCl fisiologis steril 0.85%, kemudian *dishaker* dengan kecepatan 100 rpm selama 1 jam. Selanjutnya 1 ml larutan dari tabung Erlenmeyer yang sudah homogen, diambil menggunakan pipetor kemudian dimasukkan kedalam tabung reaksi 9 ml larutan NaCl fisiologis dan diperoleh pengenceran 10^{-1} , pengenceran dilakukan hingga seri pengenceran 10^{-6} .



Gambar 3.2. Metode Pengenceran Bertingkat

3.4.5. Penanaman Isolat

Penanaman bakteri diambil dari 3 pengenceran yaitu 10^{-3} , 10^{-4} dan 10^{-5} . Dari setiap pengenceran diambil 0,5 mL menggunakan pipetor kemudian teteskan di atas permukaan media, lalu ratakan menggunakan batang L. Setiap penanaman dilakukan sebanyak dua kali (*duplo*). Kemudian diinkubasi selama 2-3 hari.



Gambar 3.3. Penanaman Bakteri

3.4.6. Penghitungan Populasi Bakteri

Metode yang digunakan untuk menghitung jumlah koloni adalah metode cawan hitung. Jumlah koloni yang dapat dijadikan acuan untuk penentuan jumlah koloni bakteri per ml sampel adalah jumlah koloni yang berkisar antara 30-300 (Irfan, 2014). Prinsip dari metode ini adalah jika sel mikroba yang masih hidup ditumbuhkan dalam media, maka mikroba tersebut akan berkembang biak dan membentuk koloni yang dapat dilihat langsung dan kemudian dihitung tanpa menggunakan mikroskop.

Rumus menghitung jumlah koloni adalah sebagai berikut :

$$\frac{\text{Jumlah koloni}}{\text{ml}} = \frac{1}{\text{vol. sampel}} \times \frac{1}{\text{faktor pengenceran}} \times \text{jumlah koloni}$$

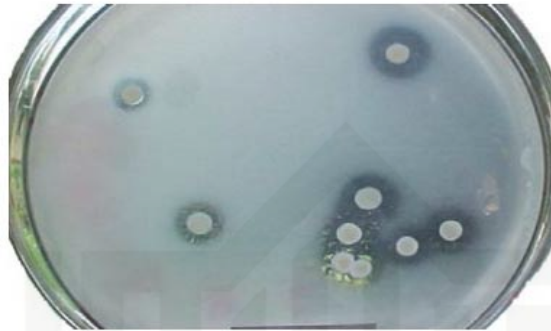
3.5. Parameter Pengamatan

Adapun parameter yang diamati pada penelitian ini adalah:

3.5.1. Skrining Bakteri Pelarut Fosfat

Skrining BPF dilakukan untuk memisahkan antara bakteri yang berpotensi dalam melarutkan fosfat dengan bakteri yang tidak berpotensi dalam melarutkan fosfat, bakteri yang berpotensi ditandai dengan adanya pembentukan zona bening, kemudian dimurnikan berdasarkan ciri morfologinya. Pemurnian bakteri dilakukan dengan cara penggoresan segi enam. Jarum ose dipijarkan hingga merah kemudian

didinginkan lalu digunakan untuk mengambil koloni bakteri dalam cawan petri. Kemudian goreskan jarum ose pada media hingga membentuk segi enam, panaskan jarum ose setiap pengulangan segi (Waluyo, 2008).



Gambar 3.4. Koloni Bakteri Pelarut Fosfat (BPF) Tumbuh Pada Media *Pikovskaya* Membentuk Zona Bening (Santosa, 2007).

3.5.2. Pengukuran Zona Bening

Efisiensi pelarut dari masing-masing isolat dapat dihitung berdasarkan hubungan antara diameter koloni dengan diameter zona bening (halozon). Pengukuran zona bening bertujuan untuk mengukur kemampuan isolat bakteri pelarut fosfat (BPF) dalam melarutkan fosfat dilakukan dengan cara menghitung indeks kelarutan fosfat dari masing-masing isolat BPF yang diperoleh.

Isolat bakteri pelarut P yang telah murni, ditumbuhkan kembali pada medium *Pikovskaya* padat untuk pelarutan P padat dengan cara dititik, dan diinkubasi selama 7 hari pada suhu ruang. Setelah inkubasi, zona bening yang terbentuk di sekitar koloni diukur dan dihitung indeks kelarutan fosfat (IKF) pada masing-masing koloni untuk mengetahui daya degradasi bakteri terhadap P dengan persamaan berikut (Karpagam, and Nagalakshmi 2014).

$$IKF = \frac{\text{Diameter koloni (mm)} + \text{Diameter zona bening (mm)}}{\text{Diameter koloni (mm)}}$$

Gambar 3.5. Rumus Perhitungan Diameter Zona Bening

Koloni yang tumbuh dan mampu membentuk zona bening diindikasikan sebagai isolat yang mampu melarutkan fosfat. Adapun katagori pengukuran indeks

kelarutan fosfat (IKF) dengan mengukur zona bening yang terbentuk berdasarkan Ruwandani (2016) adalah sebagai berikut:

Tabel 3.1. Kriteria Nilai Indeks Kelarutan Fosfat

Nilai IKF	Kriteria
$\leq 1,59$	Rendah
1,6 – 2,12	Sedang
2,15 – 2,59	Tinggi
2,6 – 3	Sangat Tinggi

Sumber: Ruwandani (2016)

3.5.3. Identifikasi Bakteri

Identifikasi bakteri pelarut fosfat terdiri dari beberapa kegiatan diantaranya pengamatan karakteristik morfologi koloni dan uji biokimia. Isolat bakteri yang sudah diketahui karakternya kemudian dicocokkan dengan buku panduan *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* untuk mengetahui genus dari bakteri pelarut fosfat (Hadioetomo, 1993).

1. Identifikasi Bakteri Pelarut Fosfat Secara Makroskopis

Bakteri hasil inkubasi diamati secara langsung (makroskopis) pada bentuk koloni, permukaan koloni, elevasi, tepi dan warna koloni berdasarkan buku identifikasi morfologi bakteri Hadioetomo (1993). Bentuk morfologi bakteri secara makroskopis dapat dilihat pada Lampiran 3.

Tabel 3.2. Parameter Pengamatan Morfologi Makroskopis

Variabel	Kriteria
Bentuk koloni dari Atas	Bulat, bulat dengan tepi bergelombang, bulat dengan tepi timbul, permukaan kusut, konsentrik, menyebar tidak teratur, filamen, bentuk-L, bulat dengan tepi berserabut, filiform, rhizoid, kompleks.
Tepi koloni	Halus, bergelombang, lobat, tidak teratur, sillat, bercabang, wool, benang, rambut.
Elevasi	Datar, timbul, konveks, gunung, umbonat, berbukit, tumbuh ke dalam media, krateriform
Permukaan koloni	Mengkilat, tidak mengkilat
Warna koloni	Berwarna (sebutkan), tidak berwarna
Pertumbuhan	Permukaan, tengah, didasar media

Sumber: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2nd Edition* cit.Hadioetomo (1993)



1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar UIN Suska Riau.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin UIN Suska Riau.

2. Identifikasi Bakteri Pelarut Fosfat Secara Mikroskopis

Pengamatan secara mikroskopis terhadap bentuk dan struktur sel merupakan tahap yang paling penting dalam identifikasi bakteri. Pengamatan mikroskopis bertujuan untuk mengamati pewarnaan gram dan bentuk sel bakteri (Irfan, 2014).

a. Pewarnaan Gram Bakteri

Pewarnaan gram bertujuan untuk membedakan bakteri menjadi dua kelompok yakni, bakteri gram positif dan bakteri gram negatif. Bakteri yang digunakan yaitu bakteri yang berumur kurang dari 20 jam (Irfan, 2014). Prosedur kerja dari pewarnaan gram sebagai berikut :

1. Bersihkan preparat glass dengan alkohol 70% kemudian difiksasi di atas bunsen, beri label pada bagian bawah preparat glass.
2. Pijarkan jarum ose kemudian dicelupkan ke dalam aquades dan teteskan aquades pada preparat glass menggunakan jarum ose, pijarkan lagi jarum ose dan ambil bakteri dari media dengan cara aseptik lalu diratakan di atas preparat glass.
3. Kemudian teteskan larutan zat warna methylen blue sebanyak 1 atau 2 tetes, keringkan selama 30 detik, cuci preparat dengan aquades. Kering anginkan preparat.
4. Kemudian teteskan 1 atau 2 tetes larutan lugol selama 1 menit, bilas dengan alkohol 70 % dan cuci dengan aquades.
5. Terakhir tetes larutan safranin sebanyak 1-2 tetes selama 30 detik, kemudian bilas dengan aquades kembali dikeringkan dan diamkan. Lalu amati menggunakan mikroskop
6. Bakteri gram positif akan ditunjukkan dengan warna ungu, sedangkan bakteri gram negatif akan ditandai dengan warna merah atau merah muda

b. Uji Biokimia

Identifikasi dan uji biokimia dilaksanakan pada tingkat genus dengan merujuk pada buku panduan *Bergey's Manual of Determinative Ninth Edition*.

1. Uji Katalase

Uji katalase dilakukan dengan menggunakan larutan H₂O₂ 3%. Tahap awal yang dilakukan adalah dengan menginokulasikan isolat BPF terpilih selama 1 x 24



jam dengan suhu 37 °C. Kemudian satu ose isolat BPF diambil dan diratakan diatas kaca objek, lalu ditetaskan dengan larutan H₂O₂ 3% 2-3 tetes. Jika terjadi reduksi H₂O₂ akan terlihat adanya gelembung-gelembung udara pada bakteri yang ditetaskan H₂O₂, jika dalam uji tersebut tidak dihasilkan gelembung, maka uji dinyatakan negatif (Saragih, 2013).

2. Uji Oksidase

Uji Oksidase dilakukan dengan menggunakan kertas oksidase strip dengan cara mengoleskan bakteri dalam cawan (Hadioetomo, 1993). Reaksi ditunggu selama 15 detik, hasil positif ditandai dengan munculnya warna ungu, sedangkan hasil negatif ditandai dengan munculnya warna merah muda (Pratita dan Putra, 2012).

3. Uji TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*)

Uji TSIA dilakukan dengan menumbuhkan biakan bakteri pada permukaan media TSIA miring, dan diinkubasi selama 1 x 24 jam, kemudian dilakukan pengamatan terhadap hasil uji. Hasil uji dengan warna medium kuning menandakan asam, warna medium menjadi lebih merah menandakan medium menjadi basa. Warna medium menjadi lebih hitam menandakan terbentuknya gas H₂S dan bila medium terangkat menandakan bahwa mikroba tersebut mampu untuk memproduksi gas H₂S (Sardiani, dkk., 2015).

4. Uji SIM (*Sulfida Indole Motility*)

Uji motilitas dilakukan dengan menumbuhkan biakan bakteri pada media SIM, dengan cara menusukkan jarum ose yang telah dioleskan bakteri kedalam media SIM semisolid, kemudian diinkubasi selama 1 x 24 jam. Kemudian dilakukan pengamatan hasil uji dengan melihat pertumbuhan gerak bakteri pada bekas tusukan jarum ose. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya pergerakan pada bekas tusukan, dan hasil negatif apabila tidak terdapat pertumbuhan bakteri. Sedangkan uji indol, dilakukan dengan meneteskan larutan *kovacks* pada biakan bakteri kemudian melihat hasil uji yang ditandai dengan terbentuknya cincin merah pada permukaan media.

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar UIN Suska Riau.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin UIN Suska Riau.



Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar UIN Suska Riau.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin UIN Suska Riau.

5. Uji SCA (*Simmonts Citrat Agar*)

Uji SCA dilakukan dengan menumbuhkan biakan bakteri pada media *Simmonts Citrat Agar* kemudian diinkubasi selama 1 x 24 jam, dan kemudian dilakukan pengamatan terhadap hasil uji, yakni terjadinya perubahan warna pada media, hasil positif ditunjukkan dengan warna biru, sedangkan hasil negatif tidak terjadinya perubahan warna (tetap hijau).

6. Uji Fermentasi

Uji fermentasi dilakukan untuk mengetahui kemampuan bakteri menghasilkan asam. Pada uji fermentasi ini dilakukan uji terhadap lima jenis gula, yakni glukosa, laktosa, manitol, maltosa, sakarosa, dan diinkubasi selama 1 x 24 jam, yang dilakukan dengan cara mencelupkan isolat bakteri dengan jarum ose kedalam tabung reaksi yang berisi gula-gula di atas. Kemudian dilakukan pengamatan hasil uji dengan melihat perubahan warna yang terjadi pada tabung reaksi. Hasil positif menunjukkan warna kuning, dan hasil negatif menunjukkan warna ungu (Pratita dan Putra, 2012).

3.6. Analisis Data

Data hasil penelitian yang diperoleh dari parameter pengamatan seperti penghitungan jumlah populasi, pengukuran zona bening, dan identifikasi bakteri, akan disajikan dalam bentuk tabel.