

PENUNTUN PRAKTIKUM

BIOTEKNOLOGI PERTANIAN
(BIDANG BIOTEKNOLOGI TANAH DAN LINGKUNGAN)

DISUSUN OLEH:

TIM PENGAJAR BIOTEKNOLOGI PERTANIAN
(BIDANG BIOTEKNOLOGI TANAH DAN LINGKUNGAN)



LABORATORIUM BIOLOGI TANAH
PROGRAM STUDI AGROTEKNOLOGI
DEPARTEMEN ILMU TANAH DAN SUMBER DAYA LAHAN
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS PADJADJARAN
2021

PELAKSANAAN PRAKTIKUM

Jadwal Praktikum:

Praktikum ke-	Waktu Tanggal/Bulan	Materi
I	12/10/2021 Saat Jam Kuliah	Isolasi Mikroba Pelarut Fosfat, Penambat Nitrogen, dan Bakteri Pelarut Kalium
II	19/10/2021 Saat Jam Kuliah	Bioremediasi Tanah Tercemar Limbah Organik: Percobaan Bioremediasi Skala Laboratorium/Mikrokosmos Tanah Terkontaminasi Minyak Bumi
III	26/10/2021 Saat Jam Kuliah	Isolasi Cendawan Mikoriza Arbuskular dan Pengamatan Akar Tanaman yang Terinfeksi Mikoriza

Cara Praktikum:

1. Pelajari modul penuntun praktikum.
2. Pelajari video praktikum yang diberikan pada link: <http://labbiotan.faperta.unpad.ac.id/>
3. Jawablah pertanyaan-pertanyaan yang terdapat pada tugas logbook setiap praktikum berdasarkan modul penuntun praktikum dan video praktikum yang diberikan.
4. Laporan praktikum setiap individu berupa jawaban tugas logbook setiap praktikum dikumpulkan di Live Unpad dalam format pdf paling lambat 1 minggu sebelum pelaksanaan praktikum berikutnya.

PRAKTIKUM I
ISOLASI MIKROBA PELARUT FOSFAT, PENAMBAT NITROGEN, DAN BAKTERI
PELARUT KALIUM

PRAKTIKUM I.A.
ISOLASI MIKROBA PELARUT FOSFAT

Beberapa jenis mikroorganisme dapat melarutkan fosfat dalam jumlah yang lebih banyak daripada yang diperlukan untuk makanannya sendiri sehingga sisa fosfat terlarut yang tidak dimanfaatkannya akan masuk ke dalam larutan tanah. Fosfat anorganik dilarutkan oleh metabolit mikroba seperti CO₂, senyawa-senyawa khelat dan asam-asam organik tertentu. Meskipun mikroorganisme yang melarutkan fosfat terdapat banyak di daerah akar, belum bisa ditarik kesimpulan bahwa penggunaan fosfat oleh tanaman meningkat sejalan dengan peningkatan aktivitas mikroorganisme tersebut. Persaingan dengan mikroba rizosfer lainnya dapat mengurangi kemampuan akar dalam mengasimilasi fosfat terlarut di dalam zona perakaran.

Pada praktikum ini, fosfat anorganik disuspensikan ke dalam media padat selektif di dalam plat agar. Mikroorganisme tanah ditumbuhkan di dalam media ini. Aktivitas mikroba tersebut dalam melarutkan fosfat diperlihatkan dengan zone bening (*halozone*) yang timbul di sekitar koloni mikroba. Zona tersebut menunjukkan perubahan fosfat anorganik yang tidak larut menjadi fosfat terlarut.

Tujuan: Memperlihatkan kemampuan beberapa mikroba tanah dalam mengubah fosfat anorganik menjadi fosfat terlarut yang tersedia bagi tanaman dan mengisolasi bakteri pelarut fosfat.

Bahan dan Alat:

1. Tanah mineral
2. Media agar Pikovskaya
3. Akuades steril, gelas objek 18 ml steril, *petridish* steril, pipet 1 dan 10 ml steril

Cara Kerja:

1. Siapkan/ambil tanah rizosfer tanaman, masukan ke dalam vial steril. Encerkan sampel tanah sampai dengan pengenceran 10⁻⁴, lakukan secara *serial dilution*.
2. Buat *plate* media agar Pikovskaya dengan cara menuangkan media agar Pikovskaya yang sudah dicairkan dengan pemanasan ke dalam *petridish* masing-masing sebanyak 20 ml.
3. Masukkan masing-masing 0,1 ml suspensi tanah pengenceran 10⁻⁴ dan 10⁻⁵ ke dalam media *plate* agar Pikosvkaya dalam *petridish*.
4. Ratakan/apuskan suspensi di atas *plate* agar dengan menggunakan batang bengkok sehingga merata.
5. Inkubasikan pada suhu 30 °C selama 2-3 hari.
6. Hitung dan pindahkan/isolasi koloni yang menunjukkan aktivitas pelarutan fosfat (terbentuk *halozone* di sekitar koloni) pada agar miring pikovskaya dengan menggunakan ose steril.
7. Lihat video praktikum pada link: <http://labbiotan.faperta.unpad.ac.id/>

Pengamatan:

Populasi BPF dan gambar koloni bakteri dengan *halozone*

Pengenceran Tanah	Populasi Total (CFU/g tanah)	
10^{-4}		
10^{-5}		
Rata-Rata Populasi Total/g Tanah		

PRAKTIKUM I.B.

BAKTERI PENAMBAT NITROGEN

Sekitar 78% nitrogen di alam berada dalam bentuk gas N_2 di atmosfer yang tidak dapat dimanfaatkan oleh makhluk hidup termasuk tanaman. Di dalam tanah bakteri pemfiksasi nitrogen mengubah N_2 menjadi ion amonium dan nitrat yang tersedia bagi tanaman. Fiksasi nitrogen yang hanya terjadi pada kondisi lingkungan tanpa nitrogen merupakan salah satu aktivitas bakteri yang dapat meningkatkan ketersediaan nitrogen di tanah.

Fiksasi nitrogen biologis dilakukan secara simbiosis oleh bakteri *Rhizobium* (bersimbiosis dengan tanaman legum), *Azorhizobium* (bersimbiosis dengan tanaman sesbania) dan *Frankia* (bersimbiosis dengan tanaman alder). Secara nonsimbiosis fiksasi nitrogen dilakukan oleh bakteri seperti *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Klebsiella*, dan *Beijernicki*.

Praktikum. 1.B.1.

Isolasi Bakteri *Rhizobium* dari Nodula Akar

Bakteri *Rhizobium* bermanfaat bagi tanaman setelah bersimbiosis dengan akar tanaman dari keluarga *Leguminosae* yang membentuk nodula (bintil) akar. Legum yang ditanam berasal dari biji yang tidak diinokulasi, ternyata pada kondisi pertanian setempat menjadi terinokulasi oleh *Rhizobium* indigen di dalam tanah.

Rhizobium bersifat aerob, berbentuk batang (*rod*) pada media selektif tanpa inang, bersifat gram negatif, tidak membentuk spora, berkembang biak dalam media yang mengandung karbohidrat tetapi tidak dapat menggunakan nitrogen bebas (N_2) jika ditumbuhkan di luar/tanpa tanaman inang. Dalam interaksinya dengan *Leguminosae*, sel *Rhizobium* bakteri berubah menjadi bentuk bakteroid. Pada bagian tengah nodula yang mengandung bakteroid terbentuk pigmen merah yang disebut leghaemoglobin. Enzim nitrogenase yang dibentuk oleh bakteroid mengkatalis proses fiksasi dan leghaemoglobin mengikat O_2 yang dapat menghentikan proses fiksasi.

Simbiosis antara legum dengan *Rhizobium* mempunyai spesifitas tertentu, artinya bakteri yang diisolasi dari suatu tanaman belum tentu dapat membentuk nodula pada tanaman legum lainnya. Ada beberapa tanaman legum yang mempunyai toleransi tinggi terhadap salah satu atau lebih jenis bakteri *Rhizobium* sehingga pembentukan nodula mudah terjadi, tetapi ada pula yang bersifat sebaliknya.

Tujuan: Mengisolasi bakteri *Rhizobium* dari nodula yang terbentuk pada perakaran tanaman legum dan mempelajari morfologi koloni dan sel bakteri tersebut.

Bahan dan Alat:

1. Perakaran tanaman legum yang mengandung nodula segar.
2. Akuades steril, $HgCl_2$ 0,1% atau Etanol 70%.

3. Medium Yeast Mannitol Agar (YMA) yang terdiri atas mannitol 10 g, yeast extract 0,1 g, K_2HPO_4 1,0 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,2 g, NaCl 0,1 g, congo red 1% 2,5 ml, agar 15 g, akuades 1 l.
4. Petridish steril, pinset steril, pisau, ose.

Cara Kerja:

1. Cuci akar tanaman bernodula. Catat bentuk, distribusi dan jumlah nodula yang ada.
2. Pisahkan nodula yang besar, bernas dan berwarna kemerahan dengan hati-hati jangan sampai terluka atau pecah, nodula kecil dibiarkan melekat di perakaran.
3. Lakukan sterilisasi permukaan nodula dengan cara sebagai berikut:
 - a. Rendam/cuci nodula dalam *petridish* berisi alkohol 90% selama 5 detik, pindahkan ke *petridish* ke-2 lalu cuci beberapa detik.
 - b. Pindahkan nodula ke dalam *petridish* berisi akuades steril dengan menggunakan penjepit steril dengan 5 tahap pencucian.
4. Pindahkan nodula steril dari *petridish* pencucian terakhir ke *petridish* baru dan hancurkan dengan penjepit yang telah dibakar atau sayat dengan *scapel* yang steril dan keluarkan rhizobium dari nodul dengan *scapel*.
5. Siapkan *plate* agar media YMA yang sudah membeku.
6. Ambil dengan menggunakan ose cairan dari pecahan nodula dan langsung goreskan di media YMA *plate* agar. Inkubasikan pada suhu 25-28 °C sampai tumbuh koloni rhizobium (3-7 hari).
7. Seleksi koloni *rhizobium* yang cembung (*muroid*) dan tidak menyerap warna/bening. Pilih satu koloni di antara yang dominan dan pindahkan ke agar miring YMA. Inkubasikan untuk pengujian lebih lanjut.
8. Lihat video praktikum pada link: <http://labbiotan.faperta.unpad.ac.id/>

Pengamatan:

Karakteristik koloni *Rhizobium*

a. bentuk:	b. warna:
c. permukaan:	

Praktikum. 1.B.2.

Isolasi Bakteri Pemfiksasi N Nonsimbiotik *Azotobacter*

Mikroorganisme nonsimbiotik pemfiksasi N yang cukup penting adalah bakteri gram negatif dari genus *Azotobacter*. Sel *Azotobacter* relatif besar, berbentuk batang, kokus atau kadang-kadang terlihat seperti ragi (pleomorfik), tidak membentuk spora, dan berkapsul. Mikroba ini bersifat obligat aerob dan tumbuh di atas permukaan berupa film tipis (*pellicle*) bila ditanam pada medium cair. Mereka mampu memfiksasi nitrogen dari udara bila tersedia karbohidrat atau sumber karbon lainnya.

Bakteri ini tersebar luas di alam terutama di tanah yang tidak terlalu masam dan juga di permukaan daun (filosfir). Selain menyediakan N bagi tanaman, bakteri ini dapat meningkatkan pertumbuhan tanaman melalui kemampuannya dalam menghasilkan hormon pertumbuhan seperti sitokinin dan giberelin dan melakukan dehalogenasi senyawa toksik seperti pestisida. Beberapa penelitian telah membuktikan bahwa *Azotobacter* mampu melarutkan fosfat, memproduksi siderofor pengkkelat logam, dan membentuk eksopolisakarida (EPS) yang berperan dalam mobilisasi logam di tanah. *Azotobacter* mudah diisolasi dengan menambahkan tanah fertil ke dalam medium cair yang mengandung manitol atau manitol dan gula sederhana seperti glukosa maupun sukrosa.

Tujuan: Mengisolasi *Azotobacter* dari tanah rizosfer.

Bahan dan Alat:

1. Tanah dari rizosfer jagung, tomat, atau cabe.
2. Erlenmeyer 250 ml.
3. 50 ml media cair Ashby's Mannitol dan Ashby Mannitol Agar.
4. Petridish steril.

Cara kerja:

1. Buat media cair Ashby's Mannitol dalam *beaker glass* dan agar miring Ashby's Mannitol, sterilkan dalam *autoclave*.
2. Tambahkan 0,5 g tanah ke dalam media cair Ashby's Mannitol yang sudah steril.
3. Tahap pengayaan: Inkubasikan pada 30 °C selama 2 hari.
4. Siapkan media *plate* agar Ashby manitol.
5. Ambil 1 ose kultur hasil, kemudian goreskan di atas media *plate* agar Ashby manitol, goreskan beberapa kali, selanjutnya buat goresan melintang.
6. Inkubasikan pada suhu 30 °C selama 3-4 hari.
7. Amati pertumbuhan koloni. Koloni *Azotobacter* dicirikan dengan bentuknya yang bulat, besar (diameter 3-5 mm), cembung, putih susu, berlendir dan pinggiran rata. Amati pula pigmentasi yang mungkin terjadi pada inkubasi setelah lebih dari satu minggu pada suhu 30 °C.
8. Lihat video praktikum pada link: <http://labbiotan.faperta.unpad.ac.id/>

Pengamatan:

Koloni:

a. Permukaan:	b. Bentuk:
c. Warna:	d. Pigmentasi:

Karakteristik morfologi sel:

Gambar sel:	Bentuk:
	Gram:

PRAKTIKUM I.C.

ISOLASI BAKTERI PELARUT KALIUM

Secara alami kalium total di dalam tanah cukup tinggi. Namun sebagian besar kalium tersebut terdapat pada mineral silikat primer seperti muskovit, mika, dan K-feldspar atau terfiksasi pada mineral liat sekunder 2:1 seperti illit. Kalium dapat dilepaskan dari mineral dan tersedia bagi tanaman ketika secara perlahan mineral silikat yang mengandung kalium melapuk atau larut.

Mikroba tanah dapat membantu melarutkan struktur mineral silikat (Sheng dan Huang, 2002; Badr, 2006). Bakteri tanah dapat melarutkan mineral tersebut dengan dihasilkan asam-asam organik (Ullman *et al.*, 1996; Sheng dan He, 2006). Penggunaan mikroba pelarut kalium dapat meningkatkan ketersediaan unsur hara kalium bagi tanaman (Han *et al.*, 2006).

Herdiyantoro (2013) dan Herdiyantoro *et al.* (2014) telah mengisolasi BPK dari rizosfer tanaman jagung dan menseleksi isolat-isolat bakteri tersebut untuk mendapatkan isolat BPK unggul dalam melarutkan mineral K-feldspar. Selain itu, isolat

BPK telah didapatkan sebanyak 25 isolat dari rizosfer tanaman jagung pada Inceptisols di Jatinangor (Herdiyantoro, 2018a). Tiga isolat BPK terpilih (*Burkholderia cenocepacia*, *Streptomyces pseudovenezuelae*, dan *Klebsiella* sp.) mempunyai aktivitas tinggi dalam melarutkan mineral K-feldspar, menghasilkan asam organik terutama asam kumarat, dan saling kompatibel dalam kultur campuran (Herdiyantoro, 2018b; Herdiyantoro, 2021). Isolat BPK berperan sebagai fasilitator ketersediaan unsur hara kalium dalam tanah dengan mengubah bentuk kalium tidak tersedia menjadi tersedia bagi tanaman.

Bahan dan Alat:

1. Tanah rizosfer tanaman jagung, ubi jalar, atau kentang.
2. Media agar Aleksandrov, akuades steril.
3. Tabung reaksi steril, *petridish* steril, pipet 1 dan 10 ml steril.

Cara Kerja:

1. Encerkan tanah rizosfer sampai dengan pengenceran 10^{-6} dengan metode pengenceran.
2. Masukkan masing-masing 0,25 ml suspensi tanah pada pengenceran 10^{-5} dan 10^{-6} ke dalam *petridish*.
3. Tuangkan media agar Aleksandrov ke dalam *petridish* masing-masing sebanyak 20 ml. Homogenkan suspensi tanah dan media dengan cara menggoyang-goyangkan *petridish*.
4. Inkubasikan pada suhu 30 °C selama 3-7 hari.
5. Isolat bakteri pelarut kalium yang menunjukkan aktivitas pelarutan kalium ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekitar koloni.
6. Hitung dan lakukan pemurnian isolat koloni yang menunjukkan aktivitas pelarutan kalium tersebut pada agar Aleksandrov.
7. Selanjutnya koleksi dalam agar miring Aleksandrov.
8. Lihat video praktikum pada link: <http://labbiotan.faperta.unpad.ac.id/>

Pengamatan:

Populasi bakteri pelarut kalium dan gambar koloni bakteri dengan zona beningnya

Pengenceran Tanah	Populasi Total (CFU/g tanah)	
10^{-5}		
10^{-6}		
Rata-Rata Populasi Total/g Tanah		

PRAKTIKUM II
BIOREMEDIASI TANAH TERCEMAR LIMBAH ORGANIK: PERCOBAAN
BIOREMEDIASI SKALA LABORATORIUM/MIKROKOSMOS TANAH
TERKONTAMINASI MINYAK BUMI

Bioremediasi merupakan salah satu cara penanganan limbah di dalam tanah, merupakan teknik yang memanfaatkan agen biologis dengan mempelajari segala aspek biologis yang dapat dimanfaatkan secara optimal. Tujuan dari bioremediasi adalah merehabilitasi lahan tercemar senyawa toksik yang bersifat rekalsitran yang dihasilkan oleh berbagai kegiatan industri seperti industri pulp, pengolahan minyak bumi, industri tekstil, pestisida dan lain-lain.

Beberapa *treatment* yang dapat dilakukan dalam proses bioremediasi antara lain: *Land farming*, *composting*, dan *slurry reactor* (Cookson, 1985). *Land farming* biasa dilakukan pada permukaan tanah terkontaminasi dengan sistem terbuka. Prinsip dari proses ini adalah aplikasi proses biologis aerobik dengan menggunakan tanah sebagai inokulum dan meningkatkan aktifitas inokulum pendegradasi yang berada dalam tanah tersebut dengan memberikan senyawa nutrisi utama yaitu N, P, dan K untuk meningkatkan aktifitas mikroorganisme pendegradasi. *Composting* dapat dilakukan dalam sistem terbuka atau tertutup. Prinsip dari sistem *composting* adalah penggunaan bahan organik sebagai *bulking agent* untuk meningkatkan aerasi tanah terkontaminasi atau lumpur limbah yang akan diremediasi dan menyediakan sumber karbon dan energi bagi bakteri pendegradasi. Bahan kompos yang dapat digunakan adalah berbagai bahan organik seperti serbuk gergaji, limbah kayu, limbah pertanian dan lain-lain. *Slurry reactor* merupakan proses bioremediasi limbah cair dalam reaktor dengan berbagai *design reactor* seperti *open vessel* (bejana terbuka), *closed system* (sistem bejana tertutup) dan *sludge lagoon* (kolam Lumpur), bisa dalam kondisi aerob maupun anaerob.

Salah satu limbah yang sering menjadi masalah dan perlu penanganan sampai saat ini adalah limbah minyak bumi, karena lebih dari 2 milyar ton minyak bumi dihasilkan di seluruh dunia setiap tahunnya (Bartha, 1986). Limbah minyak bumi termasuk limbah organik toksik dan sulit terdegradasi. Sedangkan limbah industri kertas, limbah tekstil, residu pestisida, dan limbah detergen termasuk kelompok limbah bersifat xenobiotik artinya limbah yang bersifat bukan yang berasal dari alam tetapi sintetik.

Limbah minyak bumi merupakan materi kompleks yang tersusun dari campuran senyawa hidrokarbon. Hidrokarbon adalah senyawa yang terdiri dari dua unsur utama yaitu karbon (C) dan hidrogen (H). Berdasarkan pada struktur dasarnya hidrokarbon minyak bumi maupun produk sulingannya terdiri dari hidrokarbon alifatik dan hidrokarbon aromatik (Mishra *et al.*, 2001). Sejumlah senyawa yang terkandung dalam minyak bumi bersifat toksik sehingga dapat menurunkan populasi mikroorganisme tanah dan menurunkan kualitas lingkungan.

Hidrokarbon alifatik minyak bumi terdiri dari alkana, alkena, alkuna, dan alifatik siklik. Sedangkan hidrokarbon aromatik tersusun berdasarkan jumlah cincin benzennya seperti naftalen, fenantren, piren, dan benzo-piren. Senyawa-senyawa hidrokarbon ini sangat sulit terdegradasi sehingga merupakan polutan yang sangat potensial menurunkan kualitas lingkungan baik udara, perairan, dan tanah.

Biodegradasi senyawa hidrokarbon oleh bakteri sangat tergantung pada variasi rantai karbon, percabangan rantai karbon, banyaknya cincin hidrokarbon, dan adanya gugus oksigen. Tidak semua mikroorganisme mampu menggunakan hidrokarbon sebagai substrat atau sumber karbon untuk pertumbuhannya. Oleh karena itu untuk meningkatkan proses atau efisiensi degradasi perlu dilakukan augmentasi

(penambahan mikroorganisme yang telah diketahui karaktersitiknya sesuai tujuan). Kelompok mikroorganisme tersebut umumnya termasuk kelompok petrofilik yaitu mikroorganisme pendegradasi hidrokarbon atau kelompok mikroorganisme yang mampu menggunakan hidrokarbon sebagai sumber Karbonnya. *Petrobacter* yang telah efektif antara lain *Pseudomonas* spp., *Bacillus cereus*, *Acinetobacter* sp., *Enterobacter* sp. (Suryatmana *et al.*, 2006; Cookson, 1995).

Ada beberapa parameter yang diamati untuk mengukur efektifitas dan efisiensi proses bioremediasi: penurunan senyawa limbah (pada minyak bumi dengan mengukur residu *total petroleum hydrocarbon* (TPH), C/N rasio, atau uji detoksifikasi penurunan tingkat toksik suatu senyawa dengan menumbuhkan benih tanaman uji.

Tujuan:

1. Mempelajari efektifitas dan efisiensi proses bioremediasi tanah yang tercemar polutan organik (minyak bumi) dalam sistem *land farming* melalui *bioaugmentasi*.
2. Analisis/uji penurunan polutan dalam tanah, menunjukkan tingkat penurunan polutan atau tingkat toksisitasnya yang dapat dilakukan dengan mengekstrak sisa *total petroleum hydrocarbon* (TPH) minyak bumi dalam tanah setelah dilakukan proses bioremediasi.

Bahan dan Alat :

Bahan:

1. Contoh tanah percobaan.
2. Minyak bumi/tanah terkontaminasi minyak bumi.
3. Kultur bakteri pendegradasi hidrokarbon (petrofilik).
4. Serbuk kayu gergaji sebagai *bulking agent*.
5. n-heksan untuk mengekstrak sisa minyak bumi dalam tanah.
6. Media untuk menghitung populasi total mikroba tanah.

Alat:

1. Kontainer plastik/baki plastik, reaktor mini dengan penutupnya.
2. Botol semprot untuk menyiram/menjaga kelembapan.
3. Gelas ukur, timbangan analitik, *beaker glass*.

Cara Kerja:

1. Penyiapan tanah terkontaminasi minyak bumi.
2. Siapkan 2 baki plastik sebagai kontainer *biocell* (beri label A, baki kanan dan B, baki kiri).
3. Isikan masing-masing baki dengan 2 kg tanah.
4. Siram/tambahkan polutan organik (misalnya minyak bumi) ke dalam dua baki yang telah diisi tanah.
5. Inokulasikan/siramkan kultur petrofilik sebanyak 2% dari volume tanah percobaan (40 ml) ke dalam baki B (kiri) dan aduk merata.
6. Inkubasikan beberapa hari.
7. Ambil contoh tanah terkontaminasi pada hari ke-0 (T_0) dan hari ke-7 (T_7). Lakukan analisis masing masing untuk mendapatkan data:
 - a. *Total petroleum hydrocarbon* (TPH) menggunakan metode ekstraksi dengan n-heksan. Prosedur penentuan TPH sebagai berikut:
 - i. Panaskan botol volume 15 ml dalam oven 105 °C selama 1 jam. Dinginkan dengan dalam desikator.
 - ii. Timbang botol 15 ml (= botol A g).

- iii. Ambil 5 g tanah sampel masukkan ke dalam botol 50 ml (botol B = botol ekstraktor).
 - iv. Tambahkan 10 ml n-heksan ke dalam botol B yang telah berisi sampel tanah terkontaminasi, tutup rapat vial dengan tutup karet dan aluminium foil.
 - v. Selanjutnya Botol B yang telah berisi sampel dan n-heksan dikocok dengan shaker/pengocok dengan rotasi 150 rpm selama 30-60 menit yang bertujuan untuk mengekstrak minyak bumi dari partikel dan matriks tanah.
 - vi. Ambil supernatan dari botol B hasil shaking dengan pipet, masukkan ke dalam botol A (yang telah ditimbang terlebih dahulu pada point ii).
 - vii. Ulangi langkah iv-vi (untuk mendapatkan TPH yang masih tersisa pada partikel tanah), hasil ekstraksi ke dua disatukan ke dalam botol A.
 - viii. Botol A yang berisi ekstrak minyak bumi dipanaskan dengan penangas air pada suhu 75 °C atau dibiarkan menguap di ruang asam/ruang terbuka untuk menguapkan larutan solven (n-heksan) sampai habis. (Selama penguapan n-heksan dari sampel, jauhkan kegiatan dari api, karena uap heksan sangat mudah terbakar!).
 - ix. Selanjutnya timbang botol A yang telah berisi ekstrak TPH yang sudah mengalami penguapan solven (= vial C).
 - x. Tentukan/hitung konsentrasi TPH yang terekstrak dari sampel tanah dengan cara menghitung konsentrasi residu TPH yang diamati, sbb.:

$$\text{Konsentrasi TPH (\%)} = \frac{[C - A]}{\text{berat sampel}} \times 100 \%$$
 - b. Populasi bakteri total tanah dengan menggunakan metode *total plate count*.
8. Perhatikan hasilnya dan apa kesimpulannya?
 9. Lihat video praktikum pada link: <http://labbiotan.faperta.unpad.ac.id/>

PRAKTIKUM III
ISOLASI CENDAWAN MIKORIZA ARBUSKULAR DAN PENGAMATAN AKAR
TANAMAN YANG TERINFEKSI MIKORIZA

Mikoriza adalah suatu bentuk hubungan simbiosis antara jamur (*myces*) dan perakaran (*rhiza*) tumbuhan tingkat tinggi. Adanya bentuk asosiasi antara jamur dengan suatu tanaman menguntungkan ke fungi itu sendiri maupun pada tanaman inangnya. Mikoriza dapat memperoleh karbohidrat terutama gula sederhana dan faktor pertumbuhan dari tanaman inang. Di lain pihak, tanaman inang secara efektif dapat meningkatkan penyerapan unsur hara makro dan beberapa unsur hara dalam bentuk terikat dan tidak tersedia untuk tanaman.

Berdasarkan struktur tubuhnya dan cara infeksi terhadap tanaman inang, mikoriza dikelompokkan ke dalam dua golongan besar yaitu ektomikoriza dan endomikoriza. Akar ektomikoriza biasanya membesar dan bercabang (dikhotom) serta tidak memiliki akar rambut. Dalam suatu penampang melintang tampak permukaan akar ditutupi miselia yang disebut *fungus sheet* (mantel). Hifa tidak masuk ke dalam sel tapi hanya berkembang di antara dinding sel korteks.

Perakaran yang terinfeksi jamur endomikoriza tidak membesar. Jamur membentuk struktur akar dengan lapisan hifa tipis pada permukaan akar tetapi tidak setebal mantel pada ektomikoriza. Hifa berkembang di dalam sel jaringan korteks dan tidak pernah mengkolonisasi silinder pusat. Selain itu terdapat struktur khusus berbentuk oval yang disebut vesikula dan sistem percabangan hifa (dikhotom) di dalam sel korteks yang disebut arbuskula. Endomikoriza terbagi menjadi cendawan mikoriza arbuskular (CMA), mikoriza erikoidae dan mikoriza orchidae.

Tujuan: Mengisolasi spora dari jamur pembentuk CMA dari tanah di sekitar perakaran tanaman dan melihat morfologi akar terinfeksi oleh jamur mikoriza secara mikroskopis.

Bahan dan Alat:

1. Tanah sebanyak 50 g dari sekitar perakaran jagung.
2. Akar tanaman jagung.
3. Air ledeng untuk pembilas, larutan gula 20%, KOH 10 %, HCl encer.
4. Asam fuchsin (Fuchsin 0,02 % di dalam asam laktat).
5. *Beacker glass*, saringan tanah dengan ukuran 250, 125, 63, dan 35 μ m.

Cara Kerja:

A. Isolasi Spora Mikoriza

1. Aduk rata 50 g tanah dan 200 ml air di dalam *beacker glass* dan diamkan selama satu menit.
2. Tuangkan suspensi tanah tersebut pada saringan yang telah disusun menurut ukuran pori dari terbesar (di atas) sampai terkecil (di bawah).
3. Bilas berulang-ulang dengan air ledeng sehingga diperkirakan seluruh spora sudah tersaring.
4. Tuangkan spora dari masing-masing saringan ke dalam tabung sentrifugal, tambahkan larutan gula 20 ml. Lakukan sentrifugasi selama 5 menit pada 2.000 rpm.
5. Tuangkan masing-masing tabung ke dalam saringan semula (tahap 4), bilas dengan air ledeng.
6. Tuangkan materi di dalam saringan ke dalam *petridish* dengan bantuan semprotan.
7. Amati di bawah mikroskop binokuler dengan pembesaran sedang.

8. Pisahkan spora yang terlihat pada suatu tempat dengan menggunakan pipet berujung kecil. Tempatkan spora pada gelas arloji atau tabung film berisi air.
9. Amati spora di bawah mikroskop pada perbesaran 10 kali.
10. Lihat video praktikum pada link: <http://labbiotan.faperta.unpad.ac.id/>

B. Pembuatan Preparat Akar Bermikoriza

1. Akar dibersihkan di bawah air mengalir dan potong-potong akar sepanjang 2 cm.
2. Potongan akar dibersihkan kembali dengan menggunakan saringan di bawah air mengalir.
3. Tempatkan akar di dalam beacker glass dan diberi KOH 10% sampai terendam, panaskan pada suhu kurang dari 100 °C selama lima menit atau tergantung kekerasan akar.
4. Buang KOH dengan membilasnya dalam akuades atau disemprot lalu tambahkan HCl encer selama 3-4 menit.
5. Buang HCl dan beri asam fuchsin selama setengah jam.
6. Letakan potongan akar di atas gelas objek, tutup dengan gelas penutup dan tekan preparat tersebut. Amati di bawah mikroskop dengan pembesaran kuat.
7. Gambar/perhatikan hifa, vesikular dan arbuskular yang menjadi ciri infeksi jamur mikoriza.

Pengamatan:

Jumlah spora per 50 g tanah

Ukuran Saringan		
Mesh	Mesh	Mesh

Gambar akar terinfeksi mikoriza

