

67 1516 / 1989 / 020



**PENYIAPAN BIAKAN BAKTERI BINTIL AKAR  
SEBAGAI INOKULUM DALAM BAHAN PEMBAWA GAMBUT  
SUATU STUDI KASUS DI LABORATORIUM  
MIKROBIOLOGI FAKULTAS PERTANIAN  
UNIVERSITAS GAJAH MADA YOGYAKARTA**

*o Hict cipta milik IPB University*

**INA RETNOWATI**



**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
INSTITUT PERTANIAN BOGOR  
1989**

Halaman ini merupakan bagian dari dokumen yang diterbitkan oleh Institut Pertanian Bogor. Untuk informasi lebih lanjut, silakan kunjungi situs web kami di [www.ipb.ac.id](http://www.ipb.ac.id).  
Dilarang menyalin atau memperbanyak isi dokumen ini tanpa izin tertulis dari Institut Pertanian Bogor.  
Penelitian ini merupakan bagian dari penelitian yang sedang berlangsung di Institut Pertanian Bogor.  
Ditandatangani dan diterbitkan oleh Institut Pertanian Bogor pada tanggal 15 Mei 1989.

**IPB University**

Publikasi milik IPB University

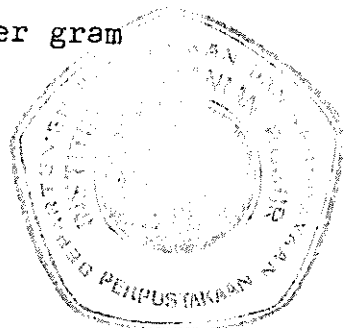
## RINGKASAN

INA RETNOWATI. Penyiapan Biakan Bakteri Bintil Akar sebagai Inokulum dalam Bahan Pembawa Gambut, Suatu Studi Kasus di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Pertanian, Universitas Gajah Mada, Yogyakarta (Di bawah bimbingan TEDJA IMAS dan YADI SETIADI).

Tujuan praktek lapang ini adalah untuk lebih mengetes seluk beluk kegiatan penyiapan inokulum di Indonesia, khususnya di Universitas Gajah Mada sebagai produsen. Kegiatan ini dilakukan selama satu bulan.

Galur bakteri bintil akar yang digunakan sebagai inokulum dalam pembuatan inokulan Legum kedelai diisolasi dari sejumlah varietas kedelai setempat dan impor yang ditanam di suatu daerah sekitar Yogyakarta. Ada sepuluh galur yang diperoleh dari hasil seleksi yang diduga efektif, dan kesepuluh galur ini yang digunakan sebagai inokulum. Oleh karena itu inokulum ini disebut juga sebagai inokulum multigalur.

Untuk memperbanyak biakan bakteri digunakan sistem pertumbuhan bifase yang terdiri dari dua lapis medium yaitu medium padat dan cair dengan perbandingan 3 : 1. Sebagai medium digunakan manitol-ekstrak khamir dengan kandungan agar 1.5 persen. Jumlah bakteri bintil akar yang diinokulasikan ke dalam gambut adalah  $10^9$  sel per gram gambut.



PENYIAPAN BIAKAN BAKTERI BINTIL AKAR  
SEBAGAI INOKULUM DALAM BAHAN PEMBAWA GAMBUT  
SUATU STUDI KASUS DI LABORATORIUM  
MIKROBIOLOGI FAKULTAS PERTANIAN  
UNIVERSITAS GAJAH MADA YOGYAKARTA

INA RETNOWATI

Laporan Praktek Lapang  
sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Biologi  
pada  
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Institut Pertanian Bogor

JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
INSTITUT PERTANIAN BOGOR  
BOGOR  
1989



: PENYIAPAN BIAKAN BAKTERI BINTIL AKAR  
SEBAGAI INOKULUM DALAM BAHAN PEMBAWA  
GAMBUT, SUATU STUDI KASUS DI LABORATO-  
RIUM MIKROBIOLOGI FAKULTAS PERTANIAN  
UNIVERSITAS GAJAH MADA YOGYAKARTA

Nama Mahasiswa : INA RETNOWATI  
NIM : G20.1464

Menyetujui

Ir. Tedja Imas  
Pembimbing I

Ir. Yadi Setiadi M.S  
Pembimbing II

Mengetahui

drh. Ikin Mansjoer, M.Sc.  
Ketua Jurusan Biologi

Tanggal Lulus: 9 Juni 1988 dan 13 September 1989

LAPORAN PRAKTEK LAPANG

Judul

: PENYIAPAN BIAKAN BAKTERI BINTIL AKAR  
SEBAGAI INOKULUM DALAM BAHAN PEMBAWA  
GAMBUT, SUATU STUDI KASUS DI LABORATO-  
RIUM MIKROBIOLOGI FAKULTAS PERTANIAN,  
UNIVERSITAS GAJAH MADA, YOGYAKARTA


Nama Mahasiswa : INA RETNOWATI

Nomor Pokok : G20.1464

Menyetujui,

Ir. Tedja Imas

Pembimbing I

  
Ir. Yadi Setiadi M.S

Pembimbing II

Mengetahui,

Drh. Ikin Mansjoer M.Sc.

Ketua Jurusan Biologi

Dr. Ir. Ratna S Hadioetomo

Panitia Praktek Lapang

Tanggal Pelaksanaan Ujian :

## RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan pada 1 Nopember 1964 di Jakarta, sebagai anak keempat dari enam bersaudara. Orang tua bernama Rusmiyati dan Mirat Suparno.

Pada tahun 1976 lulus dari Sekolah Dasar Negeri Kebon Baru Jakarta, tahun 1980 lulus dari Sekolah Menengah Pertama Negeri 6 Bogor dan tahun 1983 lulus dari Sekolah Menengah Atas Negeri 1 Bogor, Jawa Barat.

Melalui Proyek Perintis II pada tahun 1983, penulis diterima di IPB dan tahun berikutnya memasuki Jurusan Biologi, FMIPA, dengan memilih Sub bidang keahlian Mikrobiologi.



## KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT yang telah melimpahkan karunia kekuatan dan kesabaran sehingga penulis dapat menyusun serta menyelesaikan laporan praktek lapang ini.

Tulisan ini disusun berdasarkan hasil-hasil penelaahan mengenai penyiapan inokulum bakteri bintil akar dalam paket Legin di Universitas Gajah Mada, Yogyakarta, yang dilaksanakan dari tanggal 10 Maret sampai dengan 3 April 1987.

Pada kesempatan ini penulis menyampaikan rasa terimakasih yang sebesar-besarnya kepada Ir. Tedja Imas dan Ir. Yadi Setiadi, M.S selaku pembimbing, Ir. Sri Hartadi dan Ir. Siti Kabirun yang telah memberikan petunjuk dan pengarahan selama berlangsungnya kegiatan praktek lapang ini. Rasa terimakasih penulis sampaikan pula kepada Dwi Karyani atas segala bantuannya hingga tersusun laporan ini.

Ucapan terimakasih dan penghargaan penulis sampaikan pula kepada semua pihak yang telah membantu baik langsung maupun tidak langsung selama praktek lapang hingga terwujudnya tulisan ini. Semoga hasil-hasil yang tertuang dalam tulisan ini bermanfaat bagi yang memerlukannya.

Bogor, September 1989

Penulis

# DAFTAR ISI

Halaman

DAFTAR TABEL .....	iv
DAFTAR GAMBAR .....	v
PENDAHULUAN .....	1
Latar Belakang .....	1
Tujuan Praktek Lapang .....	4
Waktu dan Tempat Praktek Lapang .....	5
TINJAUAN PUSTAKA .....	6
Bakteri Bintil Akar .....	6
Pemanfaatan Inokulum Bakteri Bintil Akar ...	10
Penyiapan Inokulum .....	12
Inokulasi Inokulum Bakteri Bintil Akar ke da- lam Gambut .....	18
HASIL PENGAMATAN .....	20
Koleksi Bintil .....	23
Isolasi Bakteri Bintil Akar .....	24
Seleksi Bakteri Bintil Akar .....	26
Perbanyak Biakan Bakteri Bintil Akar .....	30
Inokulasi Bakteri ke dalam Bahan Pembawa Gambut .....	34
PEMBAHASAN .....	35
Koleksi Bintil .....	35
Isolasi Bakteri Bintil Akar .....	35
Seleksi Bakteri Bintil Akar .....	36
Perbanyak Biakan Bakteri Bintil Akar .....	37
Inokulasi Bakteri ke dalam Bahan Pembawa Gambut .....	38



KESIMPULAN ..... 42

DAFTAR PUSTAKA ..... 43

LAMPIRAN ..... 46



DAFTAR TABEL

Nomor Halaman

Lampiran

1.	Kelompok Inokulasi Silang .....	47
2.	Tanaman-tanaman Inang yang Dapat Digunakan untuk Uji Autentikasi Bakteri Bintil Akar .....	48
3.	Peta Penyebaran Legum Berdasarkan Propinsi Penerima .....	49
4.	Histogram Penggunaan Legum dari Tahun 1979-1986 .....	50
5.	Komposisi Medium Agar Manitol Ekstrak Khamir .....	51

Grafik: *ipb* milik IPB University

Halaman ini merupakan bagian dari dokumen yang diterbitkan oleh IPB University. Untuk lebih jelasnya, silakan kunjungi laman IPB University.

DAFTAR GAMBAR

Nomor	<u>Teks</u>	Halaman
1.	Botol untuk Tempat Menyimpan Bintil .....	23
2.	Tahap-tahap Isolasi Bakteri Bintil Akar dari Tanaman Pepolongan .....	25
3.	Skema Kantong Plastik sebagai Kantong Penum- buhan (Skala 1 : 2) .....	29
4.	Skema Pembuatan Karton .....	30
5.	Kedudukan Kecambah Siratro di dalam Kantong Penumbuhan .....	31
6.	Penanaman Siratro dengan Menggunakan Kantong Penumbuhan yang Berisi Medium Thornton .....	32
7.	Kedudukan Kantong Penumbuhan di dalam Rak ..	32
8.	Biakan Bakteri di dalam Medium Bifase yang Digoyang-goyangkan di atas "Shaker" ..	33

Hal Guna: Pendidikan / Pembelajaran  
 1. Diambil sebagai acuan sebagai acuan untuk kegiatan pembelajaran dan pengembangan sumber  
 2. Untuk keperluan acuan pembelajaran, penelitian, dan lain-lain yang berkaitan dengan penelitian  
 3. Sebagai acuan untuk keperluan penelitian yang sedang berlangsung  
 4. Sebagai acuan untuk keperluan penelitian yang sedang berlangsung  
 5. Sebagai acuan untuk keperluan penelitian yang sedang berlangsung  
 6. Sebagai acuan untuk keperluan penelitian yang sedang berlangsung  
 7. Sebagai acuan untuk keperluan penelitian yang sedang berlangsung  
 8. Sebagai acuan untuk keperluan penelitian yang sedang berlangsung

## PENDAHULUAN

### Latar Belakang

Penambatan nitrogen secara simbiosis di dalam bintil akar tanaman pepolongan merupakan hasil interaksi biologis yang kompleks antara lingkungan, tanaman inang dan rizobium (Larue, 1980). Dalam keadaan yang menguntungkan baik bagi pertumbuhan tanaman inang maupun perkembangan rizobium yang sesuai akan diperoleh simbiosis yang efektif dalam penambatan nitrogen (Frederick, 1978).

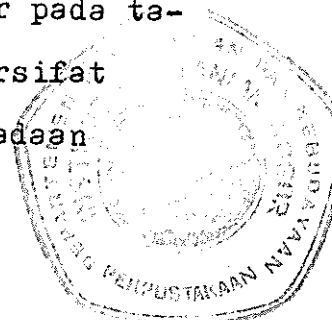
Reaksi penambatan nitrogen memerlukan enzim nitrogenase yang berfungsi sebagai pereduksi  $N_2$  menjadi  $NH_3$ . Reaksi yang dikatalisis nitrogenase ini membutuhkan senyawa berenergi tinggi (ATP) dan sejumlah reduktan (Subba Rao, 1982). Reduktan dan ATP ini diperoleh dari fotosintat, yang ditranslokasikan dari daun ke bintil akar. Senyawa berenergi tinggi ini juga dihasilkan dari proses respirasi. Selanjutnya amonia dengan asam  $\alpha$ -ketoglutarat akan membentuk asam amino glutamin dan kemudian membentuk protein yang akan diangkut ke dalam jaringan-jaringan tanaman untuk pertumbuhannya (Steward, 1963; Dawes dan Sutherland, 1976; Subba Rao, 1982; Brock dan Madigan, 1988).

Penggunaan inokulum rizobium yang infeksiif dan efektif dalam usaha peningkatan produksi pepolongan memberikan banyak keuntungan (Sihombing, 1986), antara lain sebagian kebutuhan nitrogen bagi tanaman dapat terpenuhi, yang pada

gilireannya dapat meningkatkan kandungan protein di dalam tanaman. Selain itu penggunaan pupuk nitrogen akan berkurang sehingga biaya yang diperlukan untuk memproduksi menjadi relatif murah. Keuntungan lain yang tak langsung dari penggunaan inokulum ini yang mengakibatkan pertumbuhan inang yang semakin baik adalah bertambahnya bahan organik tanah terutama nitrogen melalui pembedaman daun dan ranting tanaman segar (Soeprapto, 1982). Kemudian hal ini dapat menjadikan kemungkinan tersedianya nitrogen di dalam tanah untuk pertanaman berikutnya menjadi lebih besar dan keadaan fisik tanah menjadi lebih baik (Sihombing, 1986).

Pemanfaatan penambatan nitrogen secara biologi, selain dapat mengurangi kebutuhan pupuk nitrogen buatan (anorganik) juga dapat ditingkatkan efisiensinya melalui pemilihan inang yang sesuai dengan galur bakteri bintil akar yang bersangkutan atau menyeleksi galur bakteri bintil akar yang mempunyai ciri-ciri seperti infeksi, efektif, kompetitif dan persisten.

Berkaitan dengan itu, Burton (1979) dan Thompson (1980) secara terpisah mengemukakan beberapa syarat penting yang perlu diperhatikan di dalam upaya menyeleksi galur-galur rizobium untuk inokulum yaitu galur harus bersifat infeksi, artinya dapat membentuk bintil akar pada tanaman inang yang serasi; kemudian galur harus bersifat efektif, kompetitif, dan mampu bertahan dalam keadaan



kurang menguntungkan, artinya dapat tumbuh dengan baik di dalam biakan, medium pembawa atau "carrier" maupun di dalam tanah setelah biji yang diinokulasi ditanam, serta bertahan hidup di dalam tanah dari musim ke musim. Akan tetapi dalam kenyataannya belum pernah ditemukan suatu galur yang unggul untuk setiap aspek tersebut. Pernyataan yang tersebut terakhir ini diperoleh berdasarkan penelaahan yang dilakukan secara terpisah oleh Chowdhury (1977) dan Stowers dan Elkan (1980) terhadap kenyataan bahwa kadang-kadang ditemukan galur yang efektif tetapi tidak kompetitif atau galur yang kompetitif tetapi tidak efektif.

Produksi inokulum rizobium di Indonesia dipelopori oleh Toxopeus pada tahun 1936 yang dibuat di dalam tabung reaksi berupa biakan agar miring. Kemudian pada tahun 1941, de Jongh mulai memperkenalkan inokulum dalam ukuran botol-botol yang besar walaupun masih berupa biakan agar miring, sedangkan inokulum dalam bentuk tepung atau bubuk, baru diperkenalkan oleh RISPA Medan pada tahun enampuluhén, dengan menggunakan bahan pembawa berupa serbuk yang dibuat dari sabut kelapa (Yutono, 1986). Selanjutnya pada tahun 1968, Universitas Gajah Mada memperkenalkan inokulum dengan bahan pembawa gambut dalam bentuk pasta, sedangkan inokulum dalam bentuk tepung baru dibuat tahun 1979 (Hartadi, Komunikasi pribadi).

Berdasarkan tinjauan Saono (1988), berbagai macam inokulum yang sudah digunakan di Indonesia adalah Legin,

Rhizogin, Nitragin, IPB dan SS 119. Inokulum yang paling banyak digunakan adalah Legin, sedangkan inokulum lainnya masih dalam skala kecil (Saono, 1988).

Legin adalah inokulum yang diproduksi oleh Universitas Gajah Mada. Produksinya dalam skala besar dimulai tahun 1980 atas permintaan Departemen Transmigrasi untuk digunakan dalam penanaman kedelai di lahan bukaan baru atau daerah transmigrasi (Yutono, 1986). Pada tahun 1983 Pemerintah telah menyebarkan Legin secara cuma-cuma kepada para petani yang berpartisipasi dalam program intensifikasi kedelai (Saono, 1988). Akibatnya penyebaran dan penggunaan Legin dari tahun ke tahun makin meluas baik di daerah transmigrasi maupun di luar daerah transmigrasi, seperti lahan-lahan di Perkebunan Besar, PT Kapas, Patra Tani (Perusahaan Produksi Tanaman Pangan) dan lahan perorangan.

#### Tujuan Praktek Lapang

Berdasarkan uraian tersebut di atas, maka kegiatan Praktek Lapang ini ditujukan untuk lebih mengetahui seluk-beluk kegiatan penyiapan inokulum di Indonesia, khususnya di Universitas Gajah Mada sebagai produsen. Telaah mengenai penyiapan inokulum ini mencakup asal-usul galur yang diperoleh, kemudian cara mengisolasi, memurnikan,

mencirikan dan menyimpan galur tersebut serta menyiapkannya dalam medium pembawa. Selain itu aspek yang tak kalah pentingnya adalah aspek pengelolaan penyiapan inokulum tersebut.

Proses pembuatan Legin ini tidak dapat diikuti seluruhnya oleh penulis karena waktu pelaksanaan praktek lapangan yang terbatas. Oleh karena itu telaah mengenai penyiapan bahan pembawa gambut dalam pembuatan Legin ini dilakukan oleh rekan penulis, Dwi Karyani.

#### Waktu dan Tempat Praktek Lapangan

Kegiatan Praktek Lapangan ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Pertanian, Universitas Gajah Mada, Yogyakarta, selama satu bulan. Data-data yang diperoleh berasal dari hasil pengamatan kegiatan penyiapan inokulum, wawancara dengan pengelola kegiatan dan mengadakan telaah kepustakaan yang berhubungan dengan penyiapan inokulum yang terpilih sebagai pokok bahasan.



## TINJAUAN PUSTAKA

### Bakteri Bintil Akar

Berdasarkan Bergey's Manual edisi terbaru (1984), bakteri bintil akar termasuk ke dalam famili Rhizobiaceae. Sel-sel bakteri dari famili ini tidak membentuk endospora, berbentuk batang, motil dengan satu flagela polar atau subpolar atau dengan 2-6 flagela peritrikus, bersifat aerobik, bereaksi Gram negatif dan dapat menggunakan beberapa macam karbohidrat. Bakteri ini biasanya menghasilkan lendir ekstraselular selama pertumbuhannya pada medium yang mengandung karbohidrat. Famili ini beranggotakan empat genus yaitu Rhizobium, Bradyrhizobium, Agrobacterium dan Phyllobacterium.

Sel bakteri Rhizobium dan Bradyrhizobium mempunyai kesamaan ciri dalam hal kemampuannya merangsang pembentukan bintil pada akar tanaman pepolongan yang pada gilirannya menambat nitrogen secara simbiotik.

Bakteri yang termasuk ke dalam genus Rhizobium dapat menyebabkan pembentukan bintil pada akar tanaman pepolongan terutama di daerah beriklim sedang. Bakteri ini tumbuh cepat pada medium agar Manitol Ekstrak Khamir (MEK), menghasilkan asam di dalam medium garam mineral dan DNA-nya mengandung 59-64 persen G+C. Selnya berbentuk batang dengan ukuran 0.5-0.9 x 1.2-3.0 um, dan pada medium yang kurang baik akan berbentuk pleomorfik. Di bawah mikroskop

kontras fase, sel-sel tersebut terlihat mengandung butir-butir polo- $\beta$ -hidroksibutirat yang refraktil. Suhu optimum untuk pertumbuhannya adalah 25-30°C dengan pH optimum 6-7. Koloni bakteri ini berbentuk bundar, berelevasi cembung, bersifat tembus pandang (semitranslucent) dan bertepian licin. Biasanya koloni tumbuh dengan diameter 2-4 mm setelah 3-5 hari inkubasi pada medium agar MEK dan di dalam medium kaldu yang terkocok kekeruhan akan tampak nyata setelah 2-3 hari inkubasi.

Bakteri bersifat kemoorganotrof tetapi tidak memanfaatkan selulose dan pati, kurang memanfaatkan pepton dan tidak menghidrolisis kasein dan agar. Sebagai sumber nitrogennya, bakteri dapat memanfaatkan garam-garam amonium, nitrat, nitrit dan asam-asam amino. Beberapa galur akan tumbuh pada medium garam-garam mineral sederhana yang mengandung vitamin bebas kasein hidrolisat sebagai sumber karbon dan nitrogen, dan ada yang memerlukan biotin atau vitamin-vitamin lainnya yang larut dalam air.

Genus Bradyrhizobium dapat menyebabkan pembentukan bintil pada akar tanaman pepolongan di daerah tropis dan subtropis. Pertumbuhannya lambat di dalam medium MEK, menghasilkan reaksi alkalin di dalam medium garam mineral dan DNA-nya mengandung 61-65 persen G+C. Selnya berbentuk batang dengan ukuran 0.5-0.9 x 1.2-3.0  $\mu$ m, dan berbentuk pleomorfik pada medium yang kurang baik. Di dalam selnya akan terlihat butir-butir poli- $\beta$ -hidroksibutirat yang

bersifat refraktil. Suhu optimum untuk pertumbuhannya terletak pada kisaran 25-30°C dengan pH optimum 6-7. Koloni bakteri berbentuk bundar, buram, sedikit tembus pandang, putih dan berelevasi cembung. Diameter koloni tidak lebih dari 1 mm setelah 5-7 hari inkubasi pada medium agar MEK dan di dalam medium kaldu yang terkocok kekeruhan akan tampak setelah 3-5 hari inkubasi.

Ditinjau dari aspek nutrisi bakteri Bradyrhizobium sama dengan Rhizobium yang bersifat kemoorganotrof hanya Bradyrhizobium lebih menyukai pentosa. Di atas medium yang mengandung karbohidrat bakteri ini akan membentuk lendir polisakarida ekstraselular. Beberapa galur dapat tumbuh secara kemolitotrof dalam lingkungan H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> dan O<sub>2</sub> yang rendah. Bakteri ini dapat menggunakan garam-garam amonium, nitrat dan beberapa asam amino sebagai sumber nitrogen, kurang memanfaatkan pepton kecuali galur-galur yang diisolasi dari Lotononis, tidak menggunakan selulose dan pati dan tidak menghidrolisis kasein dan agar. Umumnya bakteri ini tidak membutuhkan vitamin kecuali sedikit biotin.

Klasifikasi lama dari bakteri bintil akar ini didasarkan atas konsep kelompok inokulasi silang (Lampiran 1) dengan beranggapan bahwa tanaman pepolongan yang berada di dalam kelompok infeksi tertentu dinodulasi oleh spesies bakteri bintil akar tertentu. Dengan adanya penyimpangan infeksi silang di antara kelompok-kelompok tanaman yang

berbeda maka klasifikasi ini lambat laun mengalami perubahan sejalan dengan perkembangan penelitian mengenai genom bakteri. Dengan adanya perubahan-perubahan tersebut maka saat ini telah ditetapkan pembagian genus Rhizobium menjadi tiga spesies. Ketiga spesies tersebut adalah R. leguminosarum, yang oleh Frank pada tahun 1879 dan 1889 diberi nama Schinzia leguminosarum, kemudian R. meliloti Dangeard (1926) dan R. loti Jarvis, Pankhurst dan Patel (1982).

Genus Bradyrhizobium dianggap sebagai suatu kelompok bakteri bintil akar yang sangat heterogen yang hubungan taksonominya belum jelas. Penelitian yang baru-baru ini dilakukan oleh Hollis, Kloos dan Elkan pada tahun 1981 tentang hibridisasi rasio DNA/DNA memberi kesan bahwa galur-galur yang dianggap B. japonicum dapat dipisahkan menjadi sekurang-kurangnya tiga kelompok DNA homologi. Namun sampai saat ini hanya B. japonicum yang merupakan spesies dari Bradyrhizobium. B. japonicum ini merupakan nama yang diberikan oleh Kirchner (1896) dan Jordan (1982) setelah mengalami perubahan-perubahan nama dari Rhizobacterium japonicum (Kirchner, 1896) kemudian Rhizobium japonicum (Kirchner, 1896 dan Buchanan, 1926). Namun ada organisme-organisme lain yang termasuk genus Bradyrhizobium tetapi belum diklasifikasikan sebagai spesies atau biovar-biovar, misalnya organisme-organisme yang dapat menyebabkan pembentukan bintil pada spesies Lotus tertentu (L. uliginosus dan

L. pedunculatus). Oleh karena itu sebutan terhadap spesies-spesiesnya harus disertai keterangan tanaman inang asalnya, misalnya Bradyrhizobium sp. (Vigna) atau Bradyrhizobium sp. (Lupinus).

#### Pemanfaatan Inokulum Bakteri Bintil Akar

Inokulasi pada suatu tanaman pepolongan merupakan tindakan memberikan inokulum bakteri bintil akar langsung kepada biji-biji tanaman tersebut atau pada tanah yang akan ditanami (Departemen Pertanian, 1982). Inokulum tersebut dapat berbentuk biakan cair, biakan agar miring dalam tabung reaksi atau dalam bentuk biakan dalam suatu bahan yang berupa bubuk halus atau butiran-butiran kecil yang berperan sebagai bahan pembawa ("carrier"). Sebagai bahan pembawa antara lain dapat digunakan kompos, gambut atau campuran gambut dan lempung (Yutono, 1986). Namun bentuk inokulum yang paling sederhana adalah berupa tanah yang pernah ditanami tanaman pepolongan dengan penampilan pertumbuhan yang baik (Departemen Pertanian, 1982).

Dengan adanya asosiasi antara bakteri bintil akar dan tanaman pepolongan dalam menambat nitrogen udara, maka inokulasi perlu dilakukan terutama pada tanah yang belum pernah ditanami tanaman tersebut (Yutono, 1981). Penambatan nitrogen secara simbiosis ini tidak terlepas dari pengaruh lingkungan (Larue, 1980). Faktor-faktor lingkungan yang

mempengaruhi ketahanan bakteri bintil akar sebagai inokulum adalah suhu, kelembaban, pH dan salinitas (Juwarkar dan Rewari, 1988).

Inokulum bakteri bintil akar di dalam bahan pembawa gambut umumnya digunakan untuk menginokulasi lebih dari satu varietas dari satu spesies tanaman pepolongan atau lebih dari satu spesies, bahkan untuk sejumlah genus tanaman pepolongan (Thompson, 1984). Sehubungan dengan hal tersebut, ada dua macam inokulum yang sering digunakan yaitu inokulum multigalur dan inokulum galur tunggal. Inokulum multigalur mengandung galur-galur dari dua kelompok inokulasi atau campuran galur-galur dari satu kelompok inokulasi, sedangkan inokulum galur tunggal mengandung satu galur dari satu kelompok inokulasi (Roughley dan Pulsford, 1980).

Keuntungan inokulum multigalur yaitu dapat menyediakan suatu inokulum yang efektif untuk tanaman inang dengan spektrum luas, sedangkan apabila digunakan galur tunggal, kegagalan inokulasi dapat terjadi akibat tidak adanya keserasian dengan tanaman inang (Roughley dan Pulsford, 1980; Thompson, 1984). Kelemahan inokulum multigalur yaitu kemungkinan dapat terjadi munculnya satu galur yang menjadi dominan di dalam campuran galur tersebut karena adanya perbedaan kecepatan pertumbuhan, perbedaan ketahanan terhadap lingkungan yang kurang menguntungkan atau adanya pengaruh-

pengaruh yang antagonistic. Hal ini tidak akan terjadi pada inokulum galur tunggal.

### Penyiapan Inokulum

Isolasi bakteri bintil akar. Galur-galur bakteri bintil akar dapat diperoleh dengan mengisolasi dari bintil akar tanaman pepolongan baik yang segar, yang sudah kering atau bintil yang sudah tua dan dapat juga dari tanah (Brockwell, 1980).

Bintil-bintil akar tersebut mengandung mikroorganisme lain selain bakteri bintil akar baik di permukaan maupun di dalamnya. Oleh karena itu sebelum dilakukan isolasi, bintil-bintil tersebut harus disterilisasi permukaan terlebih dahulu (Vincent, 1970) agar bebas dari mikroorganisme yang dapat mengganggu pertumbuhan bakteri bintil akar. Bahan desinfektan yang dapat digunakan antara lain larutan-larutan kalsium hipoklorit 3 persen, merkuri klorida 0.1 persen yang diasamkan (asam sublimat) dan hidrogen peroksida 3 persen (Somasegaran dan Hoben, 1985). Bintil-bintil akar tersebut dapat digunakan segera setelah diambil dari akar atau disimpan sementara pada suhu rendah. Isolasi bakteri dari bintil yang tua atau kering perlu penanganan khusus untuk melindunginya dari kontaminasi. Kontaminasi cendawan dapat ditekan secara selektif dengan mencampurkan 0.002 persen aktidion ke dalam medium penumbuhan (Vincent, 1970).

Medium yang baik untuk isolasi dan dapat membedakan antara bakteri bintil akar dengan kontaminan adalah medium agar MEK ditambah dengan larutan merah Kongo. Pada medium ini koloni bakteri bintil akar tidak menyerap warna merah, sedangkan koloni kontaminan berwarna merah karena dapat menyerap warna merah larutan merah Kongo (Vincent, 1970).

Ada dua cara untuk mengisolasi bakteri bintil akar dari bintil (Subba Rao, 1982; Somasegaran dan Hoben, 1985). Cara pertama yaitu dengan pengenceran serial yang disiapkan dari ekstrak bintil yang kemudian disebar pada medium agar MEK. Kedua, dengan menyebarkan cairan dari bintil yang dibelah pada permukaan medium agar cawan MEK dengan bantuan batang kaca penyebar. Cawan tersebut diinkubasi sampai 10 hari di dalam inkubator pada suhu 26°C. Koloni-koloni bakteri yang besar dan berlendir akan muncul setelah 4-5 hari inkubasi, sedangkan koloni yang kecil kemungkinan akan muncul setelah 10 hari inkubasi.

Seleksi galur bakteri bintil akar. Burton (1979) dan Thompson (1980) mengemukakan bahwa ada beberapa kriteria yang perlu diperhatikan dalam menyeleksi galur bakteri bintil akar sebagai inokulum. Kriteria pertama yaitu bakteri tersebut mampu membentuk bintil pada tanaman inangnya yang pada gilirannya dapat memberikan persediaan nitrogen yang cukup. Kriteria berikutnya yaitu bakteri harus mampu berkompetisi dengan mikroorganisme lainnya atau dengan bakteri



bintil akar yang tidak efektif, kemudian galur bakteri tersebut harus dapat tumbuh dengan baik di dalam medium biakan, medium pembawa ("carrier") dan di dalam tanah setelah biji ditanam. Selain itu, bakteri harus tahan hidup di dalam tanah dari musim ke musim.

Autentikasi merupakan tahap awal yang sering dilakukan dalam menyeleksi galur-galur bakteri bintil akar. Autentikasi ini adalah uji kemampuan suatu galur bakteri bintil akar untuk membentuk bintil pada tanaman inang yang cocok dengan menumbuhkannya pada kondisi yang terkontrol (Brockwell, 1980).

Untuk menguji kemampuan bakteri membentuk bintil akar ini diperlukan kondisi yang aseptis sehingga sebagai tempat penumbuhan tanaman inangnya digunakan tabung atau kantong penumbuhan. Oleh karena itu, tanaman yang dipakai untuk pengujian ini harus berukuran kecil. Apabila tanaman inang berukuran besar maka diperlukan tanaman penguji yang berukuran kecil dan termasuk ke dalam satu kelompok inokulasi dengan tanaman inang tersebut. Umumnya sebagai tanaman penguji tersebut digunakan siratro (Macroptilium atropurpureum), karena tanaman ini berukuran kecil dan dapat membentuk bintil akar dengan sebagian besar (90 persen) kelompok inokulasi silang (Soedarsono dan Soesanto, 1983; Somasegaran dan Hoben, 1985). Selain itu, Somasegaran dan Hoben (1985) menganjurkan pula untuk menggunakan

beberapa jenis tanaman (lihat Lampiran 2) dalam uji autentikasi ini.

Uji selanjutnya adalah uji keserasian antara bakteri tersebut dengan tanaman pepolongan dan uji kemampuannya dalam menambat nitrogen di dalam botol Leonard yang dimodifikasi pada kondisi yang terkontrol (Somasegaran dan Hoben, 1985). Sebagai parameter untuk mengetahui keefektifannya yaitu dengan penetapan bobot kering tanaman bagian atas, bobot kering bintil, kandungan N total dan aktivitas nitrogenase. Suatu hal yang harus dilakukan sebagai uji selanjutnya dalam menyeleksi galur ini adalah evaluasi lapangan.

Pemeliharaan biakan bakteri bintil akar. Menurut Vincent (1970) dan Somasegaran dan Hoben (1985), ada beberapa metode yang dapat digunakan untuk memelihara biakan bakteri bintil akar. Metode yang paling sering digunakan adalah penyimpanan pada agar miring MEK di dalam tabung reaksi yang ditutup dengan kapas. Pada medium ini, bakteri dapat bertahan selama 6 bulan pada suhu ruang, apabila disimpan pada suhu rendah ( $2^{\circ}\text{C}$ ) bakteri dapat bertahan sampai 2 tahun, bahkan kenyataannya ada yang dapat bertahan hingga 10 sampai 16 tahun. Namun masalah utama dari metode ini adalah kehilangan kelembaban, tetapi hal ini dapat diatasi yaitu dengan menggunakan tabung berulir atau dengan botol McCartney atau dengan agar miring di dalam tabung yang berisi parafin cair yang steril (Thompson, 1984).

Metode penyimpanan yang lebih baik adalah penyimpanan dengan metode liofilisasi ("freeze dried"). Dengan metode ini bakteri dapat bertahan minimum sampai 15-20 tahun dan resiko kontaminasi dapat diperkecil.

Selain metode-metode tersebut di atas dapat pula digunakan bentuk pengawetan dengan pengeringan pada manik-manik porselin (metode "porcelain beads") dan pembekuan suspensi cair di bawah nitrogen cair.

Bahan pembawa. Sahni (1977) mengungkapkan bahwa untuk keperluan praktis, di dalam produksi inokulan bakteri bintil akar (inokulum bakteri bintil akar dalam bahan pembawa) diperlukan suatu bahan pembawa yang cocok. Berdasarkan hal tersebut, Burton (1979) dan Thompson (1984) secara terpisah mengemukakan bahwa mutu bahan pembawa yang baik untuk bakteri bintil akar adalah tidak beracun, mempunyai kapasitas menahan air yang tinggi, mudah hancur dan mudah disterilisasi, pH-nya mudah ditingkatkan hingga 6.5-7.0, mudah melekat pada biji dan siap tersedia dengan harga layak. Roughley dan Pulsford (1980) menambahkan bahwa bahan pembawa harus menyediakan medium yang bergizi untuk pertumbuhan dan peningkatan kelangsungan hidup bakteri.

Gambut merupakan bahan padat yang biasa digunakan sebagai pembawa biakan bakteri bintil akar dalam inokulan tanaman kacang-kacangan, karena gambut ini dapat menyimpan air dan bakteri dalam jumlah yang relatif tinggi dan dalam waktu yang lama (Saono dan Karsono, 1981). Selain itu,

gambut dapat menyediakan kondisi alamiah bagi bakteri sehingga dapat mempertinggi ketahanannya pada biji (Subba Rao, 1982).

Di dalam pemakaiannya biasanya digunakan gambut steril dan gambut yang tidak steril. Untuk mensterilkan gambut digunakan otoklaf atau radiasi gamma (Thompson, 1984). Gambut yang steril biasanya digunakan untuk produksi inokulan dalam skala kecil, sedangkan gambut yang tidak steril untuk produksi dalam skala besar (Somasegaran dan Hoben, 1985).

Menurut Schreven (1970) sterilisasi terhadap gambut memberikan beberapa keuntungan antara lain: dapat merubah kondisi fisik gambut atau tanah terutama ciri koloidalnya; dapat menghancurkan zat-zat yang bersifat racun; dan dapat menyebabkan bahan organik lebih tersedia untuk keperluan aktivitas bakteri.

Bakteri bintil akar dapat tumbuh dan bertahan lebih baik di dalam gambut steril dari pada gambut yang tidak steril (Roughley dan Pulsford, 1980). Tingkat perbedaan ini tergantung dari kecocokan gambut dan suhu serta lamanya penyimpanan. Jumlah bakteri cepat meningkat hingga seratus kali lipat pada minggu pertama setelah inokulasi pada suhu 26°C dan pertumbuhan menurun setelah empat minggu.

Inokulan dengan bahan pembawa gambut yang tidak steril biasanya mengandung bakteri bintil akar seratus kali lebih

sedikit dari pada gambut steril, karena tingkat kematiannya di dalam gambut yang tidak steril lebih tinggi.

Inokulasi Inokulum Bakteri Bintil Akar ke dalam Gambut

Menurut Roughley dan Pulsford (1980), di Australia jumlah bakteri bintil akar yang diinokulasikan ke dalam gambut minimum  $1 \times 10^9$  sel untuk setiap gram gambut yang tidak steril dan  $1 \times 10^8$  sel untuk setiap gram gambut steril, sedangkan di Canada jumlah bakteri bintil akar yang diinokulasikan per gram gambut adalah  $1 \times 10^6$  sel (Somasegaran dan Hoben, 1985). Subba Rao (1982) menambahkan bahwa di USA, jumlah bakteri yang diinokulasikan untuk setiap gram gambut minimum  $3 \times 10^8$  sel.

Namun jumlah bakteri bintil akar yang dibutuhkan untuk setiap biji adalah  $1 \times 10^2$  sel dalam kondisi yang menguntungkan, sedangkan apabila kondisi kurang menguntungkan diperlukan jumlah sel lebih dari  $1 \times 10^6$  setiap biji (Roughley dan Pulsford, 1980). Menurut Burton (1979) jumlah bakteri yang diperlukan untuk menginokulasi biji minimum  $1 \times 10^3$  sel per biji, sedangkan Vincent (1970) mengemukakan bahwa  $10^3$ - $10^4$  sel per biji sudah mencukupi untuk menginokulasi biji.

Inokulasi bakteri bintil akar ke dalam gambut yang tidak steril dilakukan dengan menyebarkan inokulum bakteri tersebut ke dalam gambut. Pencampuran ini dilakukan di

dalam cawan (mangkuk) yang dilengkapi dengan pengaduk mekanik (Roughley dan Pulsford, 1980), sedangkan gambut steril diinokulasi dengan cara menyuntikkan inokulum dengan penyuntik steril ke dalam kantong polietilen yang telah diisi gambut tersebut.



## HASIL PENGAMATAN

Di Universitas Gajah Mada, produksi inokulan bakteri bintil akar dalam skala besar telah dilakukan sejak tahun 1979 atas permintaan Departemen Transmigrasi untuk keperluan petani di daerah Transmigrasi. Produk inokulan ini kemudian diberi nama Legin, yaitu kependekan dari Legume Inoculant. Pengelolaannya ditangani oleh para Staf Jurusan Mikrobiologi, Fakultas Pertanian di Universitas tersebut. Sampai saat ini telah dihasilkan inokulan Legin yang menginfeksi tanaman kedelai, kacang tanah, lamtoro gung dan beberapa tanaman penutup tanah.

Pada tahun 1979 inokulan bakteri bintil akar dalam bentuk pasta telah digunakan untuk keperluan Dinas Pertanian Propinsi Jambi. Inokulan tersebut berisi empat galur bakteri bintil akar dengan gambut Rawa Pening sebagai bahan pembawa. Sebagian inokulan digunakan untuk penanaman kedelai di lahan pembukaan baru di Muara Bungo, Jambi yang merupakan perwujudan kerja sama antara Masyarakat Ekonomi Eropa (MEE) dengan Dirjen Pertanian Tanaman Pangan.

Pada tahun yang sama telah digunakan pula 48 kg inokulan untuk keperluan penanaman kedelai seluas 100 hektar di Palembang Rice Estate (PT Patra Tani) Palembang. Inokulan ini terdiri dari enam galur.

Atas saran dan kritik dari pemakai inokulan terutama dari Palembang Rice Estate maka dibuat inokulan dalam

bentuk tepung yang agak kering dengan kadar air lebih kurang 30 persen.

Pada tahun berikutnya (1980) digunakan 114 kg inokulan untuk keperluan penanaman kedelai seluas 350 hektar di Palembang Rice Estate. Pada tahun yang sama pula dilakukan pengiriman ke seluruh propinsi di Indonesia kecuali Timor Timur dengan nama baru Legin untuk keperluan Proyek Pembinaan Pertanian Pangan Daerah Transmigrasi Pusat (P3DT), kemudian pada tahun 1983 telah diperluas untuk keperluan Insus kedelai Tahun Anggaran 1983/1984.

Dalam periode tujuh tahun (1979-1986), Legin kedelai telah digunakan sebanyak kurang lebih 90 ton yang setara dengan 600.000 hektar lahan pertanaman kedelai, dengan dosis pemakaian 150 g inokulan untuk 1 hektar lahan pertanaman. Jumlah tersebut termasuk keperluan untuk para petani non Insus, PT Kapas Indah Indonesia (Sulawesi Tenggara), PTP dan beberapa unsur perorangan (peta penyebaran Legin di Indonesia berdasarkan propinsi penerima dapat dilihat pada Lampiran 3).

Selain untuk kedelai, diproduksi pula Legin untuk jenis tanaman kacang-kacangan lainnya seperti kacang tanah, lamtoro gung dan tanaman penutup tanah (Calopogonium caeruleum, C. mucunoides, Centrosema pubescens dan Pueraria javanica). Namun penggunaan Legin untuk jenis tanaman-tanaman ini tidak sebanyak penggunaan Legin untuk kedelai



(jumlah yang digunakan untuk masing-masing jenis Legin setiap tahunnya dapat dilihat pada Lampiran 4).

Di dalam usahanya untuk mengembangkan inokulan bakteri bintil akar untuk kedelai, Jutono dan rekan-rekan sejawatnya di Universitas Gajah Mada telah mengisolasi lebih dari 164 galur dari sejumlah varietas kedelai setempat dan impor yang ditanam di suatu daerah sekitar Yogyakarta (Sano, 1988). Dari jumlah tersebut dipilih 25 galur untuk diuji keefektifannya dalam menambat nitrogen terhadap sepuluh varietas kedelai dan diperoleh 10 galur yang benar-benar efektif. Sepuluh galur yang efektif tersebut digunakan sebagai biakan induk untuk produksi inokulan Legin.

Pembuatan inokulan Legin terdiri dari dua tahap yaitu tahap penyiapan inokulan bakteri bintil akar dan tahap penyiapan bahan pembawa gambut. Tahapan yang terakhir dilaporkan oleh Dwi Karyani, sedangkan tahapan yang pertama akan diuraikan di bawah ini.

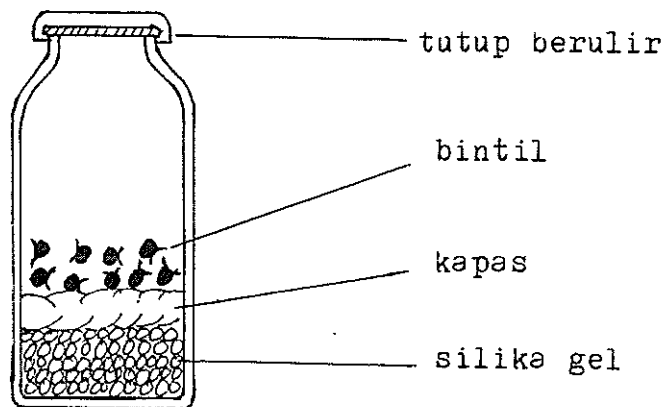
Penyiapan inokulan bakteri bintil akar ini terdiri dari beberapa tahap yaitu tahap pembinaan koleksi bintil, mengisolasi dan menyeleksi bakteri bintil akar, memperbanyak biakan serta menginokulasi bakteri ke dalam bahan pembawa gambut.



## Koleksi Bintil

Bintil yang masih melekat di akar tanaman pepolongan dibersihkan dengan air. Bintil dipilih yang segar dan berwarna kemerahan, kemudian bagian akar selain potongan akar yang berjarak 0.5 cm dari kiri kanan bintil dipotong dengan pisau atau gunting kecil. Bintil tersebut dicuci kembali dan diriskan di atas kertas saring, kemudian disimpan di dalam botol kaca atau botol plastik berulir yang telah diisi silika gel (desikan) sebanyak 1/4 isi botol (Gambar 1). Agar bintil tidak menyentuh silika gel maka kapas diletakkan di atas silika gel tersebut.

Di dalam setiap botol berisi bintil yang berasal dari satu tanaman dan isi bintil yang disimpan dalam setiap botol tidak melebihi isi silika gel. Botol yang telah

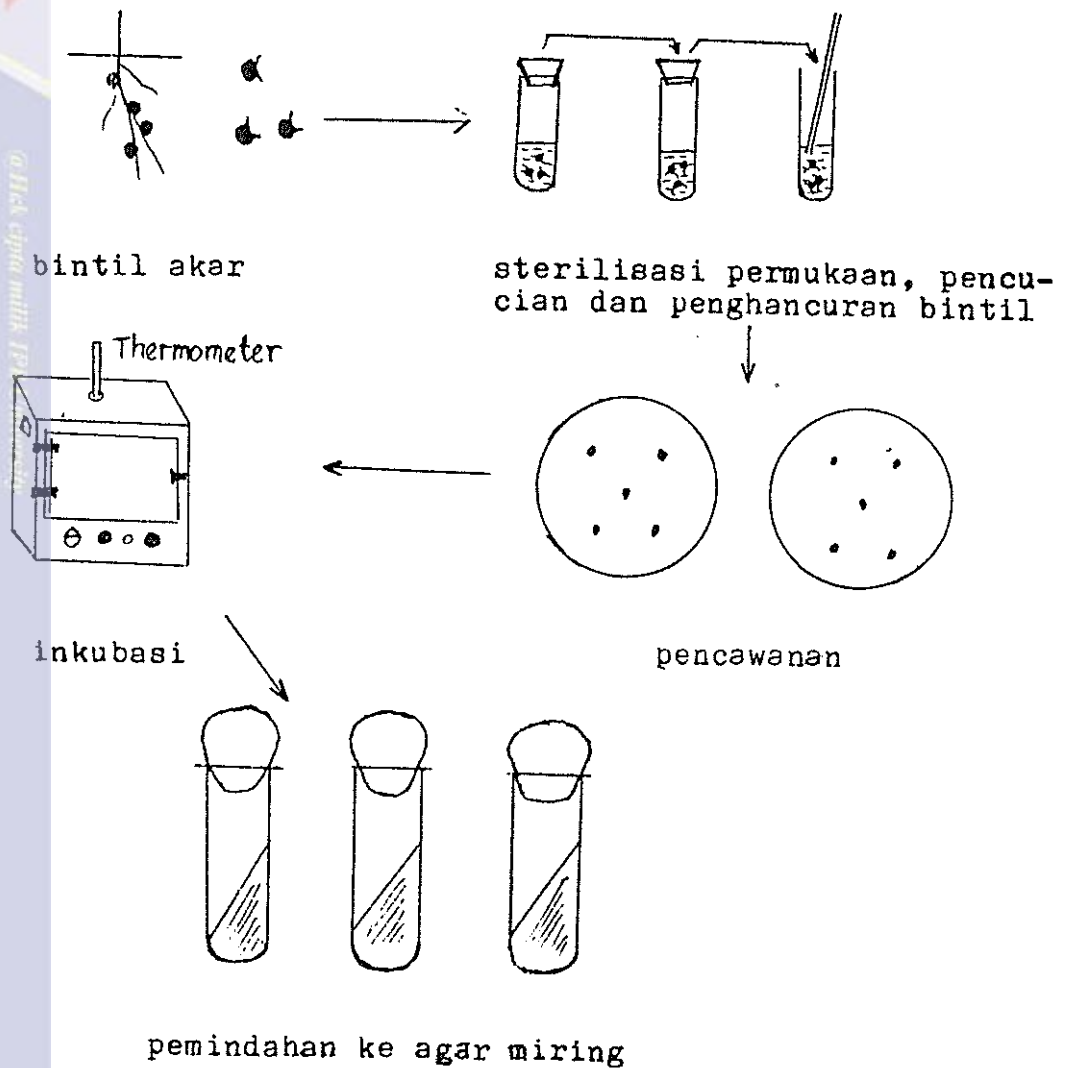


Gambar 1. Botol untuk Tempat Menyimpan Bintil

berisi bintil ini kemudian diberi label bertuliskan jenis tanaman inang, tempat dan tanggal koleksi serta nama kolektornya, dan disimpan pada suhu ruang.

#### Isolasi Bakteri Bintil Akar

Bintil yang akan diisolasi, dipilih yang tidak rusak. Bintil tersebut disterilisasi permukaan dengan merendamnya di dalam larutan etanol 95 persen selama beberapa detik dan dilanjutkan ke dalam larutan  $HgCl_2$  0.1 persen yang diasamkan selama 3-sampai 4 menit, kemudian dicuci dengan air steril sekurang-kurangnya 6 kali. Apabila bintil berukuran besar maka cairannya langsung dikeluarkan dengan pinset steril dan disebarakan pada medium agar MEK yang dibubuhi larutan merah Kongo (komposisi medium dapat dilihat pada Lampiran 5) di dalam cawan petri. Apabila bintil berukuran kecil maka bintil ini harus dihancurkan dan disuspensikan dahulu dengan air fisiologis steril. Suspensi ini kemudian disebarakan ke atas medium seperti yang tersebut di atas. Untuk mencegah terjadinya kontaminasi cendawan, ke dalam medium tersebut ditambahkan 0.002 persen aktidion (Vincent, 1970). Cawan-cawan yang berisi biakan ini kemudian diinkubasi di dalam inkubator pada suhu ruang ( $< 30^{\circ}C$ ) dan pertumbuhannya diamati setiap hari. Tahap-tahap prosedur isolasi bakteri bintil akar dari bintil akar tanaman pepolongan dapat dilihat pada Gambar 2 di halaman berikut ini.



Gambar 2. Tahap-tahap Isolasi Bakteri Bintil Akar dari Bintil Akar Tanaman Pepolongan

Tipe koloni bakteri bintil akar yang tumbuh, berbentuk bundar, berelevasi cembung, berwarna putih, berlendir, sedikit tembus pandang dan bertepian licin, sedangkan tipe selnya secara mikroskopis berbentuk batang dengan ukuran 0.5-0.9 x 1.2-3.0 um, motil dan bersifat Gram negatif.

Koloni yang tumbuh terpisah dipindahkan ke medium agar MEK yang segar. Pemindehan ini dilakukan terus hingga diperoleh koloni yang mempunyai tipe seragam. Untuk mempertegas keseragamannya, pada setiap pemindehan dilakukan pengamatan secara mikroskopis terhadap bentuk sel dan pewarnaan Gram-nya. Bakteri yang mempunyai tipe sel dan koloni yang seragam, dipindahkan dan dipelihara pada medium agar miring MEK di dalam tabung reaksi berukuran 15x160 mm untuk digunakan dalam pengujian selanjutnya, dan disimpan pada suhu 4-8°C.

#### Seleksi Bakteri Bintil Akar

Seleksi bakteri bintil akar yang dapat dilakukan dalam kegiatan praktek lapang ini hanya uji pembentukan bintil akar atau uji autentikasi, sedangkan uji keserasian dengan tanaman inangnya dan keefektivannya dalam menambat nitrogen dalam kondisi terkontrol dan kondisi di lapang tidak dapat dilakukan karena waktu pelaksanaan praktek lapang yang terbatas.

Pengujian pembentukan bintil akar dilakukan dengan menginokulasikan bakteri pada tanaman siratro (Macroptilium atropurpureum) yang ditumbuhkan dengan menggunakan kantong penumbuhan yang berisi medium Thornton. Metode ini mengikuti prosedur Hartadi dan Kabirun (1983).

Tahap-tahap yang dilakukan dalam pengujian ini adalah penyiapan benih siratro, penyiapan medium Thornton, penyiapan kantong penumbuhan dan penanaman benih siratro ke dalam kantong penumbuhan.

Penyiapan benih siratro. Biji siratro direndam di dalam larutan  $H_2SO_4$  pekat selama 5 sampai 10 menit untuk mempercepat perkecambahan biji, lalu segera dicuci dengan air steril hingga bebas dari larutan tersebut. Biji ini kemudian disterilisasi permukaan dengan merendamnya di dalam alkohol 95 persen selama 5 sampai 10 detik dan dilanjutkan ke dalam larutan  $HgCl_2$  0.1 persen yang diasamkan ( $HgCl_2$  1 g; HCl pekat 5 ml dalam 1 liter aquades) selama 4 sampai 6 menit dan dicuci dengan air steril sebanyak 5 kali.

Biji yang telah disterilisasi permukaan tersebut dikecambahkan di dalam cawan petri steril yang berisi kertas saring lembab yang steril hingga panjang akarnya mencapai kurang lebih 0.5 cm.

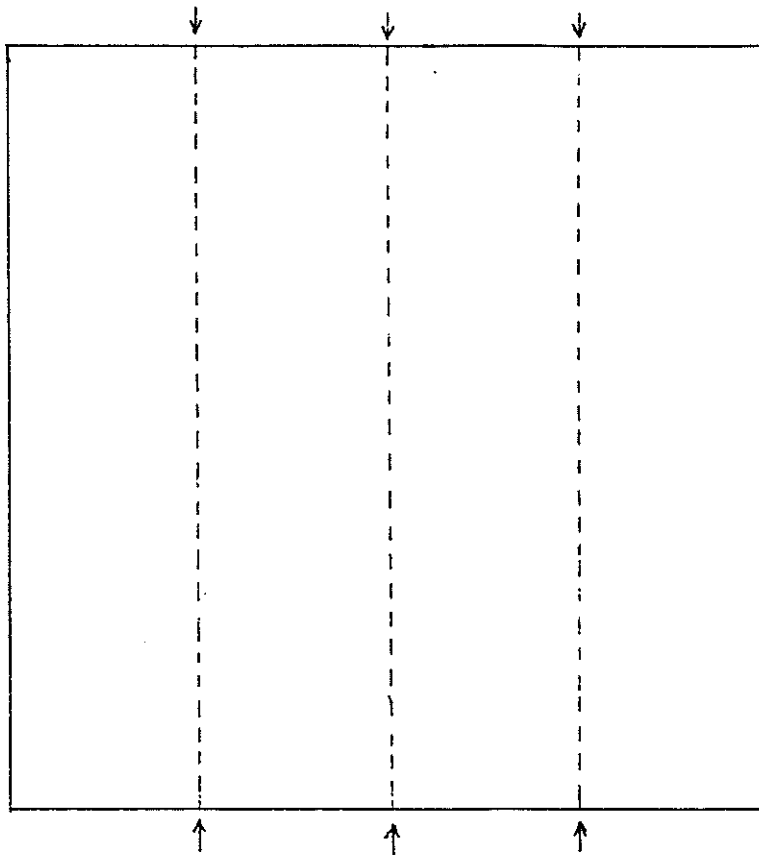
Penyiapan medium Thornton. Mula-mula disiapkan larutan mikroelemen yaitu dengan melarutkan 1.5 g  $H_3BO_4$ ; 4.5 g  $MnSO_4 \cdot H_2O$ ; 0.25 g  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ ; 0.04 g  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  dan 1.5 g  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  di dalam 1 liter aquades. Selanjutnya medium Thornton dibuat dengan melarutkan 2 g  $Ca_3(PO_4)_2$ ; 0.5 g  $K_2HPO_4$ ; 0.2 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 0.1 g NaCl; 1 g  $FePO_4$  dan 0.01 g  $FeCl_3$  di dalam 1 liter aquades, kemudian ditambah larutan mikroelemen yang telah disiapkan sebanyak 1 ml

dan larutan dijaga agar berada pada kisaran pH 6.5 sampai 7.0. Medium Thornton ini kemudian disterilisasi dengan otoklaf pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  selama 20 menit.

Penyiapan kantong penumbuhan. Kantong plastik (poli-propilen) yang tahan panas dengan ukuran 5x20 cm atau yang lebarnya merupakan kelipatan 5, misalnya 20x20 cm dibagi masing-masing selebar 5 cm (Gambar 3 di halaman 29). Sementara itu disiapkan karton yang mudah menyerap air dengan ukuran 4x25 cm. Karton ini dilipat pada panjang 20 cm, sisanya (5 cm) dilipat dua kali masing-masing 2.5 cm. Pada lipatan 22.5 cm dibuat dengan pelubang kertas (perforator). Lubang tersebut kelak untuk meletakkan biji siratro yang telah dikecambahkan (Gambar 4 di halaman 30).

Karton tersebut kemudian dimasukkan ke dalam kantong plastik yang telah disiapkan. Kedudukan kecambah siratro di dalam kantong penumbuhan dapat dilihat pada Gambar 5 di halaman 31. Kantong penumbuhan ini disterilisasi dengan otoklaf pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  selama 20 menit.

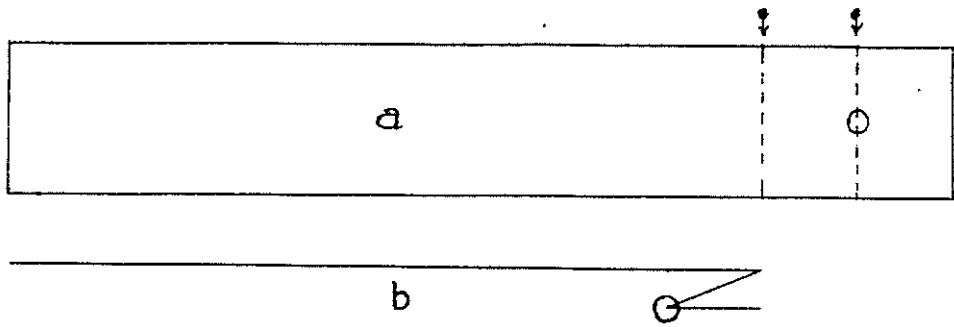
Penanaman benih siratro ke dalam kantong penumbuhan. Medium Thornton steril sebanyak 25 ml dimasukkan ke dalam kantong penumbuhan secara aseptik, kemudian kecambah siratro yang telah disiapkan diletakkan pada lubang karton di dalam kantong penumbuhan tersebut (Gambar 6 di halaman 32).



Gambar 3. Skema Kantong Plastik sebagai Kantong Pe-  
numbuan (Skala 1 : 2)  
 → - - - ← batas ukuran kantong

Selanjutnya, kecambah siratro tersebut diinokulasi dengan suspensi biakan agar miring yang berumur 5 hari dengan jumlah bakteri  $1 \times 10^6$  sel per benih. Suspensi ini dibuat dengan menambahkan 5 ml larutan fisiologis steril ke dalam satu tabung reaksi biakan agar miring. Kerapatan suspensi ini ditetapkan dengan membuat kurva standar yang menunjukkan hubungan antara jumlah bakteri terhadap absorbansi dengan menggunakan spektrofotometer. Kantong-



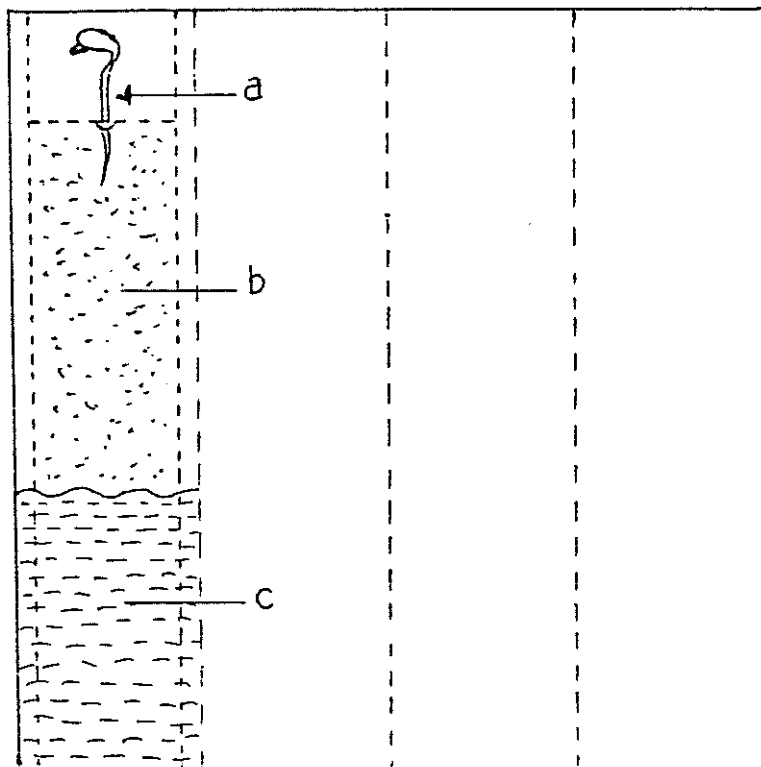


Gambar 4. Skema Pembuatan Karton: a. Skema karton dan kedudukan lipatan (Skala 1 : 2),  
 → ---- tempat lipatan, ○ lubang; b. Skema bentuk karton setelah dilipat apabila dilihat dari samping

kantong penumbuhan yang berisi kecambah siratro tersebut kemudian diletakkan pada rak secara tegak, lalu diinkubasi pada tempat yang cukup cahaya. Bagian akar siratro dilindungi dengan kertas atau plastik berwarna gelap agar tidak terkena cahaya. Kedudukan kantong penumbuhan di dalam rak dapat dilihat pada Gambar 7 di halaman 32. Tanaman diamati secara periodik dan penambahan medium Thornton dilakukan apabila diperlukan supaya tanaman tidak layu. Pembentukan bintil akar terlihat kurang lebih dua minggu setelah inokulasi.

#### Perbanyak Biakan Bakteri Bintil Akar

Galur bakteri bintil akar yang telah diseleksi, ditumbuhkan pada agar miring MEK di dalam tabung reaksi selama 3-10 hari tergantung pada kecepatan pertumbuhannya



Gambar 5. Kedudukan Kecambah Siratro di dalam Kantong Penumbuhan: a. Siratro, b. Karton di dalam kantong plastik dan c. Medium Thornton steril

(tumbuh cepat atau lambat). Untuk memperbanyak biakan ini digunakan sistem bifase. Sistem pertumbuhan bifase ini terdiri dari selapis medium padat yang dilapisi dengan medium cair di dalam labu erlenmeyer dengan perbandingan 3 : 1. Medium yang digunakan adalah manitol-ekstrak khamir (MEK) dengan kandungan agar 1.5 persen.

Biakan di dalam tabung reaksi tersebut dipindahkan sebanyak dua oase (jarum inokulasi) ke dalam labu erlenmeyer



Gambar 6. Penanaman Siratro dengan Menggunakan Kantong Penumbuhan yang Berisi Medium Thornton



Gambar 7. Kedudukan Kantong Penumbuhan di dalam Rak

berukuran 250 ml yang berisi 150 ml medium padat dan 45 ml medium cair, kemudian digoyang-goyangkan di atas "shaker" atau mesin pengocok resiprokal (Eberbach, Corp., MI, USA) pada kecepatan rata-rata 140 ekskursi per menit secara kontinyu (Gambar 8).



Gambar 8. Biakan Bakteri di dalam Medium Bifase yang Digoyang-goyangkan di atas "shaker"

Apabila biakan telah terlihat pekat, jumlah bakteri dihitung dengan hemasitometer. Biakan ini dipanen apabila jumlah sel bakteri sudah mencukupi untuk diinokulasikan ke dalam gembut yaitu antara  $10^8$  sampai  $10^{10}$  sel per gram gembut. Jumlah ini dapat dicapai pada hari kelima setelah pemindahan dari tabung reaksi.

## Inokulasi Bakteri ke dalam Bahan Pembawa Gambut

Pada tahap ini, masing-masing biakan cair dari sepuluh galur yang terpilih yang dihasilkan dari pertumbuhan bifase dihitung kerapatannya, kemudian kesepuluh galur ini dicampur masing-masing dengan jumlah bakteri yang sama.

Sementara itu disiapkan bahan pembawa gambut yaitu dengan mencampur 90 persen gambut dan 10 persen liat (Gru-mosol), kemudian ditambah  $\text{CaCO}_3$  hingga mencapai pH 7. Me-dium campuran gambut ini disterilisasi dengan otoklaf pada suhu  $121^\circ\text{C}$  selama 1 jam. Untuk meningkatkan ketahanan hi-dup bakteri di dalam gambut, maka ke dalam medium campuran gambut tersebut ditambahkan medium cair yang steril dengan dengan susunan manitol,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  dan  $\text{NaCl}$  (Yuto-no, 1981).

Suspensi biakan bakteri dari sistem pertumbuhan bifa-se yang telah disiapkan, diinokulasikan ke dalam medium campuran gambut tersebut di atas hingga jumlah bakteri mi-nimum  $10^9$  sel per gram gambut. Untuk mendapatkan kadar air akhir sebesar 50 persen berat basah, maka ke dalam me-dium campuran gambut itu ditambahkan air steril.

Inokulasi bakteri ke dalam gambut dilakukan di dalam mangkuk pencampur yang dilengkapi dengan pengaduk mekanik. Campuran tersebut kemudian diinkubasi minimal selama 5 ha-ri pada suhu ruang.

## PEMBAHASAN

### Koleksi Bintil

Penyimpanan bintil di dalam botol berulir seperti yang terlihat pada Gambar 1 merupakan metode koleksi bintil yang biasa dipakai (Somasegaran dan Hoben, 1985). Bintil yang dikoleksi dengan metode ini dapat bertahan selama 6 sampai 12 bulan.

Bintil-bintil dikoleksi dari tanaman yang hijau dan segar karena tanaman seperti ini biasanya mempunyai bintil yang besar dan merah yang diduga dapat menambat nitrogen secara efektif.

### Isolasi Bakteri Bintil Akar

Menurut Vincent (1970), bintil akar tanaman pepolongan mengandung mikroorganisme lain selain bakteri bintil akar di permukaan maupun di dalamnya. Oleh karena itu bintil-bintil yang akan diisolasi harus disterilisasi permukaan terlebih dahulu. Namun kemungkinan tumounnya mikroorganisme lain (kontaminan) dapat terjadi tergantung dari ketahanan kontaminan tersebut terhadap bahan desinfektan. Oleh karena itu untuk membedakan koloni antara bakteri bintil akar dan kontaminan tersebut, terutama bakteri Agrobacterium yang mempunyai tipe morfologi koloni sama dengan bakteri bintil akar, digunakan larutan 0.0025 persen merah Kongo yang ditambahkan ke dalam medium agar MEK (Vincent,

1970; Subba Rao, 1982). Pada medium ini koloni bakteri bintil akar akan tampak putih dan tidak menyerap warna merah dari larutan merah Kongo, sedangkan Agrobacterium atau kontaminan lainnya berwarna merah karena dapat menyerap warna merah tersebut.

### Seleksi Bakteri Bintil Akar

Di dalam pengujian pembentukan bakteri bintil akar ini digunakan tanaman siratro sebagai tanaman penguji pendahuluan, karena biji dan tanaman ini berukuran kecil dan tanaman ini dapat membentuk bintil akar hampir dengan semua kelompok inokulasi silang (Somasegaran dan Hoben, 1985).

Penanaman siratro ini dilakukan dengan menggunakan kantong penumbuhan dan tidak menggunakan tabung penumbuhan. Hal tersebut dilakukan karena penanaman dengan menggunakan kantong penumbuhan tidak memerlukan agar dan lebih ekonomis.

Jumlah bakteri bintil akar yang harus diinokulasikan ke biji tanaman bervariasi. Roughley dan Pulsford (1980) berpendapat bahwa dalam kondisi yang menguntungkan inokulasi 100 sel bakteri untuk setiap biji sudah mencukupi tetapi apabila kondisi kurang menguntungkan diperlukan jumlah lebih dari  $10^6$  sel per biji, sedangkan Burton (1979) mengemukakan bahwa jumlah bakteri yang dibutuhkan untuk

setiap biji minimum  $10^3$  sel. Sementara itu, menurut Vincent (1970) jumlah bakteri per biji adalah  $10^3$  sampai  $10^4$  sel.

Berdasarkan beberapa pendapat tersebut maka di dalam pengujian autentikasi ini ditetapkan jumlah bakteri yang diduga dapat mencukupi untuk menginfeksi tanaman siratro adalah sebanyak  $10^6$  sel per benih.

#### Perbanyak Biakan Bakteri Bintil Akar

Biakan yang ditumbuhkan di dalam medium bifase dikenal sebagai biakan pemula atau "kultur starter" (Subba Rao, 1982). Kecepatan pertumbuhan bakteri di dalam medium ini tergantung dari rasio volume medium agar dan medium cair serta ukuran labu erlenmeyer yang digunakan.

Di Laboratorium Mikrobiologi, Universitas Gajah Mada, rasio optimum yang digunakan untuk pertumbuhan bakteri bintil akar adalah 150 ml medium agar dan 45 ml medium cair di dalam labu erlenmeyer berukuran 250 ml (Yutono, 1981).

Penggunaan medium bifase untuk pertumbuhan bakteri bintil akar yang akan digunakan sebagai inokulum sangat baik, karena medium ini menyediakan nutrisi cadangan dalam bentuk padat jika nutrisi dalam medium cair sudah berkurang. Selain itu, medium cair dari sistem bifase ini dapat langsung digunakan sebagai inokulum atau dapat juga disuspensikan di dalam aquades dengan mudah.



Perbanyak biakan bakteri bintil akar yang akan digunakan sebagai inokulum di USA (Nitragin Company) dilakukan dengan menggunakan fermentor-fermentor yang besar yang dilengkapi dengan peralatan yang rumit untuk sterilisasi uap, formulasi media, pengawasan buih dan untuk pemantauan pertumbuhan, sedangkan di Australia hanya dengan menggunakan bejana yang berbentuk silindris dengan kapasitas 100 liter yang berisi medium sebanyak 50 liter (Yutono, 1987). Namun menurut hasil penelitian di Australia cara yang sederhana itu hasilnya lebih baik dari pada cara yang rumit di USA.

#### Inokulasi Bakteri ke dalam Bahan Pembawa Gambut

Sebelum dilakukan inokulasi ke dalam gambut perlu diadakan seleksi galur bakteri bintil akar yang akan digunakan sebagai inokulum. Burton (1979) dan Thompson (1980) secara terpisah mengemukakan beberapa kriteria yang perlu diperhatikan di dalam upaya menyeleksi galur-galur bakteri bintil akar untuk inokulum yaitu bakteri harus bersifat infeksiif, artinya dapat membentuk bintil akar pada tanaman inang yang serasi; kemudian bakteri harus bersifat efektif; kompetitif; dan mampu bertahan dalam keadaan kurang menguntungkan, artinya dapat tumbuh dengan baik di dalam biakan, medium pembawa maupun di dalam tanah setelah biji yang diinokulasi ditanam, serta bertahan hidup di dalam tanah dari musim ke musim.

Berkaitan dengan itu, dalam tahap penyiapan inokulum bakteri yang akan digunakan di dalam inokulan Legin, selain uji autentikasi dilakukan pula uji keefektifan bakteri dalam menambat nitrogen baik dalam kondisi yang terkendali maupun kondisi lapang. Pengujian keefektifan di dalam kondisi yang terkendali dilakukan dengan menggunakan botol Leonard yang dimodifikasi yang diletakkan di rumah kaca. Keefektifan bakteri ini dibandingkan hanya terhadap kontrol nitrogen, dan penetapannya didasarkan pada nilai bobot kering tanaman dan aktivitas nitrogenase.

Inokulum yang dibuat untuk Legin kedelai merupakan inokulum multigalur yang terdiri dari 10 galur bakteri bintil akar yang efektif. Tujuan digunakannya inokulum multigalur ini adalah kisaran inang yang luas, mengingat besarnya variasi kondisi lahan dan iklim serta banyaknya varietas kedelai yang ditanam petani di Indonesia (Hartadi, Komunikasi pribadi).

Namun inokulum multigalur ini mempunyai kelemahan yaitu kemungkinan dapat terjadi munculnya satu galur yang dominan karena adanya perbedaan kecepatan pertumbuhan, perbedaan ketahanan terhadap lingkungan yang kurang menguntungkan atau adanya pengaruh-pengaruh yang antagonistis. Selain itu dapat juga terjadi adanya persamaan kerabat di antara galur-galur tersebut sehingga dapat dianggap sebagai satu galur atau galur tunggal.

Dalam pembuatan Legin ini, jumlah bakteri yang diinokulasikan ke dalam gambut minimum  $10^9$  sel per gram gambut. Jumlah sel persatuan banan pembawa ini berhubungan dengan jumlah sel yang diterima oleh setiap butir biji. Untuk 1 hektar lahan kedelai diperlukan 40-50 kg biji kedelai (setiap kilogram kedelai berisi  $10^4$  butir biji), dan untuk menginokulasi sejumlah biji tersebut diperlukan 150 g gambut, sehingga jumlah gambut yang diperlukan untuk setiap biji adalah  $3 \times 10^{-4}$  sampai  $3.75 \times 10^{-4}$  g atau setara dengan jumlah bakteri sebanyak  $3 \times 10^5$  sampai  $3.75 \times 10^5$  sel.

Di Australia, jumlah bakteri bintil akar yang diinokulasikan ke dalam gambut adalah  $1 \times 10^9$  sel per gram gambut untuk gambut yang tidak steril, sedangkan untuk gambut yang steril  $1 \times 10^8$  sel (Roughley dan Pulsford, 1980). Namun di Canada, jumlah sel bakteri per gram gambut adalah  $1 \times 10^6$  (Somasegaran dan Hoben, 1985), sedangkan di USA jumlah minimum sel bakteri per gram gambut adalah  $3 \times 10^8$  (Subba Rao, 1982).

Kelangsungan hidup biakan bakteri dipengaruhi oleh kelembaban dan suhu penyimpanan inokulan. Thompson (1980) menelaah bahwa kehilangan kelembaban 24 persen per minggu pada suhu  $5^{\circ}\text{C}$  menyebabkan rata-rata kematian 0.085 per minggu dan menurun sampai 0.001 apabila kehilangan kelembaban 0.7 persen per minggu. Ditambahkan pula bahwa terdapat interaksi antara bakteri bintil akar dengan

kontaminan pada tingkat kelembaban tertentu. Kelembaban optimum untuk gambut tidak steril berkisar 40-50 persen, sedangkan untuk gambut steril berkisar 40-60 persen.

Burton (1979) mengemukakan bahwa jumlah sel bakteri bintil akar yang hidup tetap tinggi di dalam inokulan dengan bahan pembawa gambut yang telah disimpan selama lebih dari 12 bulan pada suhu 4-8°C. Namun menurut Thompson (1984) pertumbuhan bakteri bintil akar yang tumbuh cepat sedikit menurun setelah disimpan lebih dari 12 bulan pada suhu 4°C, sedangkan pada suhu 26°C biasanya turun lebih banyak. Akan tetapi ketahanan hidup galur-galur yang tumbuh lambat di dalam inokulan tetap tinggi pada suhu 26°C dan penurunan terjadi pada suhu 4°C. Roughley dan Pulsford (1980) menambahkan pula bahwa tidak semua galur yang tumbuh lambat di dalam inokulan menyukai penyimpanan pada suhu rendah.

## KESIMPULAN

Penyiapan inokulum bakteri bintil akar dalam pembuatan inokulan Legin terdiri dari beberapa tahap yaitu pembi-naan koleksi bintil, mengisolasi dan menyeleksi bakteri binti akar, memperbanyak biakan serta menginokulasi bakte-ri ke dalam bahan pembawa gambut.

Pengelolaan inokulan Legin ditangani oleh para Staf Jurusan Mikrobiologi, Fakultas Pertanian, Universitas Ga-jah Mada, Yogyakarta. Inokulan Legin ini merupakan inoku-lan multigalur yang terdiri dari 10 galur bakteri bintil akar yang efektif. Sebagai bahan pembawanya adalah gambut. Jumlah sel bakteri yang diinokulasikan untuk setiap gram gambut adalah  $10^9$  sel, sedangkan untuk setiap biji kedelai berkisar  $3 \times 10^5$  sampai  $3.75 \times 10^5$  sel bakteri.



## DAFTAR PUSTAKA

- Alexander, M. 1977. Introduction to soil microbiology. John Wiley and Sons, New York.
- Brockwell, J. 1980. Experiments with crop and pasture legumes-principles and practice. p. 417-488. In F. J. Bergersen, ed. Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation. John Wiley and Sons, Australia.
- Brock, T. D. and Madigan, M. T. 1988. Biology of micro-organism. Fifth edition. Prentice Hall, New Jersey.
- Burton, J. C. 1979. Rhizobium species. p. 29-57. In H. J. Peppler and D. Perlman, eds. Microbial Technology I. Academic Press, New York.
- Chowdhury, M. S. 1977. Effects of soil antagonists on symbiosis. p. 385-411. In J. M. Vincent, A. S. Whitney and J. Boose, eds. Exploiting The Legume-Rhizobium Symbiosis in Tropical Agriculture. Dept. Agron. and Soil Sci. Univ. of Hawaii.
- Dawes, I. W. and Sutherland, I. W. 1976. Microbial Physiology vol. 4. John Wiley and Sons, New York.
- Departemen Pertanian. 1982. Gemø Penyuluhan Pertanian. No. 24 (V): 41-46.
- Frederick, L. R. 1978. Effectiveness of rhizobia-legume associations. p. 265-276. In C. S. Andrew and E. J. Kamprath, eds. Mineral Nutrition of Legumes in Tropical and Subtropical Soils. Commonwealth Sci. and Industrial Res. Organization, Australia.
- Hartadi, S dan S. Kabirun. 1983. Pengujian nodulasi inokulan-Rhizobium menggunakan tanaman siratro (Macrop-tilium atropurpureum). Dept. Mikrobiologi. Faperta. UGM, Yogyakarta.
- Jordan, D. C. 1984. Family III. Rhizobiaceø Conn 1938. p. 234-244. In N. R. Kreig and J. G. Holt, eds. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 9<sup>th</sup> ed., vol. 1. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- Juwarkar, A. and R. B. Rewari. 1988. Synergistic effect of relative humidity and temperature on the survival of rhizobia in inoculant carrier. J. of Appl. Bacteriology (64): 465-469.

- Larue, T. A. 1980. Host plant genetics and enhancing symbiotic nitrogen fixation. p. 355-363. In W. D. P. Stewart and J. R. Gallon, eds. Nitrogen Fixation. Academic Press, London.
- Roughley, R. J. and D. J. Pulsford. 1980. Production and control of legume inoculant. p. 4-12. In Res. for Development Seminar on "Nitrogen Fixation by Legumes for Tropical Agriculture". Sydney, Australia.
- Sahni, V. P. 1977. Inoculants for India. p. 413-419. In J. M. Vincent, ed. Exploiting The Legume-Rhizobium Symbiosis in Tropical Agriculture. Univ. of Hawaii.
- Sæono, S. 1988. Biological nitrogen fixation in food legumes. p. 1-17. In Working Groups Meeting and Workshop, Thailand.
- \_\_\_\_\_ and H. Karsono. 1981. Ketahanan hidup dan kemampuan membentuk bintil akar biak Rhizobium yang disimpan dalam tanah gambut. LIPI. Berita Biologi II (6): 123.
- Schreven, D. A. V. 1970. Some factors affecting growth and survival of Rhizobium spp. in soil-peat cultures. Plant and Soil (32): 113-130.
- Sihombing, D. A. 1986. Prospek penggunaan inokulum rhizobium. Proceedings Pertemuan Tehnis dan Evaluasi Penggunaan Legin, Jakarta.
- Soedarsono, J. dan Soesanto. 1983. Telaah penambatan nitrogen I, penjajagan daya penambatan nitrogen dan pembentukan nodul akar kecipir. Jurusan Mikrobiologi, Faperta, UGM, Yogyakarta.
- Soeprapto, H. S. 1982. Bertanam kacang hijau. PT. Penebar Swadaya, Jakarta.
- Somasegaran, P. H. and H. Hoben. 1985. Methods in legume-rhizobium technology. University of Hawaii NIFTAL Project and MIRCEN. Dept. Agron. Soil Sci., Hawaii.
- Steward, F. C. 1963. Plant Physiology. Academic Press, New York.
- Stowers, M. D. and G. H. Elkan. 1980. Criteria for selecting ineffective and efficient strains of rhizobium for use in tropical legumes. North Carolina Agricultural Res. Service. Tech. Bul. No. 264.

Subba Rao, N. S. 1982. Biofertilizers in agriculture. Oxford and IBH Publishing Co., New Delhi.

Thompson, J. A. 1980. Production and quality control of legume inoculants. p. 489-533. In F. J. Bergersen, ed. Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation. John Wiley and Sons, Australia.

\_\_\_\_\_. 1984. Production and quality control of carrier-based legume inoculants. ICRISAT. Information Bul. No. 17: 1-37.

Vincent, J. M. 1970. A Manual for the practical study of the root nodule bacteria. IBP Handbook No. 15. Blackwell Sci. Publications. Oxford and Edinburgh.

Yutono. 1981. The application of Rhizobium-inoculant on soybean in Indonesia. Regional workshop on Res. Adv. in Agric. Microbiology in Southeast Asia, Bogor.

\_\_\_\_\_. 1986. Produksi inokulum rizobium dan masalahnya. Proceedings Pertemuan Tehnis dan Evaluasi Penggunaan Legin, Jakarta.

\_\_\_\_\_. 1987. Bioteknologi pupuk hayati. Makalah Seminar Bioteknologi Indonesia, Yogyakarta.





## LAMPIRAN

Hak Cipta: Pribadi/Orbita Cipta/Orbita Cipta

1. Diizinkan menggunakan sebagai sumber referensi yang lain.
2. Tidak diperbolehkan untuk diperjualbelikan atau untuk tujuan komersial.
3. Tidak diperbolehkan untuk diperjualbelikan atau untuk tujuan komersial.
4. Tidak diperbolehkan untuk diperjualbelikan atau untuk tujuan komersial.
5. Tidak diperbolehkan untuk diperjualbelikan atau untuk tujuan komersial.
6. Tidak diperbolehkan untuk diperjualbelikan atau untuk tujuan komersial.
7. Tidak diperbolehkan untuk diperjualbelikan atau untuk tujuan komersial.
8. Tidak diperbolehkan untuk diperjualbelikan atau untuk tujuan komersial.
9. Tidak diperbolehkan untuk diperjualbelikan atau untuk tujuan komersial.
10. Tidak diperbolehkan untuk diperjualbelikan atau untuk tujuan komersial.

Lampiran 1. Kelompok Inokulasi Silang (Alexander, 1977)

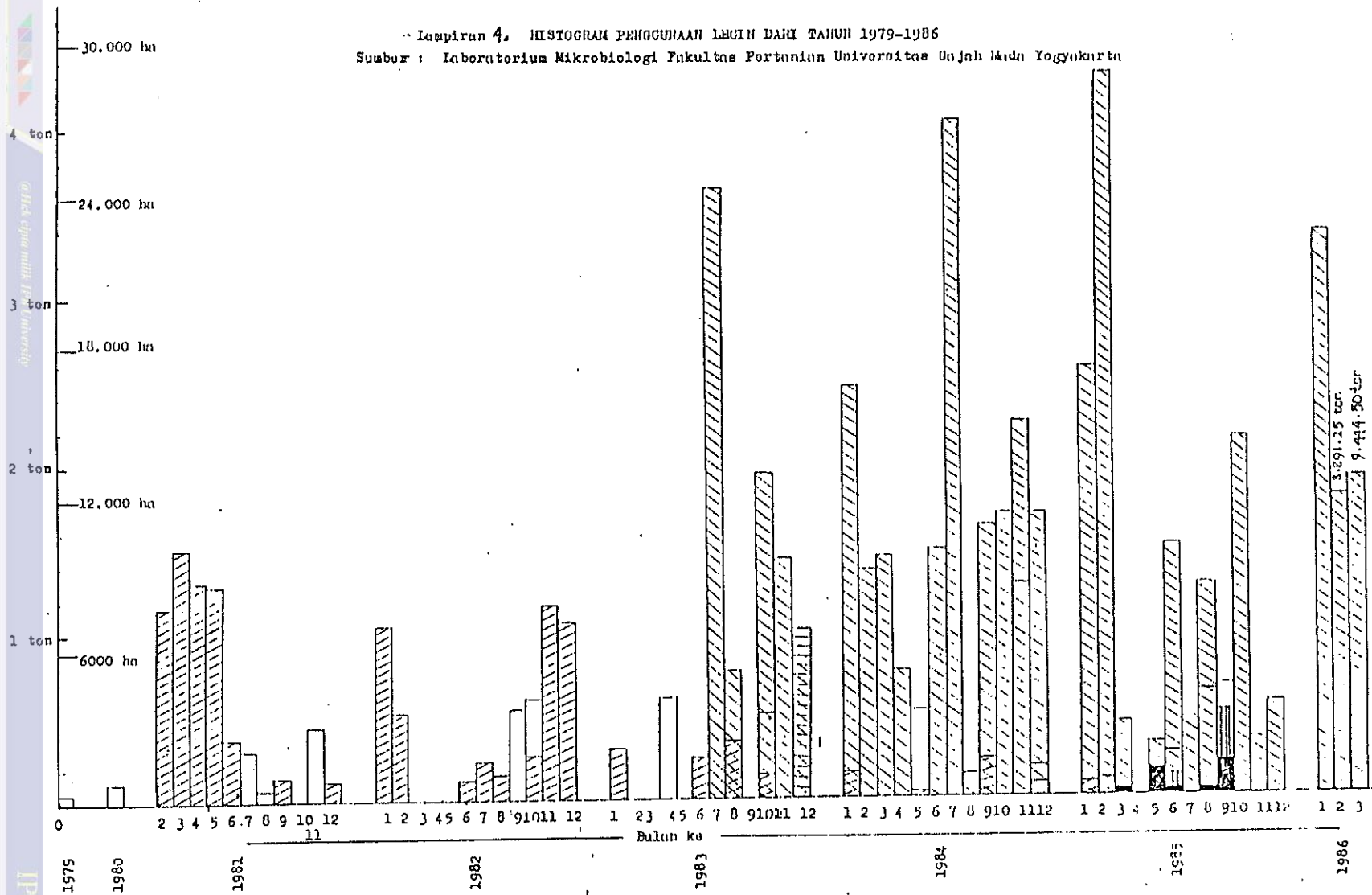
Kelompok Inokulasi Silang	Spesies <u>Rhizobium</u>	Genus Tanaman Inang
Kelompok "Alfalfa"	<u>R. meliloti</u>	<u>Medicago, Melilotus, Trigonella</u>
Kelompok "Clover"	<u>R. trifolii</u>	<u>Trifolium</u>
Kelompok "Pea"	<u>R. leguminosarum</u>	<u>Pisum, Vicia, Lathyrus, Lens</u>
Kelompok "Bean"	<u>R. phaseoli</u>	<u>Phaseolus</u>
Kelompok "Lupine"	<u>R. lupini</u>	<u>Lupinus, Ornithopus</u>
Kelompok "Soybean"	<u>R. japonicum</u>	<u>Glycine</u>
Kelompok "Cowpea"	-	<u>Vigna, Lespedeza, Crotalaria, Pueraria, Arachis, Phaseolus</u>

Lampiran 2. Tanaman-tanaman Inang yang Dapat Digunakan untuk Uji Autentikasi Bakteri Bintil Akar (Somasegaran dan Hoben, 1985)

"Parent Host"	Inang untuk Autentikasi
<u>Phaseolus vulgaris</u> , <u>P. coccineus</u>	parent host
<u>P. acutifolius</u>	parent host
<u>Medicago</u> spp., <u>Melilotus</u> spp., dan <u>Trigonella</u> sp.	parent host atau <u>Medicago sativa</u>
<u>Trifolium</u> spp.	parent host
<u>Pisum</u> spp., <u>Vicia</u> spp., dan <u>Lens culinaris</u>	parent host atau <u>Vicia faba</u>
<u>Glycine max</u>	parent host
<u>Lupinus</u> spp. dan <u>Ornithopus</u> sp.	parent host
<u>Sesbania</u> spp.	parent host
<u>Leucaena leucocephala</u> dan <u>L. diversifolia</u>	parent host atau <u>L. leucocephala</u>
<u>L. retusa</u>	parent host
<u>Lotononis bainesii</u>	parent host
<u>Cicer arietinum</u>	parent host
<u>Calliandra</u> spp.	parent host
<u>Acacia senegal</u>	parent host
<u>A. auriculæformis</u> , <u>A. mearnsii</u> <u>A. albida</u> , <u>Arachis hypogea</u> , <u>A. glabarata</u> , <u>Alysicarpus vaginalis</u> , <u>Cajanus cajan</u> , <u>Calopogonium mucunoides</u> , <u>Canavalia</u> spp., <u>Stylosanthes</u> spp., <u>Aeschomene</u> spp., <u>Macrotyloma</u> spp., <u>Glycine wightii</u> (syn. <u>Neonotonia wightii</u> ), <u>Voandzeia</u> <u>subterranea</u> , <u>Desmodium</u> spp. dan <u>Centrosema</u> spp.	parent host atau siratro ( <u>Macroptilium atropurpureum</u> )
<u>Crotalaria</u> spp., <u>Clitoria</u> spp., <u>Lablab purpureus</u> , <u>Cyamopsis tetragonoloba</u> , <u>Psophocarpus tetragonolobus</u> , <u>Vigna</u> spp., <u>Phaseolus lunatus</u> , <u>Zornia</u> spp., <u>Pachyrrhizus</u> sp., <u>Sphenostylis macrocarpa</u> dan <u>Macroptilium</u> spp.	parent host atau siratro ( <u>Macroptilium atropurpureum</u> )



Lampiran 4. HISTOGRAM PENGGUNAAN LAGIN DARI TAHUN 1979-1986  
 Sumber : Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Pertanian Universitas Gajah Mada Yogyakarta



Keterangan :   
 [Hatched] Penggunaan Lagin oleh Proyek Pembinaan Pertanian Dengan Daerah Transmigrasi (P.J.D)   
 [Diagonal Lines] Penggunaan Lagin oleh PT Pertani untuk INRUS Kedelai   
 [White] Penggunaan Lagin oleh PT Putra tani, PT Kapas Indah Indonesia, Petani dan lain-lain   
 [Horizontal Lines] Penggunaan Lagin Lantoro-gung oleh Diwun Jawa-Barat   
 [Vertical Lines] Penggunaan Lagin Penutup tanah oleh PT Perkebunan dan lain-lain   
 [Cross-hatched] Penggunaan Lagin Kacang tanah oleh Petani dan lain-lain

Lampiran 5. Komposisi Medium Agar Manitol Ekstrak Khamir (Vincent, 1970)

Komponen Medium	Jumlah
Manitol	10.0 g
$K_2HPO_4$	0.5 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2 g
NaCl	0.1 g
Ekstrak Khamir	0.5 g
Agar (Bacto)	15.0 g
Air suling	1000.0 ml

Medium diautoklaf pada suhu  $121^{\circ}C$  selama 15 menit. Bila diperlukan penambahan zat warna merah Kongo (Congo red) maka larutan zat pewarna tersebut disterilkan secara terpisah dan ditambahkan ke dalam medium segera sebelum penuangan ke dalam cawan. Zat warna ini biasanya ditambahkan sehingga mencapai konsentrasi akhir 0.0025 persen.