

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia dikenal sebagai negara dengan sumber daya mineral melimpah, salah satunya adalah nikel yang telah menjadi komoditas tambang unggulan. Sektor pertambangan menyumbang kontribusi besar terhadap perekonomian Indonesia. Berdasarkan data Badan Pusat Statistik (BPS), sektor ini memberikan kontribusi sebesar Rp2.198 triliun terhadap Produk Domestik Bruto (PDB) Indonesia. Jumlah tersebut setara dengan 10,5 persen dari total PDB nasional yang mencapai Rp20.892 triliun (BPS, 2024). Pada tahun 2023, Indonesia tercatat sebagai produsen nikel terbesar di dunia dengan estimasi produksi mencapai 1,8 juta metrik ton. Jumlah ini menyumbang sekitar 50 persen dari total produksi nikel secara global yang menegaskan dominasi Indonesia dalam industri nikel dunia (Annur, 2023).

Sektor pertambangan memberikan kontribusi signifikan terhadap perekonomian negara, namun aktivitasnya juga menimbulkan dampak lingkungan yang tidak dapat diabaikan. Proses penambangan terbuka (*open-pit mining*) yang digunakan dalam pertambangan nikel menyebabkan perubahan topografi lahan, hilangnya vegetasi, dan kerusakan lapisan tanah yang kaya nutrisi (Agussalim et al., 2023). Tanah bekas tambang nikel biasanya memiliki karakteristik yang tidak mendukung pertumbuhan tanaman, seperti pH yang rendah, kandungan logam berat tinggi, dan minimnya kandungan nutrisi penting yang diperlukan bagi pertumbuhan vegetasi (Listiyani, 2017). Hal ini menyebabkan siklus hara terganggu, membuat tanah tidak mampu menopang kehidupan mikroorganisme esensial dan fauna tanah lainnya yang penting dalam siklus ekologi. Kehilangan lapisan topsoil juga berdampak pada tingginya kepadatan tanah, yang menghambat pertumbuhan akar tanaman dan mengurangi kemampuan tanah dalam menyerap air (Erfandi, 2017).

Kerusakan tanah akibat kegiatan tambang memerlukan penanganan khusus agar ekosistem lahan dapat pulih. Proses reklamasi lahan bekas tambang seringkali sulit dan memakan waktu, karena sifat tanah yang telah berubah secara kimiawi dan fisik. Oleh karena itu, pendekatan inovatif yang lebih ramah lingkungan dan berkelanjutan sangat diperlukan untuk mengatasi tantangan ini. Pemanfaatan mikroorganisme tanah, terutama Jamur Pelarut Fosfat (JPF) yang telah banyak diteliti sebagai solusi potensial dalam memperbaiki kualitas tanah dan mempercepat proses revegetasi lahan bekas tambang. Jamur pelarut fosfat (JPF) adalah kelompok mikroba yang mampu melarutkan fosfat yang tidak tersedia dalam tanah menjadi bentuk yang dapat diserap oleh tanaman. Fosfor adalah elemen esensial yang diperlukan untuk berbagai fungsi fisiologis tanaman, seperti fotosintesis, pembentukan ATP, dan pembelahan sel (Khan et al., 2023). Namun, fosfor dalam tanah sering kali terikat dalam bentuk senyawa yang tidak larut sehingga tidak dapat diserap langsung oleh tanaman. Jamur pelarut fosfat memainkan peran penting dalam meningkatkan ketersediaan fosfat di tanah dengan mengeluarkan asam

organik seperti asam sitrat dan asam oksalat yang dapat mengubah fosfat terikat menjadi bentuk yang tersedia bagi tanaman (Whitelaw, 1999).

Penelitian oleh (Tian et al., 2021) menunjukkan bahwa JPF tidak hanya membantu meningkatkan ketersediaan fosfat, tetapi juga mampu memperbaiki struktur tanah dan meningkatkan daya simpan air, yang sangat penting untuk revegetasi lahan yang mengalami degradasi. Keberadaan JPF pada tanah mampu mendukung pertumbuhan vegetasi, karena fosfat sebagai nutrisi penting tersedia dalam jumlah yang memadai. JPF melepaskan enzim fosfatase yang berperan menghidrolisis fosfat organik menjadi bentuk anorganik yang lebih mudah diserap oleh tanaman (Natalie Fitriatin et al., 2020). Jyothi et al. (2020) menjelaskan bahwa selain membantu dalam mobilisasi fosfat, JPF juga menghasilkan *siderophore* yang mampu mengikat logam berat di dalam tanah, sehingga mengurangi racun yang berpotensi menghambat pertumbuhan tanaman.

Jamur Pelarut Fosfat (JPF) tidak hanya berperan dalam meningkatkan ketersediaan fosfor, tetapi juga berkontribusi dalam perbaikan struktur tanah, khususnya dalam rehabilitasi lahan bekas tambang. Penelitian sebelumnya pada ekosistem mangrove telah ditemukan beberapa genus JPF, di antaranya *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Rhizopus*, dan *Trichoderma* (Mutmainnah, 2024). Namun, kajian mengenai keanekaragaman dan kelimpahan JPF di lahan marginal, seperti kawasan bekas tambang masih terbatas. Padahal, JPF berperan penting dalam meningkatkan stabilitas tanah, yang mendukung pertumbuhan tanaman. Tanah di area bekas tambang umumnya padat dengan permeabilitas rendah, sehingga keberadaan JPF berpotensi memperbaiki tekstur tanah, meningkatkan aerasi, serta mempercepat infiltrasi air. Kondisi ini memungkinkan perkembangan sistem perakaran yang lebih optimal dan mendukung pemulihan ekosistem secara keseluruhan. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi potensi JPF di wilayah PT Vale Indonesia Tbk melalui analisis makroskopis dan mikroskopis, serta mengukur kemampuan isolat jamur dalam melarutkan fosfat. Pendekatan berbasis mikroorganisme lokal diharapkan dapat mempercepat rehabilitasi lahan dengan meningkatkan kualitas tanah dan mendukung keberlanjutan ekosistem. Pemanfaatan JPF sebagai agen bioremediasi juga menawarkan solusi ramah lingkungan melalui aplikasi biofertilizer untuk meningkatkan produktivitas tanah secara berkelanjutan.

1.2 Landasan Teori

Indonesia merupakan negara penghasil nikel terbesar di dunia, dengan cadangan nikel mencapai 52% dari total global. Nikel telah menjadi salah satu komoditas tambang unggulan yang memiliki dampak signifikan terhadap perekonomian nasional, meningkatkan kontribusi sektor pertambangan terhadap Produk Domestik Bruto (PDB) hingga 12,22% pada tahun 2022 (Perwitasari, 2023). Meski berdampak positif bagi perekonomian, aktivitas pertambangan juga menimbulkan dampak negatif yang cukup besar terhadap lingkungan. Proses penambangan terbuka (*open-*

pit mining) mengakibatkan kerusakan ekosistem seperti perubahan topografi lahan, penurunan kualitas tanah, dan degradasi lingkungan yang mendalam, menyebabkan hilangnya lapisan topsoil yang kaya akan nutrisi, serta rusaknya keanekaragaman hayati (Agussalim et al., 2023). Tanah bekas tambang umumnya memiliki pH yang rendah, kandungan logam berat yang tinggi, serta minimnya unsur hara esensial yang diperlukan bagi pertumbuhan vegetasi, yang menjadikan tanah tersebut tidak subur dan sulit untuk mendukung pertumbuhan tanaman baru (Listiyani, 2017).

Kerusakan lingkungan yang terjadi akibat aktivitas penambangan mengharuskan adanya upaya pemulihan yang serius untuk mengembalikan fungsi ekologis dari lahan yang terdegradasi. Salah satu upaya penting dalam pemulihan tanah bekas tambang adalah revegetasi. Revegetasi adalah upaya untuk memperbaiki dan memulihkan vegetasi yang rusak melalui kegiatan penanaman dan pemeliharaan tanaman pada lahan yang terganggu, seperti lahan bekas tambang. Namun revegetasi seringkali tidak cukup jika tidak didukung oleh upaya pemulihan struktur dan komposisi kimia tanah. Mikroorganisme tanah, khususnya jamur pelarut fosfat (JPF), telah menjadi topik penting dalam penelitian ekologi dan bioteknologi karena kemampuannya untuk membantu mengembalikan kesuburan tanah. Jamur pelarut fosfat merupakan kelompok mikroorganisme yang memiliki kemampuan unik untuk melarutkan fosfat dari senyawa yang tidak tersedia dalam tanah menjadi bentuk yang lebih mudah diserap oleh tanaman, sehingga mendukung pertumbuhan tanaman di lingkungan yang miskin fosfat (Whitelaw, 1999).

Fosfat adalah nutrisi penting bagi tanaman karena terlibat dalam banyak fungsi fisiologis utama. Peranan penting dari fosfat diantaranya adalah membantu pembentukan gula melalui siklus Calvin dalam proses fotosintesis, mendukung respirasi seluler yang mengubah glukosa menjadi energi yang berguna dalam bentuk *adenosin trifosfat* (ATP) yang berfungsi sebagai "mata uang energi" dalam tanaman, menopang berbagai aktivitas metabolik seperti pembelahan dan pemanjangan sel, serta fosfat juga sangat penting dalam struktur DNA dan RNA, membentuk kerangka yang memungkinkan replikasi dan ekspresi gen tanaman yang stabil (Khan et al., 2023). Meskipun peran fosfat yang sangat penting, sebagian besar fosfat dalam tanah ada dalam bentuk yang sulit diserap oleh tanaman. Fosfat sering terikat dengan mineral seperti kalsium, besi, dan aluminium, terutama di tanah dengan keasaman tinggi atau kandungan logam berat, seperti yang sering ditemukan di lahan bekas tambang. Keadaan ini membuat tanaman sulit mendapatkan fosfat yang cukup, membatasi pertumbuhannya (Hartono et al., 2022).

Jamur Pelarut Fosfat (JPF) memainkan peran penting dalam hal ini karena mampu menghasilkan asam organik, seperti asam sitrat dan asam oksalat, yang menurunkan pH tanah di sekitar akar tanaman (rizosfer). Asam-asam ini membantu melepaskan fosfat dari mineral-mineral tersebut sehingga bisa diserap oleh tanaman. Penurunan pH ini terjadi karena adanya ion hidrogen (H^+) dari asam organik yang mengubah fosfat yang terikat menjadi bentuk yang lebih tersedia (Raharjo et al., 2007). Proses ini sangat efektif di lingkungan asam dan kaya logam berat, seperti lahan tambang, di mana tanaman biasanya kesulitan menyerap fosfor yang memadai

(Khan et al., 2023). Tak hanya meningkatkan ketersediaan fosfat bagi tanaman, aktivitas JPF juga memperbaiki struktur dan tekstur tanah melalui peningkatan aktivitas mikroba. Penggunaan JPF pada tanah terdegradasi mampu mempercepat proses revegetasi, mendukung kualitas tanah, dan pada akhirnya memperbaiki ekosistem lahan yang rusak (Subhan et al., 2019). JPF bekerja dengan cara mensekresikan enzim fosfatase yang menghidrolisis senyawa fosfat organik dan mengubahnya menjadi bentuk anorganik yang lebih mudah diserap. Selain itu, beberapa spesies JPF juga menghasilkan siderophore, molekul yang mampu mengikat logam berat seperti besi, aluminium, dan mangan, sehingga menurunkan kadar racun di dalam tanah dan memfasilitasi proses fitoremediasi pada lingkungan yang tercemar logam berat (Jyothi et al., 2020). Ini memberikan solusi berkelanjutan dalam meningkatkan kualitas tanah secara alami tanpa harus bergantung pada input kimia sintetis yang dapat merusak lingkungan.

Pendekatan bioteknologi menggunakan jamur pelarut fosfat (JPF) dalam pemulihan tanah bekas tambang telah menjadi topik penting dalam beberapa dekade terakhir, terutama karena keefektifannya dalam mengembalikan kesuburan tanah tanpa harus bergantung pada pupuk kimia sintetis. Tanah bekas tambang, terutama dengan karakteristik asam dan tingginya kandungan logam berat seperti aluminium (Al) dan besi (Fe), mengalami kesulitan dalam mempertahankan ketersediaan fosfat yang esensial bagi pertumbuhan tanaman. JPF, terutama yang berasal dari genus *Aspergillus* dan *Penicillium*, memainkan peran krusial dalam mengatasi tantangan ini melalui mekanisme produksi asam organik, termasuk asam sitrat dan oksalat (Arfarita & Prayogo, 2020). Asam-asam ini berperan dengan menurunkan pH lokal di sekitar rizosfer atau area sekitar akar tanaman, sehingga menciptakan lingkungan yang dapat melarutkan fosfat yang sebelumnya terikat kuat pada mineral-mineral logam berat. Penurunan pH terjadi karena ion hidrogen (H^+) yang dilepaskan oleh asam organik menggantikan posisi fosfat dalam ikatannya dengan logam, yang kemudian menghasilkan ion fosfat yang lebih tersedia bagi tanaman untuk diserap (Subhan et al., 2019).

Efek pelarutan fosfat oleh JPF ini memberikan keuntungan ganda. Selain meningkatkan jumlah fosfat yang tersedia, aktivitas JPF ini juga membantu menyeimbangkan pH tanah bekas tambang yang biasanya asam, sehingga menciptakan kondisi yang lebih kondusif bagi pertumbuhan tanaman secara keseluruhan. Menurut penelitian oleh (Karamoy et al., 2015), penerapan JPF dapat mempercepat pemulihan tanah terdegradasi dengan cara yang lebih ekonomis dan ramah lingkungan. Aktivitas enzimatik dari jamur ini juga dipengaruhi oleh faktor-faktor lingkungan seperti pH, suhu, dan kelembaban tanah. Asnidar et al. (2021) mengemukakan bahwa pH rendah dan suhu berkisar antara 25–28°C dianggap sebagai kondisi optimal yang mendukung produksi asam organik oleh JPF, terutama dalam iklim tropis seperti di Indonesia. Kondisi optimal ini memungkinkan JPF berfungsi dengan efisiensi tinggi dalam menghasilkan asam organik yang mampu menguraikan fosfat terikat dengan logam berat, suatu proses penting bagi keberlanjutan bioremediasi pada lahan bekas tambang di Indonesia.

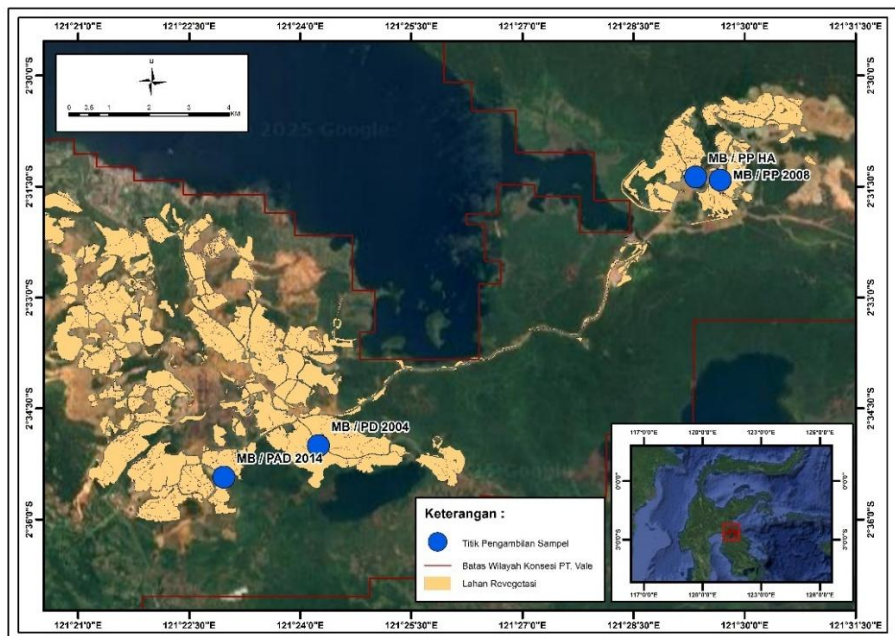
PT Vale Indonesia Tbk merupakan salah satu perusahaan tambang nikel terbesar di Indonesia, telah menginisiasi program rehabilitasi lahan tambang di Sorowako, Sulawesi Selatan. Hingga tahun 2024, PT Vale telah mereklamasi sekitar 3.817 hektar lahan bekas tambang dengan menanam lebih dari 4,8 juta pohon. Perusahaan juga membangun fasilitas persemaian modern seluas 2,5 hektar di Sorowako, yang mampu memproduksi hingga 700.000 bibit per tahun dari lebih dari 65 jenis tanaman, termasuk pohon lokal seperti Eboni (*Diospyros celebica*) dan Dillenia. PT Vale secara aktif merehabilitasi daerah aliran sungai (DAS), dengan total rehabilitasi mencapai 10.280 hektar hingga tahun 2022, baik di dalam maupun di luar wilayah operasional (Vale, 2024). Dalam rangka mempercepat pemulihan lahan, maka dapat memanfaatkan JPF lokal sebagai agen bioteknologi. Melalui penerapan JPF, diharapkan dapat dicapai perbaikan kualitas tanah, peningkatan stabilitas struktur tanah, serta pengurangan kebutuhan pupuk sintetis. Hal ini relevan dengan hasil penelitian oleh Mendes dkk. (2014), yang menunjukkan bahwa revegetasi jangka panjang dengan dukungan mikroorganisme seperti JPF dapat menciptakan habitat yang lebih mendukung bagi perkembangan mikroba tanah lainnya, sehingga membantu menciptakan kondisi ekosistem tanah yang lebih stabil dan mendekati kondisi alami.

Keberhasilan pemanfaatan JPF dalam bioremediasi tanah pasca-tambang tidak terlepas dari interaksi sinergis antara jamur ini dengan tanaman. Penelitian menunjukkan bahwa tanaman pionir yang diperkenalkan di lahan revegetasi memiliki eksudat akar yang kaya akan senyawa organik, yang menjadi sumber nutrisi bagi mikroorganisme di rizosfer dan memfasilitasi aktivitas pelarutan fosfat. Interaksi antara tanaman dan JPF ini membentuk zona hyphosphere yang memperkaya rizosfer dengan mikroorganisme esensial yang mendukung pemulihan hara secara alami (Nurhakim et al., 2020). Interaksi ini sangat penting untuk mendorong pemulihan ekosistem karena tanaman yang ditanam pada lahan tambang tidak hanya memerlukan fosfat tetapi juga nitrogen, kalium, dan mineral lainnya untuk tumbuh dengan baik. Pengembangan biofertilizer berbasis JPF dapat menjadi inovasi dalam praktik pertanian berkelanjutan dan rehabilitasi lahan tambang di masa depan. Potensi biofertilizer ini telah diteliti oleh beberapa ahli yang menunjukkan bahwa aplikasi JPF sebagai biofertilizer mampu meningkatkan ketersediaan fosfat, memperbaiki tekstur dan struktur tanah, serta meningkatkan aktivitas mikroba yang penting dalam siklus nutrisi (Qi & Zhao, 2013). Dengan aplikasi biofertilizer berbasis JPF, diharapkan mampu menurunkan dampak lingkungan yang diakibatkan oleh penggunaan pupuk fosfat sintetis yang berlebihan dan meningkatkan efisiensi pemanfaatan lahan pasca-tambang untuk penggunaan yang berkelanjutan.

BAB II METODE PENELITIAN

2.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Mei – Desember 2024. Pengambilan sampel dilakukan di hutan alam dan lahan revegetasi pada kawasan PT Vale Indonesia Tbk, Sulawesi Selatan. Tahap isolasi, pemurnian, karakterisasi, dan identifikasi dilakukan di Laboratorium Bioteknologi dan Pemuliaan Pohon, Fakultas Kehutanan, dan Laboratorium PKR Mikroba Karst, LPPM, Universitas Hasanuddin.



Gambar 1. Peta Lokasi Pengambilan Sampel Tanah Pada Hutan Alam dan Lahan Revegetasi PT. Vale Indonesia Tbk.

2.2 Alat dan Bahan Penelitian

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah *laminary air flow* (LAF), cawan petri, *autoclaf*, oven, mikro pipet, erlenmeyer, jarum preparat, *beaker glass*, gelas ukur, tabung reaksi, *Hot plate magnetic stirrer*, tabung reaksi, vortex, mikroskop, penggaris, box, timbangan analitik, rak tabung reaksi, tip, bunsen, spatula, *microtube*, kamera, foto box, pemantik api dan alat tulis.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu alkohol 70%, aquades, *handscoon*, *tissue*, *plastic wrapping*, *aluminium foil*, spiritus, label, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (*tricalcium phosphate*), *ammonium sulfate*, NaCl (*sodium chloride*), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (*magnesium sulphate heptahydrate*), KCl (*kalium chloride*), *glucosa*, *yeast extract*, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (*manganese sulfate heptahydrate*), iron (II) $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (*sulfate*

heptahydrate) , agar, aquades, anti biotik *chloramphenicol*, *lactophenol cotton blue* dan sampel tanah.

2.3 Pengambilan Sampel Tanah

Pengambilan sampel telah dilaksanakan di PT. Vale Indonesia Tbk. Sampel tanah diambil dari empat lokasi, yaitu pada Hutan Alam di Plot Petea (PP) dan pada Lahan Revegetasi di Plot Debby (PD 2004), Plot Petea (PP 2008), dan Plot Anoa DSP (PAD 2014) (Gambar 1 dan Gambar 2).



Gambar 2. Pengambilan Sampel Tanah Pada Hutan Alam dan Lahan Revegetasi PT. Vale Indonesia Tbk.

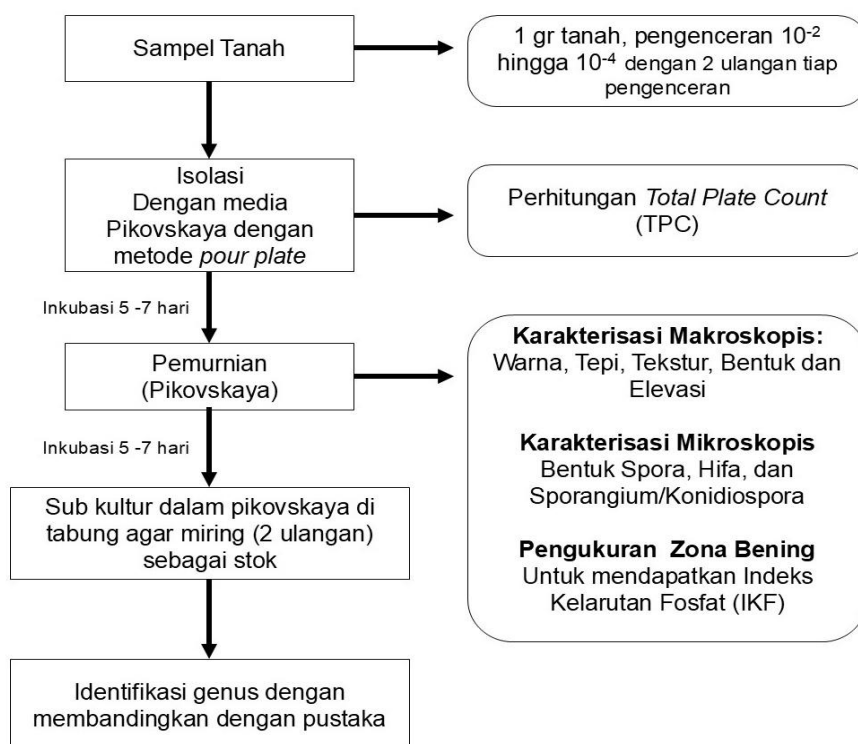
Sampel tanah diambil menggunakan metode *purposive sampling* dari empat lokasi berbeda. Prosedur pengambilan sampel dilakukan di Petak Ukur Permanen (PUP) yang berukuran 20 x 50 m² setiap plot. Sebanyak delapan sampel tanah dikumpulkan dengan masing-masing plot memberikan dua sampel. Penentuan lokasi pengambilan sampel didasarkan pada umur revegetasi untuk mengevaluasi pengaruh waktu terhadap keberadaan JPF. Berikut adalah nama plot pengambilan sampel berdasarkan umur sejak proses revegetasi dilakukan.

Tabel 1. Sampel Tanah di Kawasan PT. Vale Indonesia Tbk.

No.	Kode Sampel	Jumlah Sampel	Umur sejak revegetasi (Tahun)
1	MB / PP Hutan Alam	2	-
2	MB / PD 2004	2	20
3	MB / PP 2008	2	16
4	MB / PAD 2014	2	10

2.4 Alur Penelitian

Alur penelitian ini menggambarkan prosedur yang diterapkan untuk isolasi dan identifikasi mikroorganisme tanah dengan fokus pada Jamur yang memiliki potensi untuk melarutkan fosfat pada tanah (Gambar 3). Penelitian ini menggunakan metode isolasi jamur dengan media Pikovskaya serta teknik *pour plate* yang diharapkan dapat membuat koloni jamur dapat tumbuh lebih banyak pada media. Proses penelitian ini mencakup pengenceran sampel tanah, inkubasi, serta karakterisasi baik makroskopis maupun mikroskopis untuk identifikasi lebih lanjut terhadap mikroorganisme yang ditemukan.



Gambar 3. Alur penelitian JPF Pada Hutan Alam dan Lahan Revegetasi PT. Vale Indonesia Tbk.

Penelitian dimulai dengan pengambilan sampel tanah yang kemudian dilakukan pengenceran pada rasio 10⁻² hingga 10⁻⁴ dengan masing-masing pengenceran dilakukan dalam dua ulangan untuk memastikan hasil yang lebih representatif dan akurat. Sampel tanah yang telah diencerkan selanjutnya diisolasi menggunakan media Pikovskaya dengan metode *pour plate*. Setelah tahap isolasi sampel diinkubasi selama 5 hingga 7 hari. Tahap berikutnya adalah pemurnian JPF yang dilakukan dengan metode *spread plate* pada media pikovskaya yang telah

mengeras. Inkubasi dilakukan kembali selama 5 hingga 7 hari untuk mendukung pertumbuhan yang optimal.

Setelah proses pemurnian, dilakukan identifikasi JPF melalui karakterisasi makroskopis yang mencakup pengamatan terhadap warna, tepi, tekstur, bentuk, dan elevasi koloni JPF yang tumbuh. Selain itu, karakterisasi mikroskopis dilakukan untuk mengamati bentuk spora, hifa, serta sporangium atau konidiospora yang ada pada JPF. Pengukuran zona bening juga dilakukan untuk mendapatkan Indeks Kelarutan Fosfat (IKF) yang merupakan indikator penting untuk menilai kemampuan JPF dalam melarutkan fosfat. Setelah itu, identifikasi genus mikroorganisme dilakukan dengan membandingkan hasil observasi terhadap referensi pustaka yang relevan sehingga dapat diketahui genus dari JPF yang terdapat dalam sampel tanah serta potensi aplikasinya dalam penelitian lebih lanjut.

2.4.1 Pembuatan Media Pikovskaya

Adapun metode dalam pembuatan media agar padat pikovskaya untuk isolasi dan pemurnian JPF, yaitu sebagai berikut:

- Bahan untuk pembuatan media padat pikovskaya (Lampiran 1), ditimbang sesuai kebutuhan.
- Bahan yang telah ditimbang dicampur ke dalam labu erlenmeyer.
- Satu liter aquades ditambahkan kedalam labu erlenmeyer.
- Bahan yang telah ditimbang beserta 1 liter aquades dalam erlenmeyer dihomogenkan menggunakan *Hot Plate Magnetic Stirrer* hingga mendidih.
- Bahan media tersebut disterilisasi menggunakan autoklaf pada tekanan 0,1 MPa dan suhu 121°C selama 20 menit.
- Media yang telah disterilisasi, dikeluarkan dan didinginkan (didiamkan) pada *Laminary Air Flow* hingga hangat-hangat kuku.
- Anti biotik *chloremphenicol* 0,5 g dimasukkan pada media sebelum melakukan penuangan.

2.4.2 Isolasi Jamur Pelarut Fosfat

Adapun teknik isolasi JPF yaitu menggunakan metode tuang (*pour plate method*) bersamaan dengan pembuatan dan penuangan media *Pikovskaya* pada cawan petri dengan tingkat pengenceran 10^{-2} sampai 10^{-4} dengan melakukan 2 kali pengulangan menggunakan prosedur sebagai berikut:

- Satu gram sampel tanah ditimbang dan dimasukkan ke dalam sembilan ml akuades steril dengan menggunakan tabung reaksi, kemudian dihomogenkan menggunakan *vortex*.
- Deret pengenceran dibuat berurutan dari 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , dan 10^{-4}
- 1 ml larutan dari pengenceran 10^{-2} , 10^{-3} , dan 10^{-4} masing-masing diambil menggunakan mikropipet dan secara aseptik dituang ke dalam cawan petri bersamaan dengan penuangan media *Pikovskaya* yang telah didiamkan tadi

menggunakan metode *pour plate*, ratakan hingga larutan merata di seluruh permukaan cawan.

- d. Hasil isolasi pada media *Pikovskaya* didiamkan hingga mengeras lalu di tutup rapat menggunakan *plastic wrap*.
- e. Setiap cawan petri diberi label sesuai dengan besar pengenceran, selanjutnya di inkubasi pada suhu kamar selama 3-7 hari.
- f. Koloni yang tumbuh pada setiap pengenceran di media *Pikovskaya* dihitung jumlah koloninya dan diamati berdasarkan warna atau bentuk koloni.

2.4.3 Perhitungan TPC (*Total Plate Count*)

Pengujian TPC dilakukan dengan menghitung adanya pertumbuhan koloni mikroorganisme yang tumbuh pada suatu media yang dibuat dengan cara tuang (*pour plate*). Menurut SNI 2897:2008, jika jumlah koloni <25 koloni, maka perhitungan jumlah populasi jamur pada cawan diambil pada tingkat pengenceran terendah (10^{-2}), kemudian jumlah rata-rata koloni dari 2 ulangan pengenceran tersebut dikalikan dengan faktor pengenceran dan diberi tanda (*) jika kurang dari jumlah koloni 25-250. Rumus dari perhitungan total jumlah koloni (TPC), yaitu:

$$\text{Nilai TPC} = \text{Jumlah Rata - Rata Koloni} \times \frac{1}{10^{-2}}$$

2.4.4 Pemurnian Jamur Pelarut Fosfat

Adapun prosedur yang dilakukan pada pemurnian JPF, yaitu:

- a. Media *Pikovskaya* dituang secara aseptik ke dalam cawan petri steril, digoyang/geser hingga permukaan media merata, dan didiamkan hingga mengeras lalu di-*wrapping*.
- b. Koloni hasil isolasi dipindahkan dari media isolasi ke media pemurnian untuk melihat zona bening dengan lebih jelas
- c. Secara aseptik koloni yang telah dipilih diambil menggunakan jarum preparat, dan digoreskan pada media *Pikovskaya*, kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 3-7 hari.
- d. Beri kode atau label isolat pada setiap isolat dan simpan di tempat dengan suhu kamar.

2.4.5 Pengukuran Zona Bening

Adapun metode dalam melakukan Pengukuran zona bening pada JPF yaitu:

- a. Media *pikovskaya* dimasukkan dalam cawan petri dan dibiarkan mengeras.
- b. Tiap isolat ditumbuhkan pada media uji dengan metode *spot inoculation* dan di inkubasi selama 7 hari.
- c. Koloni yang tumbuh dan mampu membentuk zona bening diindikasikan sebagai isolat yang mampu melarutkan fosfat (kualitatif).

- d. Pengukuran zona bening yang terbentuk dilakukan dengan menggunakan penggaris milimeter. Aktivitas mikroba diperoleh dengan mengukur zona bening pada media padat dan menjadi petunjuk ada atau tidaknya mikroorganisme yang tumbuh pada setiap perlakuan pada sekitar isolat.
- e. Berdasarkan zona bening dapat diketahui indeks kelarutan fosfat (diameter zona bening/diameter koloni).

2.4.6 Perhitungan Indeks Kelarutan Fosfat

Berdasarkan hasil pengukuran, perhitungan indeks kelarutan fosfat dengan menggunakan rumus oleh Sharon et al. (2016).

$$\text{Indeks Pelarut Fosfat} = \frac{\text{diameter koloni} + \text{diameter Zona Bening}}{\text{diameter koloni}}$$

Standar indeks pelarut fosfat berdasarkan Marciano Marra et al. (2011)

IPF kategori rendah : < 2.00

IPF kategori sedang : > 2.50

IPF kategori tinggi : > 4.00

2.4.7 Pengamatan Makroskopis dan Mikroskopis

Identifikasi makroskopis dilakukan dengan mengamati karakteristik masing-masing isolat jamur diantaranya warna, ukuran diameter koloni, diameter zona bening, bentuk, tekstur, elevasi, dan tepi koloni. Sedangkan pada identifikasi mikroskopis dilakukan dengan mengamati bentuk, hifa, sporangium dan konidiospora dengan menggunakan mikroskop. Spora yang digunakan dapat diambil dari hasil isolasi jamur sebelumnya yang telah dimurnikan. Pertama, kaca objek dibersihkan terlebih dahulu menggunakan alkohol 70%, kemudian spora hasil isolasi jamur diambil menggunakan ose dan diletakkan diatas kaca objek. Kemudian diberi setetes *lactophenol cotton blue* di atasnya, lalu ditutup menggunakan kaca penutup dan diamati bentuk serta panjang spora di bawah mikroskop. Identifikasi makroskopis dan mikroskopis dilakukan dengan mencocokkan karakteristik jamur yang diperoleh dari hasil pengamatan dengan buku identifikasi *Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi* dari Watanabe (2002).

