III. MATERI DAN METODE

3.1. Tempat dan Waktu

Penelitian ini telah dilaksanakan di laboratorium Patologi Entomologi dan Mikrobiologi (PEM) Fakultas Pertanian dan Peternakan Universitas Islam Negeri Sultan Syarif Kasim Riau Pekanbaru pada bulan Mei 2013 sampai dengan Juni 2013. Penelitian dilaksanakan dalam dua tahap yaitu pengambilan sample di lapangan dan analisis di laboratorium. Pengambilan sample dilakukan di empat lokasi yaitu hutan sekunder lahan baru Fakultas Pertanian dan Peternakan UIN SUSKA, perkebunan kelapa sawit milik rakyat di Kuapan, perkebunan tanaman nenas milik rakyat di Kualu dan lahan percobaan Fakultas Pertanian dan Peternakan UIN SUSKA.

3.2. Bahan dan Alat

Bahan bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah media Nutrien Agar (NA) berbentuk powder dengan merek dagang Merck sebagai media pertumbuhan bakteri yang didapat dari laboratorium PEM, sample tanah dengan tipe pengunaan lahan yang berbeda dari empat lokasi. Bahan kimia yang digunakan seperti: NaCl fisiologis, alkohol, aquadest, kristal violet, safranin, kapas, almuniun foil dan kertas lebel. Alat yang digunakan adalah: bor tanah, petridis, *autoclave*, *colony counter*, *vortex*, tabung reaksi, erlenmeyer, kaca objek, batang L, spatula, jarum ose, laminar air flow dan mikroskop.

3.3 Metode Penelitian

Penelitian akan dilakukan secara deskriptif kuantitatif. Pengambilan data primer berdasarkan pada kebutuhan dan tujuan untuk mendapatkan unsur keterwakilan data dari tiap sampel.

3.4 Pelaksanaan Penelitian

3.4.1 Pengambilan Sampel Tanah

Pengambilan sample tanah dilakukan dengan metode *proposive random sampling* pada lahan sampel. Pengambilan sampel dilakukan dengan cara menancapkan bor gambut sedalam 50 cm untuk kemudian diambil sampel tanahnya dengan menggunakan spatula steril. Sampel tanah yang didapat disimpan ke dalam wadah steril yang kemudian diletakkan di dalam termos yang berisi es untuk segera dibawa ke laboratorium. Sampel tanah kemudian dikompositkan menurut kedalamanya sebagai sampel yang akan mewakili wilayah tersebut. Sampel yang akan diteliti diambil pada kedalaman tanah 0, 25 dan 50 cm.

Tanah yang dijadikan sampel merupakan tanah yang diambil dari empat tipe penggunaan lahan yang berbeda yaitu:

1) Hutan sekunder yang merupakan lahan Fakultas Pertanian dan Peternakan UIN SUSKA yg berada di desa Kualu Nenas Kabupaten Kampar Provinsi Riau, diambil lima titik sampel tanah dengan kedalaman 0, 25, dan 50 cm.

2) Lahan perkebunan kelapa sawit di daerah Kuapan Kabupaten Kampar Provinsi Riau, diambil lima titik sampel tanah dengan kedalaman 0, 25 dan 50 cm.

3) Lahan tanaman nenas dengan sistem monokultur di bawah binaan Balai Penyuluhan Pertanian Kecamatan Tambang Kabupaten Kampar Provinsi Riau, diambil lima titik sampel tanah dengan kedalaman 0, 25 dan 50 cm.

4) Lahan percobaan Fakultas Pertanian dan Peternakan UIN SUSKA yang berada di panam yang merupakan perbatasan antara Pekanbaru dan Kampar yang telah ditanami oleh beberapa jenis tanaman, diambil lima titik sampel tanah dengan kedalaman 0, 25 dan 50 cm.

Pengambilan sampel tidak dapat dilakukan dalam satu waktu dikarnakan ada beberapa faktor kondisi yang tidak memungkinkan. Pengambilan sampel pertama dilakukan di hutan sekunder, pengambilan sampel dilakukan siang hari pada kondisi cuaca yang cerah. Pengambilan sampel kedua dilakukan di hari yang berbeda, lokasi pengambilan sampel yang kedua adalah perkebunan nenas dan kelapa sawit, pengambilan sampel dilakukan pada siang hari dengan kondisi cuaca cerah. Pengambilan sampel ketiga dilakukan dilahan percobaan Fakultas Pertanian dan Peternakan UIN SUSKA RIAU, pengambilan sampel dilakukan pada sore hari dengan kondisi cuca cerah.

3.4.2 Pembuatan Media NA

Preparasi pembuatan media NA: 1) Pada penelitian ini media NA yang digunakan merupakan media instan yang telah jadi dalam bentuk *powder*, timbang media sebanyak 28 g/L aquadest menggunakan timbangan analitis. 2) Setelah itu media dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer dan ditambah aquadest steril kemudian homogenkan dengan menggunakan *hot plate* dan *magnetic stirer*, setelah media

tercampur dengan rata beri penutup kapas dan almunium foil pada mulut erlenmeyer.

3) Media yang telah homogen tersebut kemudian disterilkan kedalam *autoclave* pada suhu 121 ºC selama 15 menit.

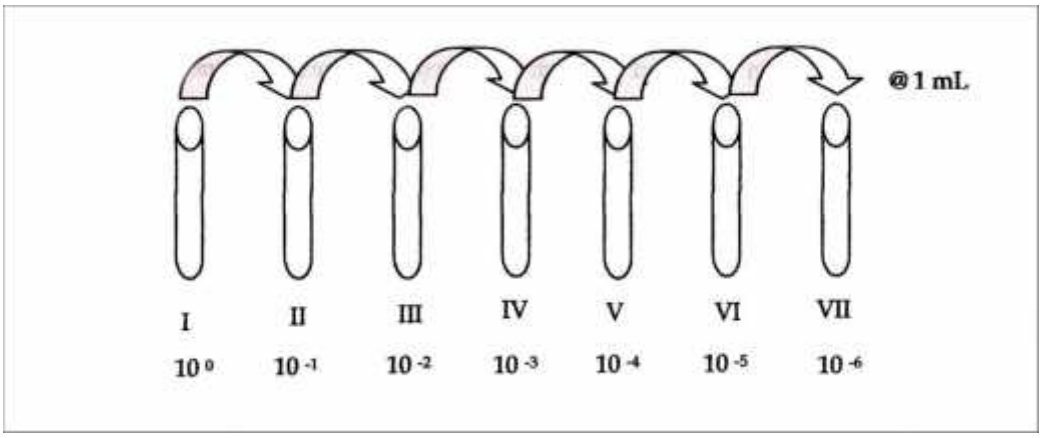
4) Tuang media steril ke cawan petri steril secara aseptik di dalam *laminar air flow*, diamkan media sampai media tersebut memadat dan dingin. Media siap digunakan.

3.4.2 Isolasi Bakteri

Pembuatan isolat dilakukan dengan cara mengambil sample bakteri dari tanah yang diteliti. Sample tanah yang diambil tersebut dibuat pengenceran berseri kemudian bakteri dibiakkan dengan menggunakan media NA. Pengenceran suspensi bakteri dari sample tanah sumber isolat yang dilakukan dalam penelitian ini adalah pengeceran desimal (Waluyo, 2009).

Pengenceran dilakukan secara aseptis di dalam *laminar air flow*.

1) Sampel tanah ditimbang sebanyak 1g dimasukkan ke dalam tabung pengenceran pertama (1/10 atau 10^{-1}) secara aseptis. Perbandingan berat sample dengan volume tabung pertama adalah 1 : 9 dimana 9 ml merupakan NaCl Fisiologis steril, homogenkan dengan memvorteks suspensi.
2) Kemudian diambil 1 ml dari tabung 10^{-1} dengan pipet volume steril kemudian dipindahkan ke tabung 10^{-2} secara aseptis lalu dihomogenkan dengan memvorteks.
3) Pengenceran dilanjutkan hingga tabung pengenceran terakhir dengan cara yang sama, setiap tingkat pengenceran digunakan pipet volume steril yang berbeda/baru.



Gambar 3.1 : Skema Pengenceran Sumber: http://Wikipedia.org/wiki

3.4.4 Penanaman (Inokulasi)

Penanaman diambil dari 3 pengenceran terakhir dipilih 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5} untuk ditanam ke media NA. Penanaman dilakukan dengan metoda sebar secara duplo, prosedur pengerjaannya sebagai berikut: 1) Ambil suspensi cairan sebanyak 0,1 ml dengan pipet volume steril kemudian teteskan di atas permukaan agar yang telah memadat. 2) Sebarkan suspensi dengan batang L yang telah dilewatkan di atas nyala api. 3) inkubasi pada suhu 37 °C selama 18-48 jam pada inkubator, inkubasi merupakan waktu yang diperlukan untuk berlansungnya setiap proses pertumbuhan tertentu.

3.4.5 Perhitungan Jumlah Bakteri

Prosedur perhitungan jumlah bakteri dengan metoda *plate count* (hitungan cawan): 1) Inkubasi pada suhu 37 °C selama 1 – 2 x 24 jam. 2) Setelah tumbuh koloni dihitung dengan *Colony Counter*. Cawan yang dipilih untuk perhitungan koloni, adalah cawan yang berisi 30–300 koloni. Jumlah organisme yang terdapat dalam

sample asal dihitung dengan cara mengalikan jumlah koloni yang terbentuk dengan faktor pengenceran pada cawan (Safitri *et al*, 2010). Perhitungan bakteri didapat dengan menggunakan rumus:

$$\text{Populasi bakteri} = \frac{1}{\text{volume sample}} \times \frac{1}{\text{faktor pengenceran}} \times \text{Jumlah koloni}$$

3.4.6 Pewarnaan Gram

Cara kerja:

1) Sediakan kaca objek yang steril, lalu lewatkan di atas nyala api, teteskan aquades steril di atas kaca tersebut
2) Secara aseptik, ambil bakteri (berumur kurang dari 20 jam) dengan menggunakan jarum ose dan letakkan di atas tetesan aquades tersebut, lakukan fiksasi dengan melewatkan sediaan tersebut di atas nyala api dengan cepat
3) Teteskan kristal violet di atas sediaan tersebut tunggu 1 menit, lalu bilas dengan air aquades
4) Teteskan larutan iodium/lugol di atas sediaan, tunggu 1 menit, lalu bilas dengan air aquades
5) Bilas dengan alkohol 95% di atas sediaan,tunggu 1 menit, lalu bilas dengan air aquades.
6) Teteskan safranin di atas sediaan, tunggu 30 detik, lalu bilas dengan air aquades. Keringkan di suhu ruang, kemudian amati dengan mikroskop.

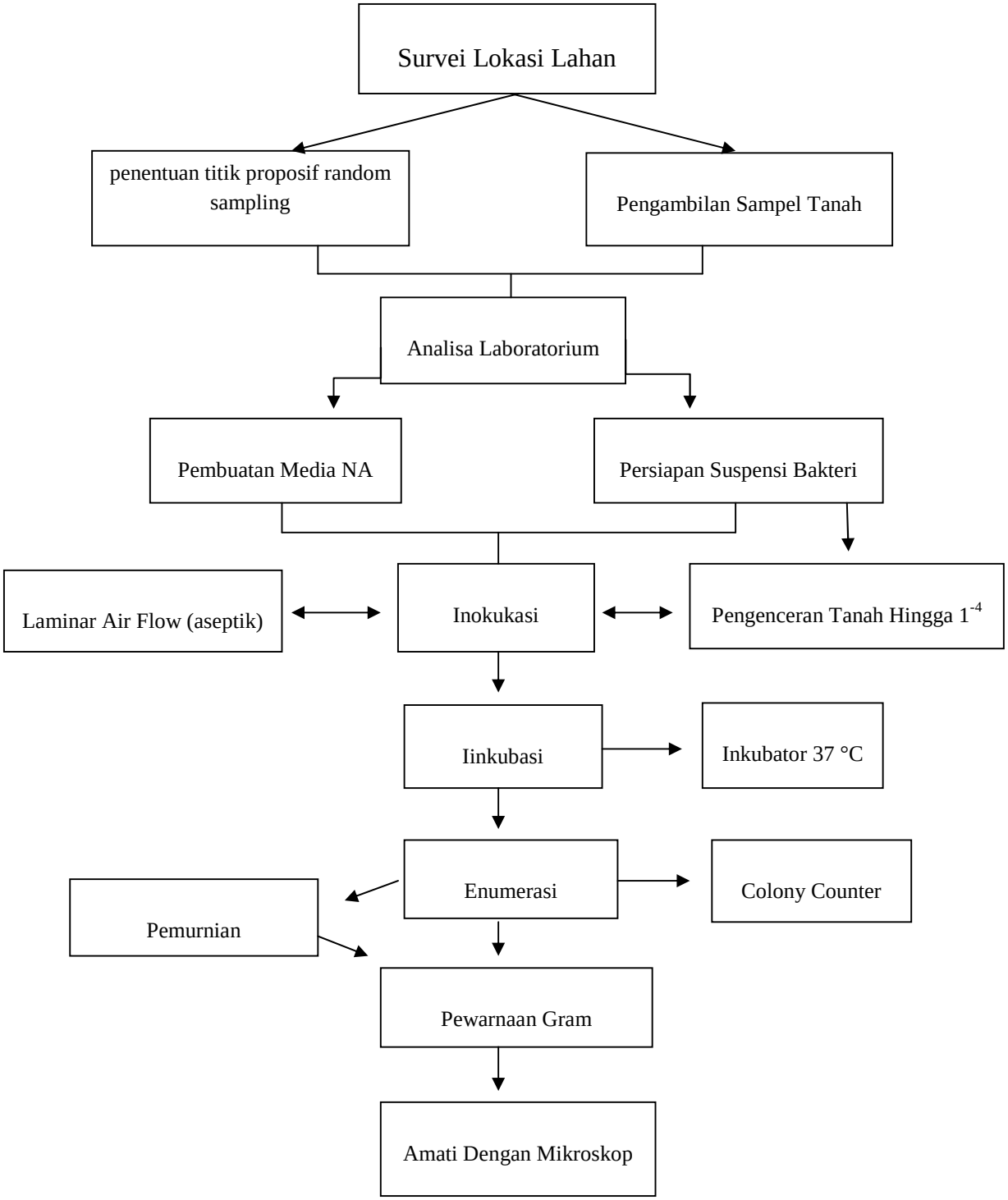
3.4.7 Pengukuran Suhu

Pengukuran suhu dilakukan dengan menggunakan termometer. Untuk pengukuran suhu udara dilakukan dengan cara membiarkan termometer berada di suhu udara tersebut selama lima sampai sepuluh menit dan kemudian dicatat perubahan angka yang terjadi pada termometer. Untuk pengukuran suhu tanah dilakukan dengan cara memasukkan termometer kedalam lubang sampel pengambilan tanah dan membiarkannya selama lima sampai sepuluh menit, kemudian catat suhu yang terdapat pada termometer.

3.4.6 Pengukuran pH

Pengukuran pH yang dilakukan menggunakan pH meter. Dalam penelitian ini pH yang diukur merupakan pH air tanah dan pH tanah. Cara pengukuran pH tanah menggunakan pH H_2O dengan aquadest. Prosedur kerja dalam perhitungan pH tanah adalah sebagai berikut: timbang 10 g sampel tanah, masukkan kedalam labu erlenmeyer kemudian ditambah dengan air aquadest sebanyak 50 ml. Tanah yang telah bercampur air kemudian dihomogenkan selanjutnya diukur dengan menggunakan pH meter (Huda, 2012). Untuk sample air tanah didapat dari parit parit yang ada pada areal sekitar pengambilan sampel. Sampel air tanah yang didapat kemudian diukur denggan menggunakan pH meter. Lakukan pengulangan hingga tiga atau empat kali pada pengukuran tiap sampel.

Alur kegiatan pelaksanaan penelitian:



Gambar 3.2 Alur Kegiatan Pelaksanaan Penelitian