

Isolasi, Populasi, dan Karakterisasi Bakteri *Rhizobium* pada Daerah Perakaran dan Tanah dari Bengkulu, Sumatra

Sri Purwaningsih

Bidang Mikrobiologi, Puslit Biologi-LIPI, Bogor

Abstract

A study was conducted in order to know the isolation, population and characterization of *Rhizobium* bacteria on the soil and rhizosphere plant from Bengkulu, Sumatra. The purpose of the study to know the population of *Rhizobium* bacteria from rhizosphere plant, and the get pure culture. The sample was taken from 25 sample soil from rhizosphere of plant. Isolation was done in *Rhizobium* standart medium (YEMA) and the population was done with plate count methods. Incubation in room temperature of 27-28° C, after 7 days. The results showed that the population of *Rhizobium* bacteria the range 18-87 X 10⁵ CFU/g soil. The highest population from the rhizosphere of *Zea mays* plant. Seventy five gave of pure culture. The growth characteristic the culture pure was observed by using YEMA medium mixed respectively with Brom Thymol Blue and Congo Red as indicators. Seventy five gave of culture pure, nine isolates can be grouped slow growing, while sixty six can be grouped as fast growing.

Key words: Isolation, population , characterization YEMA medium, Rhizobium

Pendahuluan

Bengkulu merupakan salah satu Propinsi di Sumatra yang berbatasan langsung dengan Samudra India, bagian Barat merupakan dataran rendah yang sempit, sedangkan bagian Timur merupakan dataran tinggi yang berbukit-bukit dan subur. Kawasan seperti ini memiliki nilai keanekaragaman hayati yang cukup tinggi. Usaha untuk menggali sumber daya hayati sudah banyak dilakukan, namun untuk jenis mikrobya, terutama mikroba tanah belum banyak informasi yang diungkapkan, sehingga perlu dilakukan eksplorasi mengenai jenis mikroba tersebut diatas, terutama jenis bakteri tanahnya.

Pengetahuan dan peningkatan kesuburan tanah dan produktivitas lahan di kawasan Bengkulu perlu didukung data dan informasi tentang bakteri tanah yang ada di kawasan tersebut terutama bakteri penambat nitrogen (bakteri *Rhizobium*). Bakteri *Rhizobium* merupakan jasad renik yang bersimbiosis dengan tanaman leguminosa yang berfungsi menambat N₂ yang melimpah di udara (Allen & Allen, 1981) Peran utama bakteri *Rhizobium* adalah menfiksasi nitrogen dengan adanya aktivitas nitrogenase. Tinggi rendahnya aktivitas nitrogenase menentukan banyak sedikitnya pasokan ammonium yang diberikan *Rhizobium* kepada tanaman. Semakin aktif nitrogenase makin banyak pasokan nitrogen bagi tanaman, sehingga dapat memperbaiki pertumbuhan tanaman (Young *et al.*, 1990; Hammerschmidt dan Smith-becker, 1999). Penambatan nitrogen secara biologis diperkirakan menyumbang lebih dari 170 juta ton nitrogen ke biosfer per tahun, 80% diantaranya merupakan hasil simbiosis antara bakteri *Rhizobium* dengan tanaman leguminosa (Peoples *et al.*, 1997 dalam Prayitno *et al.*, 2000). Dalam lingkungan yang memenuhi persyaratan tumbuh, simbiosis yang terjadi mampu memenuhi 50% atau bahkan seluruh kebutuhan N tanaman yang bersangkutan dengan cara menambat nitrogen bebas (Saono, 1981). Selain itu *Rhizobium* yang bereaksi dengan tanaman legum mampu menfiksasi 100-300 kg/ha dalam satu musim tanam dan meningkatkan sejumlah N untuk tanaman berikutnya. Bakteri *Rhizobium* ini merupakan mikroba simbiotik yang mempunyai prospek di bidang pertanian dan kehutanan, yang mempunyai peranan sebagai biofertilizer, sehingga dapat meningkatkan efisiensi penggunaan pupuk sintetik, yang akhirnya sangat menunjang system pertanian yang berwawasan lingkungan. Permasalahan yang perlu diperhatikan adalah efisiensi inokulan *Rhizobium*

untuk jenis tanaman tertentu. Tanggapan tanaman sangat tergantung pada kondisi tanah dan efektivitas populasi asli (Sutanto, 2002) Selain itu faktor jenis tanah, reaksi pH, faktor lingkungan juga sangat berpengaruh (Sprent, 1976)

Sebagai upaya untuk mengetahui keberadaan bakteri *Rhizobium* tersebut diatas, maka dilakukan inventarisasi dan isolasi bakteri tersebut, dengan harapan akan didapatkan bakteri yang potensial, yang nantinya dapat dikembangkan sebagai pupuk hayati guna meningkatkan kesuburan tanah.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui keberadaan bakteri *Rhizobium*, dan untuk mendapatkan isolat murni yang potensial, yang nantinya dapat dikembangkan sebagai pupuk hayati guna meningkatkan kesuburan tanah, terutama di daerah Bengkulu.

Materi dan Metode

Sampel tanah dari kedua desa tersebut diatas dilakukan isolasi. Media yang digunakan untuk isolasi bakteri *Rhizobium* adalah media YEMA (Yeast Ekstrak Mannitol Agar) (Vincent, 1970) yang terdiri atas K_2HPO_4 0,5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,2 g, NaCl 0,1 g, $CaCO_3$ 3 g, Mannitol 10 g, Yeast Extract 3 g, Agar 20 g, Aquadest 1000 ml, dengan pH 6,8.

Isolasi dilakukan dengan cara pengenceran, sebanyak 1 g sampel tanah dimasukkan dalam 9 ml larutan garam fisiologis (NaCl 0,85%) dalam tabung reaksi kecil, kemudian divortek, dibuat seri pengenceran dengan cara memipet larutan sebanyak 1 ml dimasukkan kedalam 9 ml larutan NaCl 0,85%, dan seterusnya sampai diperoleh seri pengenceran 10^{-1} – 10^{-7} , dipipet 0,1 ml dituangkan dalam petridish yang telah berisi media YEMA tersebut diatas, dan diratakan dengan spatula, kemudian diinkubasikan pada suhu kamar ($27-28^\circ C$), setiap hari diamati pertumbuhannya dan dihitung jumlah koloninya. Penghitungan jumlah koloni dilakukan dengan metode cawan hitung (*plate count*) (Lay, 1994). Isolat yang didapat dipindahkan dalam media miring, kemudian dimurnikan sampai mendapatkan isolat yang murni (yang terdiri dari 1 koloni).

Pemurnian dilakukan dengan cara koloni diambil dengan Ose (1 Ose) dimasukkan dalam aquadest steril dalam tabung reaksi kecil (5 ml), kemudian divortek, dipipet 0,1 ml dimasukkan dalam petridish yang berisi media YEMA, diratakan dengan spatula, kemudian diinkubasikan pada suhu kamar ($27-28^\circ C$), koloni yang tumbuh (single koloni) ditanam dalam media YEMA miring dalam tabung reaksi (sebagai kultur murni).. Untuk pengujian karakterisasi isolat bakteri *Rhizobium* ditumbuhkan dalam media selektif yang dibuat dengan cara memodifikasi media dasar (YEMA) dengan penambahan beberapa jenis pewarna sebagai indikator yaitu Congo Red dan Brom Thymol Blue (Somasegaran, 1984) kemudian diamati pertumbuhan dan perubahan warnanya.

Hasil dan Pembahasan

Populasi bakteri *Rhizobium* yang didapat sangat bervariasi pada masing-masing perakaran tanaman. Sampel tanah dan perakaran dari desa Suro Muncang, Kecamatan Ujan Mas, Kabupaten Kapahiang, Propinsi Bengkulu sebanyak 15 sampel. Populasi bakteri *Rhizobium* berkisar antara $18 - 61 \times 10^5$ CFU/g, tertinggi pada sampel tanah dari perakaran tanaman Melinjo (*Gnetum gnemon*) (Tabel 1).

Sampel tanah dari desa Bukit Peninjauan, Kecamatan Sukaraja, Kabupaten Seluma, Propinsi Bengkulu sebanyak 10 sampel. Populasi bakteri *Rhizobium* berkisar antara $38 - 87 \times 10^5$ CFU/g, tertinggi pada sampel tanah dari perakaran tanaman Jagung (*Zea mays*) (Tabel 2).

Dilihat dari keseluruhan populasi bakteri *Rhizobium* pada beberapa perakaran tanaman (Tabel 1 dan 2) menunjukkan bahwa populasi bakteri *Rhizobium* termasuk kurang, hal ini menunjukkan bahwa kondisi tanah di daerah tersebut diatas termasuk kurang subur, karena tanah pertanian yang subur mengandung lebih dari 100 juta mikroba per gram tanah. Berbagai bakteri penambat nitrogen telah banyak diisolasi dari rhizosfer dan rhizoplane tanaman non leguminosae, namun efisiensi penambatan nitrogen masih rendah, hal ini mungkin disebabkan karena bakteri *Rhizobium* yang hidup di daerah rhizosfer harus berkompetisi dengan mikroba tanah yang lain untuk mendapatkan eksudat

yang dapat digunakan untuk kelangsungan hidupnya (Kirchhof *et al.*, 1997; James *et al.*, 2001). Selain itu Alexander (1977) mengemukakan bahwa jumlah bakteri di daerah perakaran tanaman melimpah hingga 10^9 sel per gram tanah daerah perakaran.

Tabel 1. Populasi bakteri *Rhizobium* dari desa Suro Muncang, Kecamatan Ujan Mas, Kabupaten Kapahiang, Propinsi Bengkulu.

Table 1. Population of *Rhizobium* bacteria from Suro Muncang Village, District of Ujan Mas, Kapahiang Regency, Bengkulu Province

No sampel	perakaran tanaman	Populasi bakteri <i>Rhizobium</i> (CFU X 10^5)/g tanah	
		bakteri <i>Rhizobium</i>	jumlah isolat
1 BKL	Jagung (<i>Zea mays</i>)	39	3
2 BKL	Pisang (<i>Musa paradisiaca</i>)	46	3
3 BKL	Singkong (<i>Manihot utilissima</i>)	33	3
4 BKL	Alpukat (<i>Persia americana</i> Mill)	52	3
5 BKL	Jeruk (<i>Citrus</i> sp.)	31	3
6 BKL	Kedondong (<i>Spondias</i> sp.)	18	3
7 BKL	Merica (<i>Piper nigrum</i>)	27	3
8 BKL	Melinjo (<i>Gnetum gnemon</i>)	61	3
9 BKL	Gamal (<i>Glyciridia</i> sp.)	25	3
10 BKL	Buncis (<i>Vigna sinensis</i>)	44	3
11 BKL	Kopi (<i>Coffea</i> sp.)	49	3
12 BKL	Pepaya (<i>Carica papaya</i>)	38	3
13 BKL	Dadap (<i>Erythrina</i> sp.)	59	3
14 BKL	Padi (<i>Oryza sativa</i>)	44	3
15 BKL	Hutan lindung Saba Penanjung	37	3

Tabel 2. Populasi bakteri *Rhizobium* dari desa Bukit Peninjauan, Kecamatan Sukaraja, Kabupaten Seluma, Propinsi Bengkulu.

Table 2. Population of *Rhizobium* bacteria from Bukit Paninjauan Village, District of Sukaraja, Kapahiang Seluma, Bengkulu Province

No sampel	perakaran tanaman	populasi bakteri <i>Rhizobium</i> (CFU X 10^5)/g tanah	
		bakteri <i>Rhizobium</i>	jumlah isolat
16 BKL	Padi (<i>Oryza sativa</i>)	76	3
17 BKL	Jagung (<i>Zea mays</i>)	87	3
18 BKL	Semangka (<i>Citrullus lanatus</i>)	47	3
19 BKL	Lamtoro (<i>Leucaena leucocephala</i>)	62	3
20 BKL	Pisang (<i>Musa paradisiaca</i>)	69	3
21 BKL	tanpa tanaman	38	3
22 BKL	Kelapa sawit (<i>Elais guinensis</i>)	67	3
23 BKL	Ubi jalar (<i>Ipomea batatas</i>)	52	3
24 BKL	Karet (<i>Hevea brasiliensis</i>)	75	3
25 BKL	Singkong (<i>Manihot utilissima</i>)	64	3

Apabila dibandingkan antar jenis tanaman populasinya sangat bervariasi, adanya perbedaan populasi antar marga dan spesies tanaman tersebut mungkin disebabkan karena aktivitas metabolisme akar dari masing-masing tanaman berbeda, yang menyebabkan perbedaan komposisi eksudat. Komposisi eksudat yang berbeda ini yang akan menentukan populasi bakteri pada daerah perakaran. Seperti pada hasil penelitian Stolassa dan Ernest (1905) dalam Waksman (1952) bahwa populasi bakteri pada daerah perakaran tanaman semuanya jauh lebih banyak dari pada tanaman biji-bijian, 1 gram tanah dari perakaran tanaman mengandung 7 sampai 8 juta bakteri, sedangkan pada

tanaman Barley mengandung 5 sampai 6 juta dan tanaman gula beets 1 sampai 2 juta. Penelitian ini juga ditunjang oleh hasil penelitian Hoffman (1914) dalam Waksman (1952) bahwa 27 dari 32 sampel tanah permukaan sekitar perakaran tanaman mempunyai populasi bakteri lebih banyak dibandingkan dengan tanah di dalam dan di luar perakaran. Selain itu faktor kesuburan tanah, kandungan O₂, unsur hara, serta faktor fisik dan biologi tanah juga mempengaruhi populasi bakteri tanah (Sprent, 1976).

Tabel 3. Pertumbuhan bakteri *Rhizobium* pada media selektif pada sampel tanah dari desa Suro Muncang, Kecamatan Ujan Mas, Kabupaten Kapahiang, Propinsi Bengkulu

Table 3. Growth of Rhizomium on selective media isolated from soil samples at Suro Muncang Village, District of Ujan Mas, Kapahiang Regency, Bengkulu Province

Nomor isolat	YEMA	YEMA + CR	YEMA + BTB
1 BKLY(1)	++	Merah Muda	Kuning
1 BKLY (2)	+++	Merah Muda	Kuning
1 BKLY (3)	++	Merah Muda	Kuning
2 BKLY (1)	++	Merah Muda	Kuning
2 BKLY (2)	++	Merah Muda	Kuning
2 BKLY (3)	+++	Merah Muda	Kuning
3 BKLY (1)	+	Merah Muda	Biru
3 BKLY (2)	++	Merah Muda	Kuning
3 BKLY (3)	+++	Merah Muda	Kuning
4 BKLY (1)	+++	Merah Muda	Kuning
4 BKLY (2)	++	Merah Muda	Kuning
4 BKLY (3)	++	Merah Muda	Kuning
5 BKLY (1)	+	Merah Muda	Biru
5 BKLY(2)	++	Merah Muda	Kuning
5 BKLY(3)	+++	Merah Muda	Kuning
6 BKLY (1)	+++	Merah Muda	Kuning
6 BKLY (2)	++	Merah Muda	Kuning
6 BKLY (3)	+++	Merah Muda	Kuning
7 BKLY (1)	++	Merah Muda	Kuning
7 BKLY (2)	++	Merah Muda	Kuning
7 BKLY (3)	++	Merah Muda	Kuning
8 BKLY(1)	+	Merah Muda	Biru
8 BKLY (2)	+++	Merah Muda	Kuning
8 BKLY (3)	+++	Merah Muda	Kuning
9 BKLY (1)	++	Merah Muda	Kuning
9 BKLY (2)	++	Merah Muda	Kuning
9 BKLY (3)	++	Merah Muda	Kuning
10 BKLY (1)	+++	Merah Muda	Kuning
10 BKLY (2)	++	Merah Muda	Kuning
10 BKLY (3)	+	Merah Muda	Biru
11 BKLY (1)	++	Merah Muda	Kuning
11 BKLY (2)	+++	Merah Muda	Kuning
11 BKLY (3)	++	Merah Muda	Kuning
12 BKLY (1)	++	Merah Muda	Kuning
12 BKLY (2)	+	Merah Muda	Biru
12 BKLY (3)	+++	Merah Muda	Kuning
13 BKLY(1)	++	Merah Muda	Kuning
13 BKLY (2)	++	Merah Muda	Kuning
13 BKLY (3)	+++	Merah Muda	Kuning
14 BKLY (1)	+	Merah Muda	Biru
14 BKLY (2)	++	Merah Muda	Kuning

14 BKLY (3)	++	Merah Muda	Kuning
15 BKLY (1)	+++	Merah Muda	Kuning
15 BKLY (2)	++	Merah Muda	Kuning
15 BKLY (3)	+++	Merah Muda	Kuning

Tabel 4. Pertumbuhan bakteri *Rhizobium* pada media selektif pada sampel tanah dari desa Bukit Peninjauan, Kecamatan Sukaraja, Kabupaten Seluma, Propinsi Bengkulu.

Table 4. Growth of *Rhizobium* on selective media isolated from soil samples at Bukit Paninjauan Village, District of Sukaraja, Seluma Regency, Bengkulu Province

Nomor isolat	YEMA	YEMA + CR	YEMA + BTB
16 BKLY (1)	++	Merah Muda	Kuning
16 BKLY (2)	++	Merah Muda	Kuning
16 BKLY (3)	++	Merah Muda	Kuning
17 BKLY (1)	+++	Merah Muda	Kuning
17 BKLY (2)	+++	Merah Muda	Kuning
17 BKLY (3)	+	Merah Muda	Biru
18 BKLY (1)	+++	Merah Muda	kuning
18 BKLY (2)	++	Merah Muda	Kuning
18 BKLY (3)	++	Merah Muda	Kuning
19 BKLY (1)	+++	Merah Muda	Kuning
19 BKLY (2)	+++	Merah Muda	Kuning
19 BKLY (3)	+++	Merah Muda	Kuning
20 BKLY (1)	+++	Merah Muda	Biru
20 BKLY (2)	++	Merah Muda	Kuning
20 BKLY (3)	++	Merah Muda	Kuning
21 BKLY (1)	++	Merah Muda	Kuning
21 BKLY (2)	+	Merah Muda	Biru
21 BKLY (3)	++	Merah Muda	Kuning
22 BKLY (1)	+++	Merah Muda	Kuning
22 BKLY (2)	++	Merah Muda	Kuning
22 BKLY (3)	++	Merah Muda	Kuning
23 BKLY (1)	++	Merah Muda	Kuning
23 BKLY (2)	+++	Merah Muda	Kuning
23 BKLY (3)	++	Merah Muda	Kuning
24 BKLY (1)	+	Merah Muda	Biru
24 BKLY (2)	++	Merah Muda	Kuning
24 BKLY (3)	++	Merah Muda	Kuning
25 BKLY (1)	+++	Merah Muda	Kuning
25 BKLY (2)	++	Merah Muda	Kuning
25 BYLY (3)	+++	Merah Muda	Kuning

Keterangan: + = kurang subur
 ++ = subur
 +++ = sangat subur

YEMA = Yeast Ekstrak Mannitol Agar
 CR = Congo Red
 BTB = brom Thymol Blue

Setelah dilakukan pemurnian didapatkan isolat bakteri *Rhizobium* sebanyak 75 isolat murni. Dari 75 isolat bakteri *Rhizobium*, 10 isolat pertumbuhannya kurang subur yang ditandai (+), 41 isolat pertumbuhannya subur yang ditandai (++) dan 24 isolat pertumbuhannya sangat subur yang ditandai (+++). Setelah dilakukan karakterisasi menunjukkan bahwa dalam media YEMA yang ditambah Congo Red semuanya berwarna merah muda yang berarti tidak menyerap warna merah dari indikator Congo Red, keadaan ini menunjukkan cirikas dari bakteri *Rhizobium*. Seperti yang dikatakan oleh

Soekartadiredja (1992) bahwa salah satu cirikas bakteri *Rhizobium* tidak meyerap warna merah pada media yang mengandung Congo Red. Dari 75 isolat dalam media YEMA yang ditambah dengan Brom Thymol Blue menunjukkan bahwa 9 isolat termasuk dalam kelompok tumbuh lambat (slow growing) yang ditandai dengan perubahan warna menjadi biru, sedangkan 66 isolat termasuk dalam kelompok tumbuh cepat (*fast growing*) yang ditandai perubahan warna menjadi kuning.

Kesimpulan

Hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa jumlah bakteri *Rhizobium* pada kedua desa sangat bervariasi. Jumlah bakteri berkisar antara $18-87 \times 10^5$ CFU/g tanah. Setelah dikarakterisasi dari 75 isolat yang didapat, 10 isolat tumbuh kurang subur, 41 isolat tumbuh subur dan 24 isolat tumbuh sangat subur. Dalam media YEMA yang ditambah Brom Thymol Blue menunjukkan bahwa 9 isolat termasuk dalam kelompok tumbuh lambat (slow growing) yang ditandai dengan perubahan warna menjadi biru, sedangkan 66 isolat termasuk dalam kelompok tumbuh cepat (fast growing) yang ditandai perubahan warna menjadi kuning.

Daftar Pustaka

- Alexander. M., 1977. Soil Microbiology. 2nd ed. John Wiley and Sons Inc, New York. 472p.
- Allen. O.N and E. K. Allen., 1981. The Leguminosae. The University of Winconsin Press, Madison. 812 p.
- Hammerschmidt. R and J.A. Smith-Becker. 1999. The role of salicylic acid in disease resiatence. In agrawal, A.A. S. Tuzun and E. Bent (Eds) induced plant defenses against pathogen and herbivores: Biochemistry, ecology & agriculture pp,37-53.
- James. E.K, f.L. Olivers, A.L.M. de Oliviera, F.B. dos Reis. J.R., L.G. da silva and V.M. Reis.2001. Further observations on the interaction between sugarcance and Gluconacetobacter diazotrophicus under laboratory and greenhouse condition. Jurnal of Experimental Botani 52,547-760.
- Kirchhof. G., V.M. reis., J.L. badani., B. Eckert., J. dobreiner and a. Hartman. 1997. Accurrence, physiological and molekuler analysis of endophitic diazotrophic bacteria in gramineous. Plant and Soil 194, 45-55.
- Lay. B.W. 1994. Analisis Mikroorganisme di Laboratorium. P.T. Raja Grafindo Persada. 168 h.
- Prayitno. J., J.J. Weinman., M.A. Djordjevic & B.G. Rolfe. 2000. Pemanfaatan Protein Pendar Hijau (Green Fluorescent Protein) Untuk Mempelajari Kolonisasi Bakteri *Rhizobium*. Prosiding Seminar Nasional Biologi XVI h, 272-377.
- Saono. S. 1981. Mikrobiologi di Indonesia. Kumpulan Makalah Konggres Nasional Mikrobiologi III, Jakarta pp; 348-354.
- Sprent, J.L. 1976. Symbiotic Nitrogen Fixation in Plant. P.S. Nutman (Ed). Combridge. Univ. Press, Combridge 584 p.
- Soekartadiredja. E.M. 1992. Perubahan Inefektivitas dan Efektivitas Penambatan pada galur *Rhizobium* setelah perlakuan pasasi in Vivo. Thesis. Univ. Padjadjaran. 231 h.
- Somasegaran. P and H.J. Hoben. 1984. Methods in legume *Rhizobium* Technology. University of Hawaii. NIFTAL. Project and Mircen. 387 h.
- Sutanto. R. 2002. Penerapan Pertanian Organik. Kanisius, Yogyakarta.
- Young. C.C., C.L. Chen & C.C. Chao. 1990. Effect of *Rhizobium*, vesicular arbuscular mycorrhiza and phosphate solubilizing bacteria on yield and mineral phosphorus

uptake of crops in subtropical-tropical soils. Trans Int. Congr. Soil. Sci. 14th August 12-18. 1990. Kyoto, Japan. p: 55-60.

Vincent. J.M. 1970. A Manual of the Practical study of the root Nodule Bacteria International Biological Programme. London. Handbook No 15. 164 p.

Waksman. S.A. 1952. Soil Microbiology. John Wiley and Sons. Inc, New York, London.