



Keberhasilan proses ini diindikasikan dengan munculnya warna kuning ketika Reagen Nessler ditambahkan kepada cuplikan medium yang telah ditumbuhi mikroba. Amonia yang dihasilkan dapat dikuantifikasikan dari kepekatan warna kuning yang terbentuk.

## **BAHAN**

Tanah : 0.1 gram tanah rhizosfir dan tanah tandus

Reagent Nessler

Media : Kaldu pepton 4%

## **PERALATAN**

Bunsen, Kawat inokulasi (Oose), Plat tetes dan Pipet Pasteur.

## **CARA KERJA**

1. Beri tanda masing tabung yang berisi kaldu pepton dengan kode tanah rhizosfit yang hendak diuji, serta satu tabung sebagai kontrol.
2. Inokulasikan masing medium tersebut dengan bakteri dan tanah (cukup 1 Oose) kecuali kontrol.
3. Inkubasikan medium yang sudah diinokulasi tersebut selama 7 hari pada temperatur ruang.

## **PENGAMATAN**

1. Lakukan pengujian adanya amonia pada hari ke 3, 5, dan 7. Cara pengujian adalah sebagai berikut :

Tempatkan satu tetes reagent Nessler pada plat tetes sesuai banyaknya bakteri dan tanah yang diuji plus kontrol. Masukkan satu Oose dari masing kultur dan kontrol ke masing plat yang ada reagent Nessler. Aduk dengan Oose sampai timbul perubahan warna.

2. Lakukan pencatatan hasil dengan menggunakan pedoman berikut :

Warna	Angka	Penilaian terhadap amonia yang dihasilkan
Tidak ada perubahan warna	0	Tidak dihasilkan amonia
Kuning muda	1	Sedikit
Kuning tua	2	Sedang
Coklat	3	Banyak

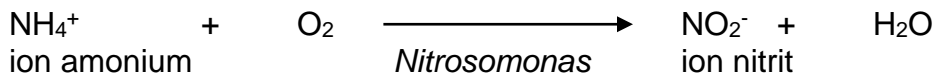
3. Sesuai dengan hasil pengamatan, bagaimana perbedaan hasil yang diperoleh dari tanah yang berbeda, mana yang paling banyak menghasilkan amonia? Adakah perbedaan hasil dari hari kehari?

## 8.2 NITRIFIKASI

### PRINSIP DASAR

Amonia yang dilepaskan selama proses amonifikasi jarang terakumulasi dalam jumlah yang berarti. Dalam kondisi aerob amonia akan teroksidasi oleh bakteri menjadi nitrat melalui 2 tahapan proses yang terutama melibatkan mikroba kemoautotrof *Nitrosomonas* dan *Nitrobacter*. Proses ini disebut dengan istilah **nitrifikasi** dengan reaksi sebagai berikut :

#### Step 1 : Pembentukan nitrit



#### Step 2 : Pembentukan nitrat



Nitrat yang dilepaskan ke dalam tanah sangat mudah terlarut dan terasimilasi oleh flora tumbuhan darat dan beberapa mikroba untuk biosintesis protein sel. Dalam percobaan ini akan dipergunakan kaldu amonium sulfat sebagai medium dasar untuk menunjukkan kemampuan mikroba uji dalam mengubah amonium menjadi nitrit. Sedangkan untuk mengetahui kemampuan mikroba dalam mengubah (oksidasi) nitrit menjadi nitrat maka digunakan kaldu nitrit sebagai medium dasar.

#### Cara penentuan adanya nitrit :

1. Lakukan **uji amonia** dengan menggunakan **reagent Nessler**. Adanya warna kuning menandakan bahwa amonia belum diubah menjadi nitrit. Tidak ada perubahan warna berarti tidak terdapat amonia dan berarti nitrit sudah terbentuk.
2. Lakukan **pengujian nitrit** dengan menggunakan **reagent Trommsdorf** dan **asam sulfat**. Adanya warna biru hitam menandakan adanya nitrit; sedangkan kalau tidak terjadi perubahan warna berarti tidak terbentuk nitrit.

#### Cara penentuan adanya nitrat :

1. Uji keberadaan nitrit dengan menggunakan reagent Trommsdorf dan asam sulfat dengan cara sama dengan langkah no 2 di atas.

2. Lakukan **pengujian nitrat** (setelah uji nitrit negatif) dengan menggunakan **reagent diphenylamine** dan **asam sulfat**. Warna biru hitam menandakan adanya nitrat.

## **BAHAN**

Dua macam tanah : yang agak alkali (pH >7) dan yang agak asam (pH <7)

## **MEDIA**

Kaldu amonium sulfat dan kaldu nitrit dalam labu Erlenmeyer

## **REAGENT**

Nessler, diphenylamine, Trommsdorf , asam sulfat pekat, dan asam sulfat encer (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : H<sub>2</sub>O = 1:3)

## **PERALATAN**

Bunsen, pipet Pasteur, plat tetes, dan tusuk gigi / batang korek api.

## **PROSEDUR KERJA**

1. Beri label masing labu yang berisi medium kaldu amonium dan kaldu nitrit dengan kode tanah yang diperiksa
2. Masukkan 1-2 Oose tanah (sampel) ke masing labu sesuai dengan label yang tertera
3. Inkubasi semua labu yang sudah diberi tanah dalam suhu ruang selama beberapa minggu

## **PEMERIKSAAN**

Periksa keberadaan nitrit dan nitrat selang tujuh hari (satu minggu) dengan cara sbb.

### **Pemeriksaan nitrit**

1. Periksa ada tidaknya amonia dengan cara seperti **percobaan 8.1**
2. Kalau uji amonia negatif, lakukan uji nitrit dengan mencampurkan 3 tetes reagent Trommsdorf dengan 1 tetes asam sulfat encer pada plat tetes (satu plat untuk satu sampel tanah)
3. Tambahkan 1 tetes kultur ke dalam campuran reagent tersebut
4. Aduk dengan menggunakan batang korek api
5. Amati perubahan warna yang terjadi

### **Pemeriksaan nitrat**

1. Lakukan uji nitrit terlebih dahulu untuk meyakinkan nitrit sudah berubah menjadi nitrat dengan cara yang sama seperti di atas

2. Lakukan uji nitrat setelah yakin uji nitrit negatif dengan menambahkan 1 tetes diphenylamine dan 2 tetes asam sulfat pekat pada plat tetes
3. Tambahkan 1 tetes kultur ke campuran reagent tersebut
4. Aduk dengan batang korek api
5. Amati perubahan warna yang terjadi

Lakukan pencatatan terhadap hasil di dalam tabel seperti berikut:

Medium dan Jenis uji		Tanah alkali			Tanah asam		
		Minggu ke :			Minggu ke :		
		1	2	3	1	2	3
Medium kaldu amonium sulfat	Uji amonia dengan reagent Nessler						
	Uji nitrit dengan reagent Trommsdorf						
Medium kaldu nitrit	Uji nitrit dengan reagent Trommsdorf						
	Uji nitrat dengan diphenylamine						

## 8.3 FIKSASI NITROGEN

### PRINSIP DASAR

Fiksasi Nitrogen adalah salah satu aspek dari siklus nitrogen. Proses ini sangat penting dalam menyediakan sumber Nitrogen bagi tanaman. Proses fiksasi nitrogen oleh mikroba terjadi melalui 2 sistem (simbiotik dan non-simbiotik). Yang simbiotik contohnya adalah *Rhizobium* dengan tanaman leguminosae sedangkan yang non-simbiotik seperti : *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Clostridium* dan Cyanobacteria. Kelompok yang simbiotik biasanya membentuk struktur yang disebut **bintil** atau **nodul** pada akar tanaman.

Dalam praktikum ini akan dilakukan 2 jenis percobaan : (1) memeriksa keberadaan bakteri pemfiksasi nitrogen simbiotik dari bintil akar dan (2) pengisolasian bakteri pemfiksasi nitrogen non-simbiotik dari tanah yang alkali dengan menggunakan medium agar manitol yang bebas nitrogen.

### BAHAN

Tanah alkali  
Bintil akar dari tanaman kelompok leguminosae

### MEDIA

Kaldu manitol (50mL) yang bebas nitrogen dalam labu Erlenmeyer

Agar tegak manitol bebas nitrogen

REAGENT set pewarnaan Gram

Methylene blue, crystal violet, Gram's iodine, etil alkohol, dan safranin

## **PERALATAN**

Bunsen, kawat Oose, kaca obyek, perangkat pewarnaan

## **PROSEDUR KERJA**

### **Isolasi *Azotobacter***

1. Masukkan 1 g tanah ke dalam medium kaldu manitol bebas N, lalu kocok sampai terbentuk suspensi yang homogen
2. Inkubasikan medium yang berisi tanah ini pada temperatur ruang selama 7 hari (1 minggu)
3. Pada akhir masa penginkubasian, periksa ada tidaknya suatu lapisan tipis pada permukaan medium. Jangan guncangkan labu supaya lapisan tipis tersebut tidak rusak
4. Pindahkan 1 Oose dari lapisan tipis tersebut ke lempeng agar manitol bebas N. Buat 16 goresan dengan pada permukaan lempeng pada 4 sisi dengan teknik 16 goresan
5. Inkubasikan cawan lempeng yang sudah dinokulasi tersebut pada suhu ruang selama 6 hari

### **Pengamatan**

1. Pilih 2 atau 3 koloni yang tumbuh dari agar manitol bebas N
2. Amati ada tidaknya pigmentasi
3. Lakukan pewarnaan Gram
4. Amati dengan mikroskop bentuk sel, susunan, serta ukuran dari sel

### ***Azotobacter* memiliki ciri sebagai berikut :**

- Koloni tidak berwarna atau kecoklatan setelah tua
- Berpendar kehijauan atau tidak berpendar di bawah sinar UV
- Gram negatif
- Bentuk sel ovoid batang
- Ukuran sel besar-besar
- Sel sering dalam pasangan-pasangan