



Sesungguhnya Allah menyuruh (kamu) berlaku adil dan berbuat kebajikan, memberi kepada kaum kerabat, dan Allah melarang dari perbuatan keji, kemungkaran dan permusuhan. Dia memberi pengajaran kepadamu agar kamu dapat mengambil pelajaran.

(QS An Nah1: 90)

untuk:
kakakku mbak Lies, mbak Wiek,
mbak Endang, mas Bambang
adikku Luluk, Erni, Ida
dan Leni

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



6/810/1991/005

UJI AGLUTINASI GALUR-GALUR BAKTERI BINTIL AKAR KEDELAI TUMBUH LAMBAT DAN EFEKTIF

JOKO TRI HADI



JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
1991

- Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
 2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



RINGKASAN

JOKO TRI HADI. Uji Aglutinasi Galur-Galur Bakteri Bintil Akar Kedelai Tumbuh Lambat dan Efektif (Di bawah bimbingan TEDJA IMAS, JUSTINA SRI POERNOMO, dan ANJA MERYANDINI).

Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari reaksi aglutinasi yang terbentuk di antara galur-galur bakteri bintil akar kedelai tumbuh lambat dan efektif. Dari reaksi yang terbentuk galur-galur tersebut dikelompokkan berdasarkan kesamaan atau kekerabatan antigeniknya, mengingat sumber-sumber galur tersebut masih terletak pada lokasi yang berdekatan.

Pengujian dilakukan dengan mereaksikan antigen dan antibodi di dalam cawan plastik bercekung yang diinkubasikan dalam penangas air bersuhu 52⁰C selama 2 jam, 4 jam dan diapakan selama 24 jam di dalam refrigerator (lemari es bersuhu 4⁰C). Reaksi aglutinasi positif ditandai dengan terbentuknya gumpalan agregat besar sampai kecil berupa butiran-butiran halus dengan cairan jernih disekitarnya.

Hasil reaksi aglutinasi dengan cawan plastik bercekung, setelah dibiarkan di dalam penangas air bersuhu 52⁰C selama 2 jam dan 4 jam tidak berbeda hasilnya bila diamati langsung dengan mikroskop binokuler. Dengan demikian variasi perlakuan pemanasan di dalam penangas air bersuhu 52⁰C selama 2 jam dan 4 jam ternyata tidak mempengaruhi penampilan reaksi aglutinasi yang terbentuk, dengan perkataan

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



lain reaksi aglutinasi flagelar dan somatik pada penelitian ini sukar dibedakan. Pembentukan reaksi aglutinasi tampak lebih tegas setelah diterapkan selama 24 jam dalam refrigerator (lemari es bersuhu 4°C).

Dari 12 galur uji, 3 menunjukkan reaksi yang tampak kuat pada galur 47, 43 dan 42, sedangkan 9 lainnya tampak lemah pada galur 50, 30, 28, 26, 23, 20, 18 dan 07 dalam reaksi antara antigen dengan antibodi homolognya. Dua galur standar (53 dan 52) juga menunjukkan reaksi yang tampak kuat.

Hasil pengujian reaksi aglutinasi silang (dari 182 reaksi yang dilakukan) sebagian besar (80.77%) tidak bereaksi dan hanya 35 (19.23%) yang menunjukkan terjadinya pembentukan gumpalan positif. Dari 35 reaksi yang terbentuk, 1 diantaranya menunjukkan reaksi yang tampak sangat kuat (Antigen 42-Antiserum 28), 13 tampak kuat, dan 21 lainnya tampak lemah. Kuat lemahnya reaksi ditetapkan berdasarkan gumpalan yang terbentuk dibandingkan reaksi homolog. Dengan demikian secara serologis galur-galur bakteri bintil akar kedelai tersebut ada yang sekerabat.

Dari hasil uji aglutinasi, galur-galur uji dapat dibedakan berdasarkan ciri-ciri antigeniknya. Perbedaan yang kecil diantara galur dapat terhimpun dalam suatu kelompok, masing-masing yaitu kelompok galur 43, 23 dan 07; kelompok galur 50, 47 dan 20; kelompok galur 42, 30 dan 28; kelompok galur 25 dan 18, sedangkan galur 53 dan 26 merupakan galur

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



@Hak cipta milik IPB University

yang berbeda dari galur lainnya karena antigennya masing-masing hanya dikenali oleh antiserumnya sendiri; galur 52 dapat dikenali juga oleh antiserum dari galur 53.

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.





**UJI AGLUTINASI
GALUR-GALUR BAKTERI BINTIL AKAR KEDELAI
TUMBUH LAMBAT DAN EFEKTIF**

JOKO TRI HADI

**Laporan Penelitian Masalah Khusus
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
1991**

Judul Penelitian : UJI AGLUTINASI
GALUR-GALUR BAKTERI BINTIL AKAR KEDELAI
TUMBUH LAMBAT DAN EFEKTIF

Nama Mahasiswa : JOKO TRI HADI

Nomor Induk : G 22 1327

Menyetujui,

Komisi Pembimbing



Ir. Tedja Imas, MS.
Ketua



Justina Sri Purnomo, B.Sc
Anggota



Dra. Anja Meryandini, MS.
Anggota



Mengetahui,



Ikin Mansioer, MSc.
Ketua Jurusan Biologi

Tanggal Lulus : 23 JUL 1991

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di kota Pahlawan Surabaya, pada tanggal 6 Mei 1965, dari ayah R. Misman Sastroadmodjo (almarhum), dan ibu Harsiyati (almarhumah). Penulis, anak ketiga dari tujuh bersaudara.

Pada tahun 1985, penulis menyelesaikan pendidikan di Sekolah Menengah Atas Negeri 38 Jakarta, dan diterima sebagai mahasiswa di Institut Pertanian Bogor melalui program Penelusuran Minat dan Kemampuan (PMDK). Selanjutnya, tahun 1986 memilih Jurusan Biologi pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, dengan mengambil bidang keahlian Mikrobiologi, pada tahun 1987.

Selama di IPB, penulis mengikuti organisasi ekstrakurikuler, dan pernah menjabat sebagai Ketua Bidang Pendidikan Himpunan Mahasiswa Biologi (HIMABIO) dan staf redaksi CEPHALOS Majalah Mahasiswa Biologi (1987-1988). Kepala Divisi Produksi Penerbitan Surat Kabar Kampus Mahasiswa GEMA ALMAMATER-IPB (1988-1989 dan 1989-1990), sekaligus anggota LITBANG (Penelitian dan Pengembangan) (1989-1990). Selain itu turut serta pula sebagai anggota Divisi Produksi Penerbitan Buku AGENDA-IPB 1990. Penulis pernah juga menjadi Asisten Luar Biasa pada Mata Ajaran Biologi Umum dan Botani Umum berturut-turut tahun 1987-1988, dan 1988-1989.

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT., yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya sehingga penelitian dan penulisan laporan ini dapat terselesaikan.

Laporan penelitian masalah khusus ini merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Biologi, pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor.

Pada kesempatan ini penulis menyampaikan rasa terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Ibu Ir. Tedja Imas, MS atas petunjuk, pengarahan dan bimbingan yang diberikan selama pelaksanaan penelitian hingga penulisan laporan ini. Kepada Ibu Justina Sri Poernomo, B.Sc yang telah memberikan kesempatan melaksanakan penelitian, menggunakan sarana dan fasilitas di Laboratorium Bakteriologi, Balai Penelitian Veteriner (BALITVET), Bogor dan atas bimbingannya dalam penelitian serta dalam penulisan laporan ini. Kepada Ibu Dra. Anja Meryandini, MS atas bimbingannya dan sarannya, penulis ucapkan terima kasih.

Ucapan terima kasih penulis sampaikan pula kepada:

1. Bapak Drh. Ikin Mansjoer MSc., selaku Dosen Penguji Wakil dari Komisi Pendidikan yang telah memberikan saran-saran demi perbaikan laporan ini.

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



2. Bapak Dr. Purnomo Ronohardjo, selaku Kepala Balai Penelitian Veteriner (BALITVET) Bogor yang telah mengizinkan penulis melaksanakan penelitian di Laboratorium Bakteriologi.
2. Bapak Drh. Soebiyono selaku Pimpinan Balai Pembibitan Ternak dan Hijauan Makanan Ternak, UPT Cisarua Bogor atas perhatian dan bantuannya kepada penulis dalam memperoleh kelinci percobaan.
3. Pak Iskandar, Kang Yakub, dan Mang Gino yang telah banyak membantu penulis selama pelaksanaan penelitian.
4. Mbak Lies dan Mas Yoyok pengganti orang tua penulis yang telah memberikan kesempatan untuk menempuh pendidikan sampai di Perguruan Tinggi.
5. Rekanku Ir. Budhi Priyanto yang selalu setia menemani perbaikan dalam penulisan laporan ini.
6. Seluruh pegawai Laboratorium Mikrobiologi FMIPA-IPB dan Laboratorium Bakteriologi BALITVET Bogor, serta sahabat-sahabat penulis terutama Edhi Sandra, Mat Sahudi, dan Drajat Nugraha yang turut membantu kelancaran pelaksanaan penelitian dan penulisan laporan ini.

Akhirul kata, mudah-mudahan laporan yang sederhana dan jauh dari kesempurnaan ini dapat memberikan masukan bagi peneliti lainnya dan bermanfaat bagi yang membutuhkannya.

Bogor, Juli 1991

Joko Tri Hadi

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :

- a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xiv
PENDAHULUAN	1
Latar Belakang	1
Tujuan Penelitian	4
Manfaat Penelitian	5
TINJAUAN PUSTAKA	6
Bakteri Bintil Akar Kedelai.....	6
Galur Bakteri Bintil Akar Kedelai Efektif	10
Serologis Bakteri Bintil Akar	12
Metode Serologis	13
Reaksi Serologis	14
Uji Aglutinasi	21
Aglutinasi Flagelar	24
Aglutinasi Somatik	24
BAHAN DAN METODE	26
Tempat dan Waktu Penelitian	26
Galur-Galur Bakteri yang Diuji	26
Morfologi Koloni Galur-Galur Uji	27
Waktu Generasi Galur-Galur Uji	27
Penyiapan Antigen	30
Produksi Antiserum	31

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
 1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
 2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



Penyuntikan Antigen untuk Imunisasi	31
Pengambilan Darah dan Penyimpanan Serum	35
Uji Aglutinasi	39
HASIL DAN PEMBAHASAN	43
Hasil Pengamatan	43
Pembahasan	57
KESIMPULAN DAN SARAN	69
Kesimpulan	69
Saran	71
DAFTAR PUSTAKA	73
LAMPIRAN	77

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

DAFTAR TABEL

No	<u>Teks</u>	Halaman
1.	Prosedur Penyuntikan Antigen ke dalam Tubuh Kelinci (Modifikasi dari Ariyanto, 1988)	36
2.	Prosedur Penyuntikan Antigen ke dalam Tubuh Kelinci (Modifikasi dari Schmidt, Bankole, dan Bohlool, 1968)	37
3.	Ciri-ciri Koloni Galur Uji di atas Medium Agar Cawan MEK + Merah Kongo pada suhu 28 ^o C, setelah 7 hari.....	44
4.	Nilai Titer Antiserum pada hari ke-14, 28, 49 dan 63.....	49
5.	Reaksi Galur-Galur Bakteri Bintil Akar Kedelai berdasarkan Uji Aglutinasi.....	55
6.	Uji Aglutinasi Silang antara Antigen-Antibodi pada Galur yang sama dan Jenis Reaksinya.....	56
7.	Pengelompokan Galur-Galur Bakteri Bintil Akar Kedelai berdasarkan Uji Aglutinasi.....	68
 <u>Lampiran</u> 		
1.	Komposisi Medium Agar MEK	78
2.	Komposisi Medium Sintetik	79
3.	Penyiapan Larutan BaSO ₄ Standar McFarland dan Perkiraan Tingkat Kerapatan sel/ml	80
4.	Rata-rata Bobot Kering Tajuk Tanaman Kedelai var. Wilis (45 HST) dan Nilai Efektivitas Simbiotik Galur-Galur Bakteri Bintil Akar Kedelai	81
5.	Korelasi antara Jumlah sel per ml dan Nilai Rapat Optis (OD ₆₂₀) Galur 53 pada berbagai Tingkat Pengenceran	82

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
 1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
 2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

6. Korelasi antara Jumlah sel per ml dan Nilai Rapat Optis (OD_{620}) Galur 52 pada berbagai Tingkat Pengenceran	83
7. Korelasi antara Jumlah sel per ml dan Nilai Rapat Optis (OD_{620}) Galur 50 pada berbagai Tingkat Pengenceran	84
8. Korelasi antara Jumlah sel per ml dan Nilai Rapat Optis (OD_{620}) Galur 47 pada berbagai Tingkat Pengenceran	85
9. Korelasi antara Jumlah sel per ml dan Nilai Rapat Optis (OD_{620}) Galur 43 pada berbagai Tingkat Pengenceran	86
10. Korelasi antara Jumlah sel per ml dan Nilai Rapat Optis (OD_{620}) Galur 42 pada berbagai Tingkat Pengenceran	87
11. Korelasi antara Jumlah sel per ml dan Nilai Rapat Optis (OD_{620}) Galur 30 pada berbagai Tingkat Pengenceran	88
12. Korelasi antara Jumlah sel per ml dan Nilai Rapat Optis (OD_{620}) Galur 28 pada berbagai Tingkat Pengenceran	89
13. Korelasi antara Jumlah sel per ml dan Nilai Rapat Optis (OD_{620}) Galur 26 pada berbagai Tingkat Pengenceran	90
14. Korelasi antara Jumlah sel per ml dan Nilai Rapat Optis (OD_{620}) Galur 25 pada berbagai Tingkat Pengenceran	91
15. Korelasi antara Jumlah sel per ml dan Nilai Rapat Optis (OD_{620}) Galur 23 pada berbagai Tingkat Pengenceran	92
16. Korelasi antara Jumlah sel per ml dan Nilai Rapat Optis (OD_{620}) Galur 20 pada berbagai Tingkat Pengenceran	93
17. Korelasi antara Jumlah sel per ml dan Nilai Rapat Optis (OD_{620}) Galur 18 pada berbagai Tingkat Pengenceran	94
18. Korelasi antara Jumlah sel per ml dan Nilai Rapat Optis (OD_{620}) Galur 07 pada berbagai Tingkat Pengenceran	95

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
 1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
 2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



19. Waktu Generasi Rata-rata dan pH Biakan Galur-Galur Bakteri Bintil Akar Kedelai di dalam Medium Kaldu MEK	96
20. Hasil Pengamatan Pertumbuhan Galur-Galur Bakteri Bintil Akar Kedelai Efektif	97

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

DAFTAR GAMBAR

No	<u>Teks</u>	Halaman
1	Antigen Eksternal Bakteri Gram Negatif (Pelczar dan Reid, 1972)	16
2	Monomer Molekul Immunoglobulin G (Pelczar dan Chan, 1981)	20
3	Respon Primer dan Sekunder terhadap Kadar Antibodi dalam Serum (Brock dan Brock, 1973)	21
4	Uji Aglutinasi antara Antigen Sel Bakteri dengan Antiserum (Ab) yang Homolog (Pelczar dan Chan, 1981)	23
5	Kurva Umum Pertumbuhan Galur Bakteri Bintil Akar Kedelai berdasarkan Model Persamaan Logistik (Hasibuan, 1988)	28
6	Bagan Proses Penyiapan Antigen	32
7	Skema Penentuan Titer Antiserum dengan Pengenceran Tabung	34
8	Kurva Standar Galur-Galur Uji yang menyatakan Hubungan antara Jumlah Organisme (sel/ml) dengan Nilai Rapat Optis (OD ₆₂₀)	41
9	Morfologi Koloni Galur Uji Metode Cawan Gores di atas Medium Agar MEK + Merah Kongo, setelah 7 hari inkubasi pada suhu 28 ^o C, (A) Galur 50 (B) Galur 42	45
10	Morfologi Koloni dua Galur Uji di atas Medium Agar Cawan MEK + Merah Kongo, (A) Tipe Koloni Small Dry (LM) (Galur 30), (B) Tipe Koloni Large Mucoid (LM) dan Small Dry (SD) (Galur 50)	45
11	Hasil Kurva Pertumbuhan Galur-Galur Uji berdasarkan Model Persamaan Logistik (Hasibuan, 1988)	46

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

12	Siapan Antiserum Galur-Galur Uji yang dihasilkan Antigen Homolognya	48
13	Hubungan dosis Antigen (Galur 53, 52, 50, 42, 30, 20 dan 18) pada hari ke-14, 28, 49, dan 63 terhadap Nilai Titer Antiserum	50
14	Reaksi Aglutinasi Antigen-Antibodi di dalam Cawan Plastik Bercekung, (A) Reaksi positif (Antigen 42 dengan Antiserum 28), (B) Reaksi negatif (Antigen 26 dengan Antiserum 28)	52
15	Reaksi Aglutinasi Positif antara Antigen 42 dengan Antiserum 53, 52, 42 dan 28	53
16	Reaksi Aglutinasi Positif antara Antigen 43 dengan Antiserum 43, 23, 18 dan 07	53
17	Reaksi Aglutinasi Negatif antara Antigen 26 dengan Antiserum 53, 52, 42 dan 28)	54

Lampiran

1	Kurva Standar Galur 53 yang menyatakan Hubungan Jumlah Organisme (sel/ml) dengan nilai rapat Optis (OD_{620})	82
2	Kurva Standar Galur 52 yang menyatakan Hubungan Jumlah Organisme (sel/ml) dengan nilai rapat Optis (OD_{620})	83
3	Kurva Standar Galur 50 yang menyatakan Hubungan Jumlah Organisme (sel/ml) dengan nilai rapat Optis (OD_{620})	84
4	Kurva Standar Galur 47 yang menyatakan Hubungan Jumlah Organisme (sel/ml) dengan nilai rapat Optis (OD_{620})	85
5	Kurva Standar Galur 43 yang menyatakan Hubungan Jumlah Organisme (sel/ml) dengan nilai rapat Optis (OD_{620})	86
6	Kurva Standar Galur 42 yang menyatakan Hubungan Jumlah Organisme (sel/ml) dengan nilai rapat Optis (OD_{620})	87
7	Kurva Standar Galur 30 yang menyatakan Hubungan Jumlah Organisme (sel/ml) dengan nilai rapat Optis (OD_{620})	88

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

8	Kurva Standar Galur 28 yang menyatakan Hubungan Jumlah Organisme (sel/ml) dengan nilai rapat Optis (OD_{620})	89
9	Kurva Standar Galur 26 yang menyatakan Hubungan Jumlah Organisme (sel/ml) dengan nilai rapat Optis (OD_{620})	90
10	Kurva Standar Galur 25 yang menyatakan Hubungan Jumlah Organisme (sel/ml) dengan nilai rapat Optis (OD_{620})	91
11	Kurva Standar Galur 23 yang menyatakan Hubungan Jumlah Organisme (sel/ml) dengan nilai rapat Optis (OD_{620})	92
12	Kurva Standar Galur 20 yang menyatakan Hubungan Jumlah Organisme (sel/ml) dengan nilai rapat Optis (OD_{620})	93
13	Kurva Standar Galur 18 yang menyatakan Hubungan Jumlah Organisme (sel/ml) dengan nilai rapat Optis (OD_{620})	94
14	Kurva Standar Galur 07 yang menyatakan Hubungan Jumlah Organisme (sel/ml) dengan nilai rapat Optis (OD_{620})	95
15	Kurva Pertumbuhan Galur 53	98
16	Kurva Pertumbuhan Galur 52	99
17	Kurva Pertumbuhan Galur 50	100
18	Kurva Pertumbuhan Galur 47	101
19	Kurva Pertumbuhan Galur 43	102
20	Kurva Pertumbuhan Galur 42	103
21	Kurva Pertumbuhan Galur 30	104
22	Kurva Pertumbuhan Galur 28	105
23	Kurva Pertumbuhan Galur 26	106
24	Kurva Pertumbuhan Galur 25	107
25	Kurva Pertumbuhan Galur 23	108
26	Kurva Pertumbuhan Galur 20	109

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :

- a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
- b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

27	Kurva Pertumbuhan Galur 18	110
28	Kurva Pertumbuhan Galur 07	111

@Hak cipta milik IPB University

IPB University



PENDAHULUAN

Latar belakang

Kedelai merupakan tanaman pangan penting setelah beras dan jagung karena memiliki kandungan protein, karbohidrat dan lemak nabati yang tinggi (Vincent, 1982). Kandungan protein yang tinggi pada biji kedelai (38-45%) menyebabkan produksi tanaman ini membutuhkan banyak nitrogen. Untuk menghasilkan 1 kg biji kedelai tanaman membutuhkan 70-80 gram nitrogen (Pasaribu, 1981). Tanaman kedelai dapat memenuhi sebagian kebutuhan nitrogen (75.9%), melalui simbiosis dengan bakteri bintil akar dengan cara penambatan nitrogen secara hayati (Alexander, 1977), bahkan simbiosis ini sanggup menggantikan sebagian fungsi pupuk nitrogen-anorganik, sehingga dapat mengurangi ketergantungan tanaman pada penggunaan pupuk nitrogen buatan (Stowers dan Elkan, 1980).

Jumlah nitrogen yang ditambat oleh bakteri bintil akar yang bersimbiosis dengan tanaman pepolongan berbeda-beda, tergantung pada interaksi antara spesies tanaman inang, varietas tanaman inang, dan galur bakteri bintil akar, serta faktor-faktor lingkungan (Freire, 1977). Faktor lingkungan yang mempengaruhi penambatan nitrogen, ialah kondisi tanah dan iklim (Alexander, 1977). Faktor iklim yang mempengaruhi penambatan nitrogen antara lain adalah suhu, sedangkan kondisi tanah yang mempengaruhi penambatan

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

nitrogen adalah kelengasan tanah, pH dan kadar nitrogen dalam tanah; unsur-unsur P dan K yang tersedia dalam tanah; unsur-unsur mikro Co dan Mo (Buckman dan Brady, 1964; Alexander, 1977).

Populasi bakteri bintil akar di dalam tanah sangat bervariasi, bahkan ada tanah-tanah tertentu yang tidak mengandung bakteri bintil akar. Tanaman pepolongan yang tumbuh baik dengan bintil-bintil berfungsi menunjukkan adanya keserasian antara tanaman tersebut dengan bakteri bintil akar di dalam tanah. Dengan adanya kekhususan dalam asosiasi bakteri bintil akar, serta perbedaan dalam efektivitas galur-galur bakteri bintil akar, maka inokulasi dengan bakteri bintil akar yang paling cocok untuk tanaman pepolongan yang akan ditanam sangat menguntungkan bagi pertumbuhan tanamannya (Jutono, 1985).

Di Indonesia, penanaman kedelai sebagian besar (60% dari luas pertanaman) ditanam pada lahan sawah bekas padi, tanpa didahului dengan pengolahan tanah dan pemberian inokulan, sedangkan varietas kedelai yang cocok di lahan sawah dan dapat menghasilkan dengan baik terutama adalah Wilis, yakni varietas yang berbiji kecil, tumbuhnya cepat, dan mampu membentuk polong lebat, walaupun tanaman kurang subur (Sumarno, dkk., 1985). Lahan sawah bekas padi yang biasa ditanami kedelai, diduga mengandung galur-galur bakteri bintil akar kedelai asli yang unggul. Sementara ini, di Laboratorium Mikrobiologi, Jurusan Biologi, FMIPA-IPB telah



dilakukan usaha untuk mendapatkan galur-galur bakteri tersebut dari lahan sawah di Majalengka. Dari contoh-contoh tanah yang diambil (dari 10 lokasi yang terpancing oleh 5 varietas kedelai) telah didapatkan 50 galur bakteri yang semuanya telah dibuktikan keasliannya sebagai bakteri bintil akar. Semua galur tersebut dilaporkan sebagai bakteri tumbuh lambat (Tedja Imas, 1991), dan tergolong Bradyrhizobium japonicum, mengingat ciri-cirinya yang tumbuh lambat (7-10 hari) dalam medium agar Manitol Ekstrak Khamir (selanjutnya disingkat MEK), dan bereaksi basa (berwarna biru) bila ditumbuhkan dalam medium agar MEK yang dibubuhi indikator brom timol biru (Jordan, 1984). Dari 50 galur tersebut, 12 diantaranya dipilih mengingat efektivitas simbiotiknya tinggi (lebih dari 70%), sehingga galur tersebut dikatakan efektif dalam menambat nitrogen (Tedja Imas, 1991). Empat galur uji menunjukkan performans yang lebih baik dalam menambat nitrogen dibandingkan galur standar USDA 110, bahkan tanaman yang diinokulasi dengan ke-12 galur bakteri tersebut memperlihatkan performan yang lebih baik dibandingkan tanaman yang diinokulasi dengan tanaman kontrol yang diberi KNO_3 0.05%.

Menurut Vincent (1982), teknik serologis merupakan salah satu cara yang digunakan dalam pencirian bakteri bintil akar. Pencirian serologis umumnya digunakan untuk mengenali identitas mikroorganisme secara lebih spesifik



berdasarkan sifat-sifat antigeniknya, sedangkan pemanfaatannya untuk menunjukkan kekhususan sifat galur baik pada penelitian di laboratorium maupun di lapangan. Salah satu teknik serologis tersebut adalah uji aglutinasi yang melibatkan dua reaktan utama yaitu antigen dan antibodi. Hasil reaksi antara ke-2 reaktan tersebut bersifat spesifik sehingga dapat dipakai sebagai penanda galur dalam pengenalan identitas atau kekerabatan antigenik bakteri bintil akar. Disamping itu reaksi aglutinasi lebih sederhana dibandingkan teknik serologis lainnya (Bergersen, 1980), dan reaksi penggumpalan yang terjadi dengan cepat dapat ditunjukkan dengan adanya pembentukan agregat dari butiran-butiran halus sampai butiran kasar. Ciri-ciri gumpalan ini menunjukkan reaksi aglutinasi somatik dan flagelar (Vincent, 1970).

Pemilihan metode serologis ini, tentunya berkaitan pula dengan tersedianya fasilitas, biaya, beban pekerjaan yang dapat ditanggung, dan ketrampilan yang dimiliki.

Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari reaksi aglutinasi yang terbentuk di antara galur-galur bakteri bintil akar kedelai tumbuh lambat dan efektif. Dari reaksi yang terbentuk, galur-galur bakteri tersebut dapat dikelompokkan berdasarkan kesamaan atau kekerabatan antigeniknya, mengingat sumber-sumber galur tersebut pada umumnya masih terletak pada lokasi yang berdekatan.



Manfaat Penelitian

Manfaat yang diperoleh dari penelitian ini antara lain adalah (i) mendapatkan galur-galur bakteri bintil akar sesuai dengan kelompok serologisnya (data kelompok), (ii) hasil ini dapat digunakan sebagai penanda galur dalam pengenalan identitas atau kekerabatan antigenik bakteri bintil akar, (iii) mendapatkan antiserum yang dapat digunakan untuk menguji galur-galur bakteri bintil akar kedelai lain, dan antiserum ini memiliki nilai ekonomi yang tinggi karena sangat mahal harganya.

@Hak cipta milik IPB University

IPB University



Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

TINJAUAN PUSTAKA

Bakteri Bintil Akar Kedelai

Menurut Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume I (Jordan, 1984), kelompok bakteri yang tergolong famili Rhizobiaceae memiliki empat genus, yaitu Rhizobium, Bradyrhizobium, Agrobacterium, dan Phyllobacterium. Dari kelompok bakteri ini yang memiliki kemampuan untuk merangsang pembentukan bintil pada akar tanaman pepolongan dan menambat nitrogen molekular secara simbiotik adalah Rhizobium dan Bradyrhizobium. Secara umum genus Rhizobium memiliki ciri-ciri utama tumbuh cepat di atas medium agar MEK, menghasilkan reaksi asam di dalam medium manitol-garam mineral, DNA-nya mengandung 59-64% G+C (Guanin dan Sitosin), serta menyebabkan pembentukan bintil, terutama pada akar tanaman pepolongan di daerah beriklim sedang (subtropis). Sebaliknya genus Bradyrhizobium berciri-ciri tumbuh lambat, menghasilkan reaksi alkalin, DNA-nya mengandung 61-65% G+C, serta menyebabkan pembentukan bintil akar terutama pada tanaman pepolongan di daerah tropis dan pada beberapa tanaman di daerah beriklim sedang (Jordan, 1984).

Koloni Rhizobium berbentuk bundar, dan berelevasi cembung biasanya sedikit tembus cahaya, lengket dan berdiameter 2-4 mm dalam waktu 3-5 hari pada medium agar khamir-manitol-garam mineral. Sebaliknya koloni Bradyrhizobium berbentuk bundar, berelevasi cembung, biasanya jarang

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

sekali tembus cahaya, berwarna putih, dan teksturnya cenderung granula; pada medium agar khamir-manitol-garam mineral diameter koloninya tidak melebihi 1 mm selama inkubasi 5-7 hari (Jordan, 1984). Menurut Fuhrmann (1990), koloni Bradyrhizobium japonicum di atas medium agar MEK dibedakan menjadi 3 tipe, yaitu large mucoid (LM), large watery (LW), dan small dry (SD). Tipe large dan small, koloninya berdiameter > 1 mm dan ≤ 1 mm setelah diinkubasi pada suhu 28°C selama 7-10 hari. Koloni LM mempunyai ciri-ciri berlendir, seluruhnya tampak cembung, tembus cahaya atau tidak, sedangkan koloni LW biasanya datar, dan tembus cahaya, berair, dan cenderung tidak teratur, atau berupa granula. Koloni SD seluruhnya lebih cembung, relatif tembus cahaya atau tidak.

Berdasarkan kecepatan tumbuhnya di dalam medium agar MEK, kelompok bakteri Rhizobium memiliki waktu generasi rata-rata kurang dari 6 jam (Stowers, 1985), atau 2 sampai 4 jam (Somasegaran dan Hoben, 1985) atau 2.9 sampai 4.8 jam (Keyser et al., 1982), sedangkan kelompok Bradyrhizobium memiliki waktu generasi rata-rata lebih dari 6 jam (Stowers, 1985), atau 6 sampai 9 jam (Somasegaran dan Hoben, 1985) atau 6.7 sampai 13.0 jam (Keyser et al., 1982), atau 8 sampai 20 jam (Israel et al., 1986).

Pada umumnya sel-sel bakteri bintil akar bersifat aerob, dan berbentuk batang berukuran $0.5-0.9 \times 1.2-3.0$ μm , bersifat gram negatif dan tidak membentuk spora. Biasanya,

dalam lingkungan pertumbuhan yang kurang baik akan berbentuk pleomorfik. Sel bakteri ini juga mengandung butiran poli β -hidroksi-butirat yang bersifat refraktil bila diamati di bawah mikroskop kontras fase (Jordan, 1984).

Motil dengan satu flagelum polar atau subpolar, bisa juga dengan 2 sampai 6 flagelum peritrikus. Pertumbuhan optimum berlangsung pada kisaran suhu 25-30 °C, dan pH 6-7, kecuali galur-galur dari tanah asam. Sebagai kemoorganotrof, bakteri bintil akar dapat menggunakan berbagai karbohidrat dan garam-garam asam organik sebagai sumber karbonnya, tanpa disertai pembentukan gas. Pertumbuhan pada medium karbohidrat ini, biasanya disertai pembentukan lendir polisakarida ekstraselular dalam jumlah banyak. Namun demikian, bakteri ini tidak dapat menggunakan selulosa dan pati. Sebagai sumber nitrogen bagi pertumbuhannya, dapat dipakai garam-garam amonium, nitrat, nitrit, dan sebagian besar asam amino (Jordan, 1984). Medium MEK merupakan medium baku yang sudah sangat umum dipakai untuk berbagai tujuan pencirian bakteri bintil akar (Vincent, 1970).

Di dalam simbiosisnya dengan tanaman pepolongan, bakteri ini secara khas dapat menginfeksi rambut-rambut akar tanaman inangnya dan menyebabkan pembentukan bintil-bintil akar. Di dalam bintil akar, bakteri tersebut merupakan simbion intraselular. Semua galur bakteri bintil akar menunjukkan kekhususan terhadap inang dalam kisaran tertentu (Jordan, 1984).

@Hak cipta milik IPB University

IPB University



Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

Perubahan pH yang diakibatkan oleh hasil reaksi metabolisme dapat diamati secara kualitatif dengan membubuhkan indikator biru brom timol 0.0002% (b/v) ke dalam medium agar (Vincent, 1970). Reaksi asam ditunjukkan oleh berubahnya warna indikator (medium) menjadi kuning, sedangkan reaksi alkalin menyebabkan warna medium menjadi biru. Perubahan pH secara kuantitatif dapat pula diamati dengan menumbuhkan bakteri di dalam medium kaldu (Date, 1982), atau membuat suspensi sel dari biakan agar ke dalam medium kaldu (Norris, 1965).

Pada umumnya sebagian besar bakteri bintil akar kurang atau tidak mampu menyerap warna dari medium MEK-garam mineral yang dibubuhi zat warna merah kongo pada tingkat konsentrasi 0.0025% (v/v) (Jordan, 1984). Zat warna tersebut digunakan untuk membedakan kelompok bakteri bintil akar, seperti Rhizobium dan Bradyrhizobium yang relatif tidak menyerap warna merah dari kelompok bakteri lain (Famili Rhizobiaceae), seperti Agrobacterium yang biasanya mampu menyerap warna merah kongo dengan baik (Vincent, 1970).

Berbagai jenis tanaman kedelai pada umumnya hanya dapat dinodulasi oleh bakteri tumbuh lambat yang tergolong Bradyrhizobium. Genus Bradyrhizobium hanya dikenal satu spesies, yaitu Bradyrhizobium japonicum. Sel-sel bakteri ini selain membentuk bintil akar pada tanaman kedelai, juga mampu membentuk bintil pada tanaman siratro (Macroptilium atropurpureum) (Jordan, 1984).

Galur Bakteri Bintil Akar Kedelai Efektif

Galur merupakan nama kolektif yang diberikan pada semua turunan dari suatu isolat (Rivali, 1970). Kemampuan suatu bakteri bintil akar untuk menodulasi suatu inang tertentu (infektivitas) lebih stabil dibandingkan kemampuan untuk menambat nitrogen (efektivitas) (Jordan, 1984). Tidak semua bakteri bintil akar mampu menginfeksi tanaman pepolongan (Alexander, 1977). Adanya bintil tidak menjamin bahwa suatu tanaman pepolongan dapat memanfaatkan nitrogen molekular. Dengan demikian tidak semua bintil akar yang terbentuk efektif (Bergersen, 1980).

Galur-galur efektif menghasilkan bintil-bintil efektif pada semua inangnya yang cocok, tetapi pada beberapa kasus galur-galur efektif pada satu tanaman tidak efektif pada tanaman lain (Buckman dan Brady, 1964). Galur-galur efektif dalam menambat nitrogen dapat kehilangan keefektifannya apabila ditumbuhkan secara serial pada medium yang mengandung asam amino (bentuk D) dan terlalu lama disimpan pada suatu kondisi tertentu atau ditumbuhkan terus menerus pada medium laboratorium (Jordan, 1984). Bakteri bintil akar yang efektif biasanya menghasilkan bintil dalam jumlah yang lebih banyak daripada yang tidak efektif pada kondisi lingkungan yang memiliki bakteri efektif dan tidak efektif, ukurannya lebih besar dan cenderung terpusat pada akar utama (Bergersen, 1980).



Ciri-ciri bintil akar yang aktif dalam menambat nitrogen dapat dikenali dari warna kemerahan di bagian dalamnya ketika bintil dibelah. Warna merah di bagian dalam bintil akar disebabkan oleh adanya pigmen leghemoglobin (Alexander, 1977). Bintil akar yang memetabolisme nitrogen molekular secara aktif berwarna merah karena adanya kandungan leghemoglobin tersebut. Pigmen merah tidak dikandung oleh bintil yang tidak efektif. Hasil-hasil percobaan menunjukkan adanya korelasi antara derajat efektivitas bintil dengan jumlah leghemoglobin yang terdapat di dalam jaringan bintil (Bergersen, 1982).

Efektivitas penambatan nitrogen dapat diukur melalui beberapa cara antara lain yaitu dengan penetapan bobot kering tanaman, kandungan nitrogen total, aktivitas nitrogenase, dan kandungan leghemoglobin (Bergersen, 1980). Menurut Vincent (1970), bobot kering tanaman relevan untuk digunakan dalam mengevaluasi efektivitas penambatan nitrogen, karena bobot kering tanaman berkorelasi positif dengan kandungan nitrogen total. Selanjutnya Saraswati (1986) melaporkan adanya korelasi yang nyata antara bobot kering tanaman bagian atas dan bobot kering bintil akar. Data bobot kering tanaman bagian atas lebih dipentingkan karena lebih dari 70% nitrogen hasil penambatan yang digunakan tanaman ditranslokasikan ke tanaman bagian atas (Russel, 1961).



Untuk mendapatkan bakteri bintil akar yang efektif pada tanaman pepolongan, sebaiknya bakteri tersebut diisolasi dari daerah yang sering ditanami pepolongan dari tahun ke tahun (Vincent, 1982). Penggalan sumberdaya hayati bakteri bintil akar yang berasal dari tanah yang ditanami kedelai sering dilakukan karena bakteri tersebut telah teradaptasi dengan baik pada tanaman dan lingkungannya. Galur asli ini diharapkan mempunyai efektivitas yang sangat unggul dalam menambat nitrogen. Galur yang patut dikembangkan adalah galur dengan penambahan bobot kering tanaman lebih dari 70% dibandingkan KNO_3 (Date, 1982). Galur-galur bakteri bintil akar kedelai yang diuji sebaiknya galur bakteri yang mempunyai efektivitas simbiotik lebih dari 70%. Penentuan efektivitas simbiotik dilakukan dengan membandingkan bobot kering tanaman bagian atas yang diinokulasi galur uji terhadap bobot kering tanaman bagian atas yang diinokulasi galur standar, atau bobot kering tanaman bagian atas kontrol KNO_3 , kemudian dikalikan seratus persen (Bergersen, 1982).

Serologis Bakteri Bintil Akar

Teknik serologis merupakan salah satu cara yang dapat digunakan dalam pencirian bakteri bintil akar. Pencirian serologis umumnya digunakan untuk mengenali identitas mikroorganisme secara lebih spesifik berdasarkan sifat-sifat antigeniknya. Pemanfaatan metode serologis dalam pencirian



bakteri bintil akar biasanya digunakan untuk menunjukkan kekhususan sifat galur sehingga identifikasi galur baik pada penelitian di laboratorium maupun di lapangan dapat dilakukan (Vincent, 1982).

Tujuan utama pemakaian metode serologis di antaranya adalah untuk (i) mengetahui sifat dan lokasi komponen antigenik yang telah terdeteksi secara serologis, (ii) menegaskan ciri-ciri pembeda yang telah diuraikan dalam hubungan taksonominya, (iii) menentukan galur-galur bakteri berdasarkan komposisi antigeniknya dan mengenalinya kembali bila galur tersebut digunakan di lapangan atau di dalam percobaan-percobaan rutin, (iv) menyediakan penanda galur sebagai ciri khas dalam penelaahan genetis dan pengujian keaslian mutan, serta (v) meneliti kemungkinan korelasi antara komponen antigenik bakteri dan kemampuan bersimbiosis dengan tanaman inang (Vincent, 1982).

Metode Serologis

Beberapa metode serologis yang dapat digunakan dalam pencirian bakteri bintil akar di antaranya, adalah aglutinasi, presipitasi, fiksasi komplemen, absorpsi antibodi, dan antibodi berpenanda fluoresens atau enzim (Vincent, 1977; dan 1982). Tiga bentuk reaksi serologis yang sering digunakan diantaranya, adalah reaksi aglutinasi, reaksi presipitasi yang merupakan kompleks antigen-antibodi yang ditunjukkan oleh sistem difusi gel dan reaksi dengan antibodi berpenanda fluoresens yang melibatkan reaksi antigen



permukaan (Vincent, Nutman, dan Skinner, 1979). Tiap metode mempunyai keunggulan masing-masing, dan biasanya mempunyai kekhususan tertentu, terutama untuk mendeteksi posisi atau letak komponen antigenik bakteri.

Reaksi Serologis

Reaksi serologis bakteri bintil akar melibatkan dua reaktan utama, yaitu antigen dan antibodi. Antigen suatu substansi berbobot molekul tinggi, seperti protein atau polisakarida yang bila memasuki tubuh hewan vertebrata mampu menimbulkan respons kekebalan di dalam tubuhnya, sedangkan antibodi suatu substansi khusus yang dibentuk oleh tubuh vertebrata akibat adanya benda asing atau antigen tersebut di atas. Reaksi yang terjadi di antara ke dua reaktan tersebut bersifat spesifik sehingga dapat dipakai sebagai penanda galur dalam pengenalan identitas atau kekebalan antigenik bakteri bintil akar (Vincent, 1982). Penggunaan adjuvan yang diinjeksikan bersama-sama dengan antigen akan meningkatkan produksi antibodi. Berbagai macam substansi dengan komposisi kimiawi berbeda telah memiliki efek adjuvan, seperti garam-garam alumunium, natrium alginat, endotoksin bakteri, dan suspensi air-dalam minyak, dengan atau tanpa mikobakteri yang telah dimatikan. Adjuvan Freund ditemukan oleh Freund dan umumnya sering digunakan di dalam percobaan, terdiri dari minyak mineral, lanolin (organik), zat pengemulsi, dan basilus tuberkulosis



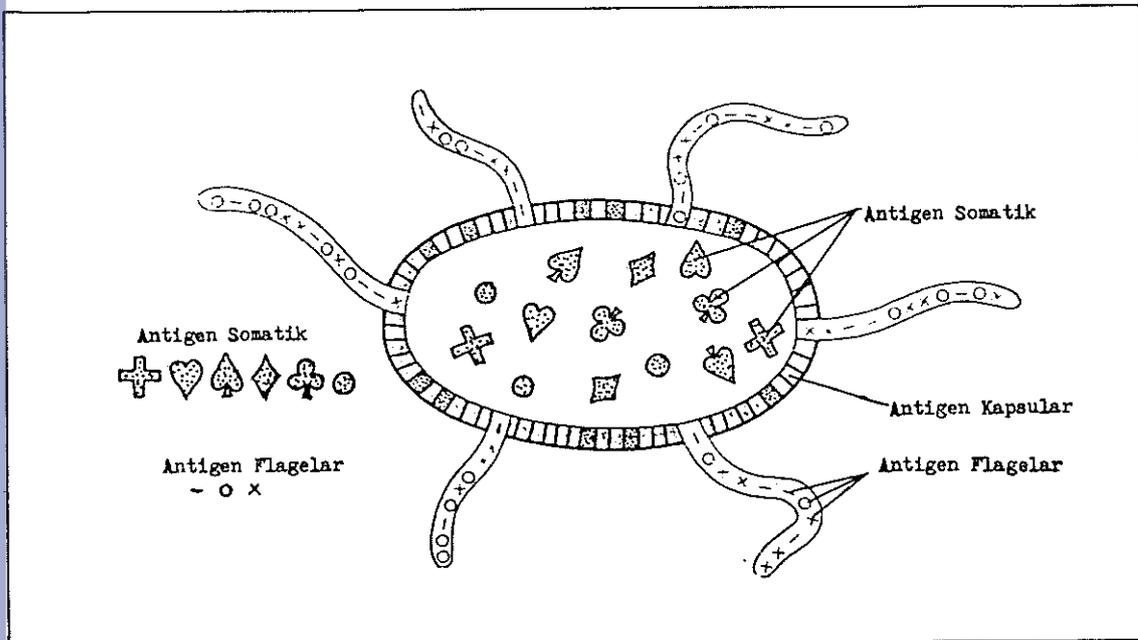
yang telah dimatikan. Adjuvan Freund lengkap (Complete Freund's Adjuvant/CFA) biasanya mengandung minyak mineral dan Mycobacterium tuberculosis (basilus tuberkulosis) sebagai patogen intraselular yang telah dimatikan, sedangkan adjuvan Freund tak lengkap (Incomplete Freund's Adjuvant/IFA) hanya mengandung minyak mineral (Pelczar, dan Chan, 1981).

Berdasarkan letak komponen antigeniknya, antigen bakteri bintil akar dikelompokkan menjadi tiga bentuk, yaitu antigen somatik atau permukaan (antigen O); antigen flagelar (antigen H); dan antigen internal (antigen kapsular) (Vincent, 1982), seperti terlihat pada Gambar 1.

Antigen Somatik. Antigen somatik ini biasanya merupakan kompleks antigen O, yaitu kompleks polisakarida-fosfolipid-protein yang terletak pada kompleks dinding sel bakteri, atau suatu endotoksin basilus enterik gram negatif. Kekhususan serologisnya terletak pada komponen polisakaridanya (Pelczar dan Chan, 1981).

Pada umumnya antigen somatik mampu bereaksi secara aglutinasi dengan adanya antibodi yang spesifik. Reaksi ini menyebabkan agregasi suspensi sel secara lengkap, dan membentuk endapan halus yang kompak. Endapan ini biasanya stabil walaupun terhadap suspensi diberikan perlakuan pemanasan sampai 100°C selama 30 menit (Vincent, 1977). Dalam pengujian reaksi difusi gel, antigen somatik sel bakteri bintil akar dapat larut jika disuspensikan di dalam larutan





Gambar 1. Antigen Eksternal Bakteri Gram Negatif (Pelczar dan Reid, 1972)

garam fisiologis. Antigen terlarut ini mampu memperlihatkan pita presipitin yang biasanya berbentuk cekung dan cenderung lebih dekat ke arah sumbu berisi antigen. Pada kasus-kasus Rhizobium japonicum dan Rhizobium meliloti serta kelompok rizobium tumbuh lambat lainnya, pembentukan pita presipitin akan semakin baik jika suspensi sel yang akan dipakai sebagai antigen dipanaskan terlebih dahulu pada 100°C selama 20 menit (Vincent, 1977).

Antigen Flagelar. Penelaahan terhadap komponen antigenik flagelar rizobium pada umumnya relatif lebih sedikit dibandingkan dengan antigen-antigen somatik. Hal ini terutama disebabkan oleh penampilan reaksi aglutinasinya yang relatif kurang mantap serta kurang memberikan informasi

khas di antara galur-galur yang pernah diteliti. Antigen flagelar dapat dikenali melalui flokulasi agregat-agregat sel sebagai akibat proses aglutinasi yang berlangsung sangat cepat (Vincent, 1977). Pemanasan yang dilakukan terhadap suspensi sel akan menghilangkan kemampuan reaksi antigen flagelar secara aglutinasi, tetapi akan meningkatkan reaksi pembentukan pita presipitannya (Vincent, 1982). Hal ini berlaku terutama terhadap komponen protein flagela (flagelin) yang relatif tidak tahan panas, yaitu setelah flagela bakteri tersebut terfragmentasi menjadi komponen-komponen yang lebih kecil atau lebih larut.

Antigen Internal. Antigen-antigen internal dapat dikenali melalui reaksi presipitasi (difusi gel) yang menggunakan komponen-komponen antigen terlarut. Komponen tersebut diperoleh dari hasil hancuran atau perusakan sel yang biasanya tidak terdeteksi jika sel digunakan secara utuh. Mekanisme penghancuran atau perusakan sel bakteri tersebut dapat dilakukan secara mekanis, misalnya dengan gelombang ultrasonik, pemanasan di dalam air mendidih, atau dengan melakukan pembekuan dan pelelehan suspensi sel secara berulang-ulang. Di dalam pencirian serologis, antigen internal dianggap menarik karena cenderung memperlihatkan kesamaan di antara galur, namun berbeda di antara kelompok rizobium yang tumbuh cepat dan yang tumbuh lambat (Vincent, 1977).



Telah dikemukakan sebelumnya, bahwa antigen merupakan suatu substansi yang bila memasuki inang vertebrata, menimbulkan respon kekebalan. Respon kekebalan ini mengakibatkan pembentukan antibodi spesifik yang beredar di dalam aliran darah (imunitas humoral) atau merangsang peningkatan jumlah sel-sel reaktif khusus yang disebut limfosit (imunitas yang diperantarai sel), atau keduanya. Pada umumnya, makin asing komposisi kimiawi dan struktur antigen terhadap individu yang diimunisasi maka makin efektif antigen tersebut dalam merangsang suatu respon kekebalan (Pelczar dan Chan, 1981). Suatu zat atau bahan yang bersifat antigenik adalah zat yang asing bagi tubuh; berbobot molekul tinggi; berstruktur kompleks, dan tidak cepat dikatabolisis. Bahan antigenik bisa berupa protein; karbohidrat; lipid atau komponen mikroorganisme. Protein banyak terdapat dalam serum, yang merupakan plasma darah atau cairan darah. Bila serum darah dielektroforesis akan didapatkan albumin dan globulin. Semua molekul antibodi termasuk ke dalam protein serum yang dinamakan globulin, tetapi tidak semua globulin serum merupakan antibodi. Albumin dapat larut di dalam garam amonium sulfat jenuh, natrium atau zink sulfat, sedangkan globulin atau antibodi dapat mengendap di dalam larutan garam. Pada elektroforesis, albumin yang bermuatan negatif tinggi akan bergerak ke anoda, sedangkan globulin yang mempunyai muatan negatif berbeda dapat terpecah menjadi globulin α , yaitu α_1 , α_2 ; globulin β yang beraktivitas



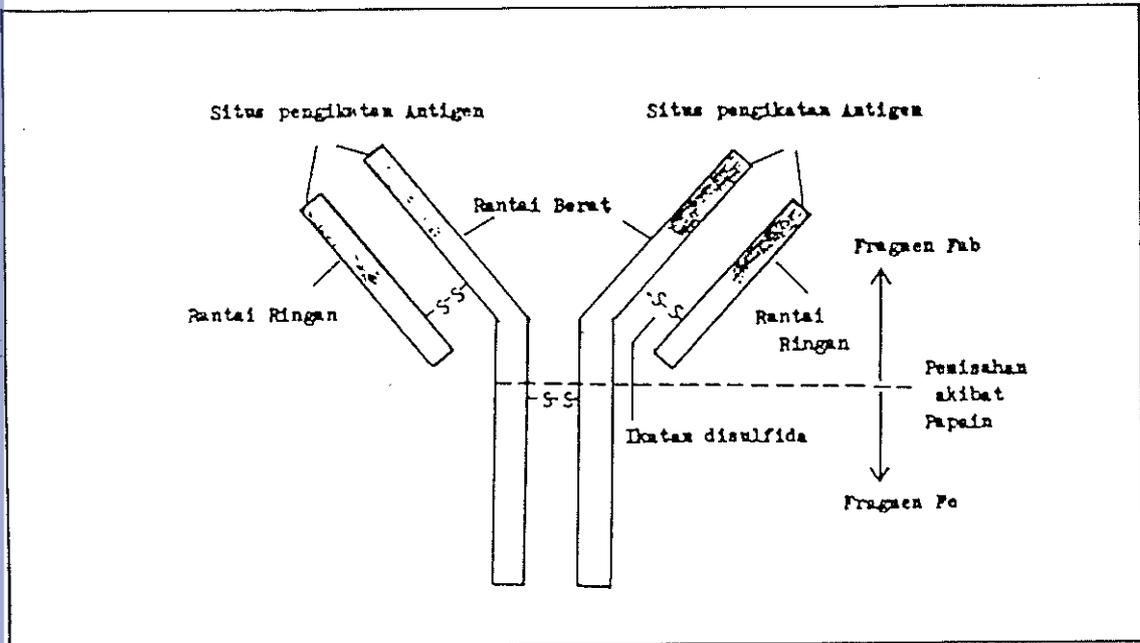
antibodi dan komplemen; dan globulin γ yang paling sedikit muatan negatifnya (Pelczar dan Chan, 1981).

Antibodi adalah globulin γ ; beberapa di antaranya mengandung karbohidrat tinggi. Immunoglobulin terbagi atas immunoglobulin G (IgG), M (IgM), A (IgA), D (IgD), dan E (IgE). Semua immunoglobulin ini mengandung unit struktural yang sama (unit monomerik), terdiri dari dua rantai polipeptida ringan dan dua rantai polipeptida berat. Setiap rantai berat mempunyai berat molekul 55 000, sedangkan setiap rantai ringan lebih kurang 25 000. Rantai-rantai ini dihubungkan dengan ikatan disulfida (Gambar 2).

Lebih dari 70% immunoglobulin di dalam serum adalah IgG, suatu monomer berbobot 150 000, reaktif pada uji-uji serologis. IgM merupakan suatu makroglobulin, paling sedikit lima kali lebih besar dari IgG (pentamer). IgM biasanya merupakan antibodi pertama yang muncul setelah terjadinya induksi oleh antigen. IgM hanya sekitar 6% dari immunoglobulin total, reaktif pada uji netralisasi, fiksasi komplemen, dan aglutinasi, dengan bobot molekul 900 000, sedangkan IgA, IgE dan IgD hanya sekitar 10%, 1%, dan 0.002% dari immunoglobulin total dalam serum (Pelczar dan Chan, 1981).

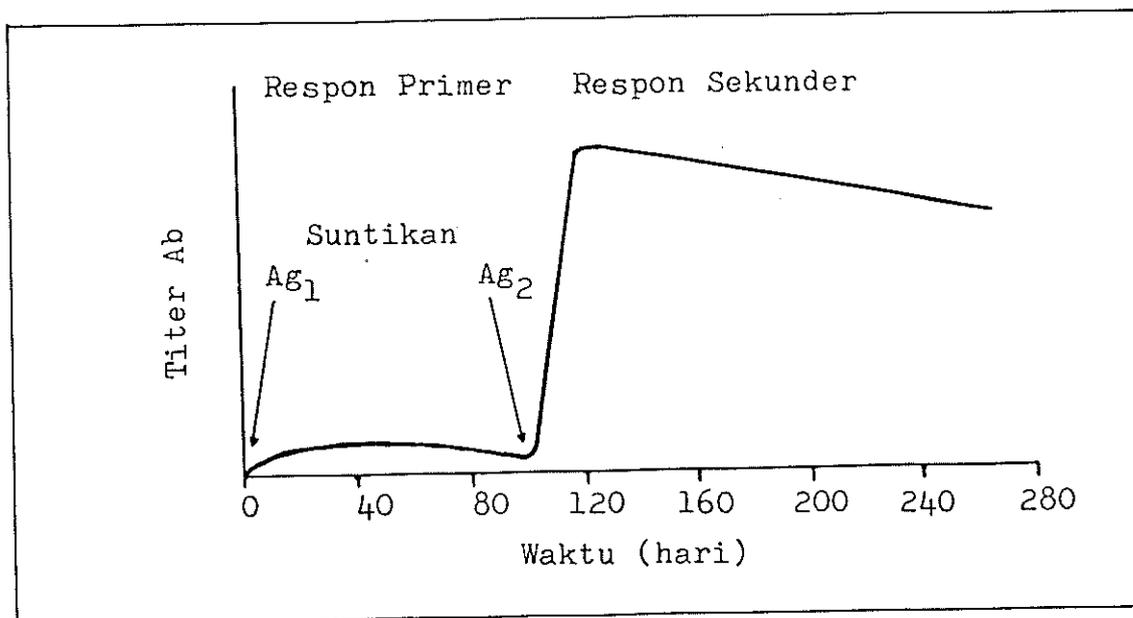
Bila disuntikkan suatu zat atau benda asing (antigen) pada seekor kelinci (hewan percobaan), beberapa hari kemudian antibodi ditemukan dalam darah. Antibodi akan mencapai jumlah maksimum dan kemudian akan menurun lagi di dalam





Gambar 2. Monomer Molekul Imonoglobulin G (Pelczar dan Chan, 1981).

darah. Bila setelah istirahat secukupnya, kelinci tersebut diberikan suntikan ke-2, maka pembentukan antibodi akan mengalami perubahan secara drastis, dua atau tiga hari kemudian antibodi di dalam darah akan meningkat dengan cepat dan mencapai puncaknya, jauh lebih tinggi dari hasil suntikan pertama (respon primer). Hasil suntikan ke-2 (respon sekunder) ditandai oleh pembentukan antibodi yang lebih cepat dan lebih banyak, sebab sistem pertahanan tubuh telah mengalami pengenalan terhadap benda asing tersebut, setelah suntikan pertama dan telah menyediakan sekelompok sel-sel memori (Roitt, 1985). Untuk lebih jelasnya, respon primer dan sekunder ini terlihat seperti Gambar 3.



Gambar 3. Respon Primer dan Sekunder terhadap Kadar Antibodi dalam Serum (Brock dan Brock, 1973).

Uji Aglutinasi

Uji aglutinasi terjadi bila muatan negatif bersih atau zeta potensial dari permukaan antigen partikulat, bakteri, eritrosit dinetralisasi muatan positif antibodi. Immunoglobulin yang paling kuat dan efisien daya aglutinasinya adalah IgM dibandingkan IgG atau IgA. Aglutinasi tidak terjadi bila antibodi berlebihan (prozon) yang disebabkan oleh antigen yang terlapsi antibodi atau letak antigen terlampau dalam dan adanya keterbatasan gerak pada engsel antibodi. Antigen yang terdeteksi dengan aglutinasi adalah yang terikat pada sel atau yang cukup dekat pada permukaan sehingga dapat dicapai antibodi. Permukaan antigen somatik bakteri bintil akar umumnya dapat menunjukkan kekhususan galur dan dari suatu spesies akan diperoleh berbagai pola

aglutinasi. Antigen flagelar terdapat di antara galur di dalam spesies atau spesies sekerabat. Kombinasi antigen somatik dan flagelar teraglutinasi dapat mengacu suatu serotipe (Bergersen, 1980; Vincent, 1982). Antigen di dalam uji aglutinasi dapat berupa sel atau partikel. Ditambahkannya antibodi yang homolog akan menyebabkan terjadinya aglutinasi atau penggumpalan, sehingga mengakibatkan terbentuknya agregat dari sel-sel atau partikel-partikel itu. Aglutinasi terjadi karena antibodi berlaku sebagai jembatan untuk membentuk jaringan kisi-kisi dari antibodi dan antigen partikulat sehingga terbentuk gumpalan (Pelczar dan Chan, 1981), seperti terlihat dalam Gambar 4.

Aglutinasi cepat dapat dilakukan dengan meneteskan antigen-antibodi di atas kaca objek. Selain itu aglutinasi juga dapat dilakukan di dalam tabung-tabung reaksi kecil. Biasanya uji aglutinasi dilakukan dengan pengenceran anti-serum secara serial di dalam tabung yang ke dalamnya ditambahkan antigen dalam jumlah yang konstan (Pelczar dan Chan, 1981). Setelah diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, penggumpalan dapat diamati secara visual setelah dimasukkan ke dalam refrigerator (lemari es bersuhu 4°C) selama 24 jam (Somasegaran dan Hoben, 1985), atau setelah dimasukkan ke dalam penangas air bersuhu 52°C selama 2 jam, 4 jam, dan diinkubasikan di dalam refrigerator selama 24 jam (Vincent, 1970; Somasegaran dan Hoben, 1985). Selanjutnya titer antiserum dapat ditentukan berdasarkan pengamatan tersebut.



Titer antiserum adalah suatu nilai nisbi dan berbanding terbalik dengan pengenceran tertinggi yang memiliki gumpalan sel dan antibodi (Pelczar dan Chan, 1981).

Aglutinasi Flagelar

Telah dikemukakan bahwa bakteri bintil akar memiliki tiga jenis antigen, yaitu antigen flagelar, somatik, dan internal. Tetapi pada umumnya hanya dua jenis antigen pertama yang bisa dibedakan. Sel rizobium memiliki dua tipe antigen permukaan yaitu antigen flagelar (H) dan antigen somatik (O) yang bereaksi secara terpisah di dalam uji aglutinasi. Pemanasan sel pada suhu 100°C selama 30 menit dapat menghancurkan protein flagelar, sehingga hanya antigen O yang akan bereaksi dengan antiserum. Aglutinasi flagelar ditunjukkan oleh adanya pembentukan agregat berukuran besar, flokulen, dan lambat mengendap. Aglutinasi ini terjadi setelah antigen-antibodi direaksikan di dalam penangas air bersuhu 52°C selama 1-2 jam, karena reaksi antigen flagelar terlihat setelah 1-2 jam (Vincent, 1970).

Aglutinasi Somatik

Aglutinasi somatik terbentuk karena terjadinya reaksi antara antigen somatik dengan antiserum (antibodi) yang dikenali oleh adanya pembentukan agregat berupa granula (butiran-butiran halus). Biasanya, hal ini terjadi setelah dimasukkan ke dalam penangas air bersuhu 52°C selama 4 jam,



karena reaksi antigen somatik terlihat setelah 4 jam (Vincent, 1970).

Pengujian terhadap antibodi yang tidak mengaglutinasi (menggumpal) dapat diuji secara langsung maupun tak langsung dengan menambahkan antiglobulin. Pada uji antiglobulin langsung, pada antigen yang diikat antibodi ditambahkan antiglobulin, sedangkan pada uji antiglobulin tak langsung, serum direaksikan dengan antigen sehingga terbentuk kompleks antibodi (Ab)-antigen (Ag) yang tidak menggumpal, kemudian ditambahkan antiglobulin (Pasaribu dan Joeniman, 1988).

@Hak cipta milik IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



BAHAN DAN METODE

Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada pertengahan bulan Nopember 1989 sampai akhir bulan Mei 1990, di Laboratorium Mikrobiologi, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, dan di Laboratorium Bakteriologi, Balai Penelitian Veteriner (BALITVET) Bogor.

Galur-Galur Bakteri yang Diuji

Galur-galur uji seluruhnya berjumlah 14 galur, terdiri dari 12 galur asli tanah, dan 2 galur standar. Kedua belas galur tersebut telah diuji efektivitas simbiotiknya terhadap tanaman kedelai varietas Wilis, hasil penelitian terdahulu (Tedja Imas, 1991). Galur tersebut masing-masing adalah galur 50, 47, 43, 42, 30, 28, 26, 25, 23, 20, 18 dan 07 sedangkan dua galur standar tersebut adalah Bradyrhizobium japonicum USDA 110 dan USDA 122, yang berasal dari Departemen Agronomi dan Ilmu Tanah, Universitas Hawaii (NifTAL Project), dan Laboratorium Penelitian Fiksasi Nitrogen, Universitas Oregon, yang selanjutnya diberi kode galur 52 dan 53. Galur-galur ini dipilih berdasarkan efektivitasnya dalam menambat nitrogen, dimana efektivitas simbiotiknya ditentukan berdasarkan bobot kering tanamannya. Galur tersebut juga berasal dari 10 lokasi yang terpancing oleh 5 varietas kedelai, dari Desa Brujulkulon,

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

Kecamatan Jatiwangi, di Kabupaten Majalengka (Tedja Imas, 1991), sedangkan kedua galur standar dipilih karena keunggulannya di lapangan (USDA 110) dan di rumah kaca (USDA 122).

Morfologi Koloni Galur-Galur Uji

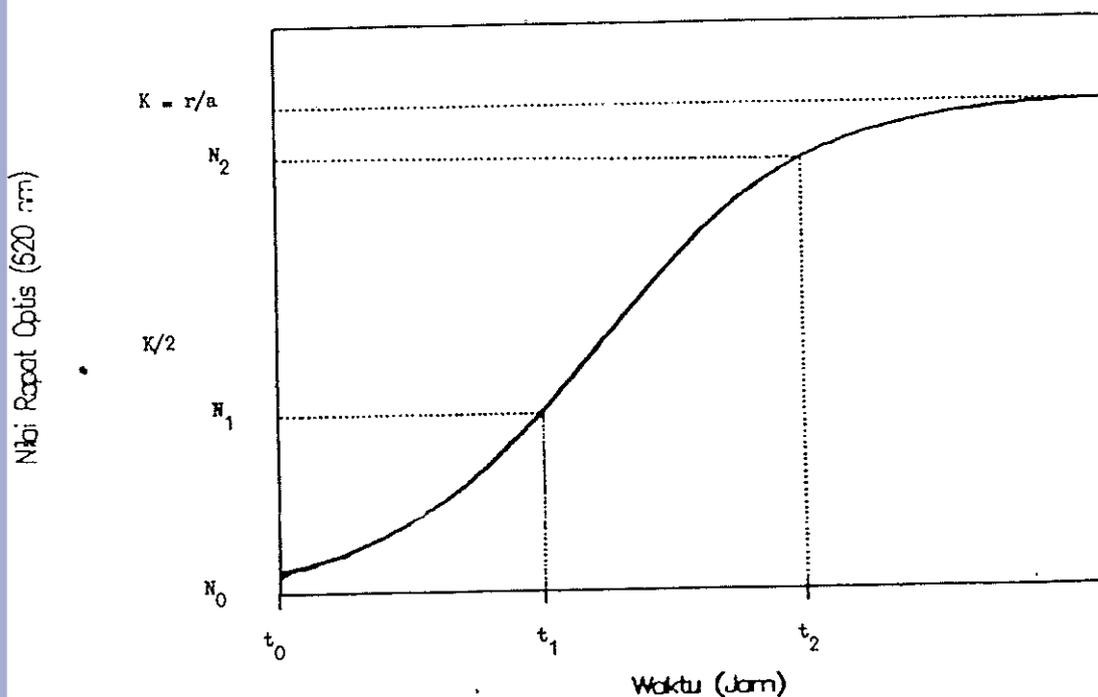
Pengamatan morfologi koloni dilakukan dengan menumbuhkan sejumlah koloni galur-galur bakteri yang diuji ke dalam medium agar cawan MEK yang dibubuhi zat warna merah kongo 0.0025% b/v (Vincent, 1970). Inokulasi dilakukan dengan metode penggoresan kuadran (Hadioetomo, 1990), dan setiap galur yang diuji dilakukan dua ulangan percobaan. Cawan-cawan tersebut diinkubasikan pada suhu 28°C selama 7 hari. Ciri-ciri koloni yang diamati meliputi ukuran, bentuk, elevasi, konsistensi dan tipe koloni, sesuai ciri-ciri yang dikemukakan oleh Fuhrmann (1990).

Waktu Generasi Galur-Galur Uji

Pengamatan pola pertumbuhan dilakukan dengan menumbuhkan galur-galur uji ke dalam labu Erlenmeyer 250 ml yang berisi 75 ml medium kaldu MEK dengan pH awal 6.8 ± 0.2 satuan pH (yang dimonitor dengan menggunakan pH Meter HORI-BA). Sebagai inokulum digunakan biakan kaldu pada fase pertumbuhan logaritmik sebanyak 3% (2.25 ml), dengan konsentrasi 10^9 sel/ml berdasarkan kurva standarnya, agar kerapatan sel dalam biakan kurang lebih seragam untuk semua galur. Pola pertumbuhan tidak dilakukan serentak untuk



semua galur, mengingat terbatasnya kapasitas mesin pengocok. Labu-labu tersebut diinkubasikan pada suhu kamar (28°C) di atas mesin pengocok horizontal (Riko RS-12 TE) pada kecepatan 100 rpm. Contoh suspensi sel bakteri diukur secara berkala dengan menggunakan spektrofotometer Spectronic 20 (Bausch and Lomb, NY, USA) dengan rapat optis (620 nm), setiap 3 jam sekali selama 3-4 hari. Selanjutnya dibuat kurva pertumbuhan yang menyatakan hubungan kekeruhan sel bakteri (yang ditunjukkan oleh nilai rapat optisnya) dengan selang waktu pertumbuhan, menurut kurva pertumbuhan model logistik (Hasibuan, 1988), seperti Gambar 5 di bawah ini:



Gambar 5. Kurva Umum Pertumbuhan Galur Bakteri Bintil Akar Kedelai berdasarkan Model Persamaan Logistik (Hasibuan, 1988)

@Hak cipta milik IPB University

IPB University

dengan model persamaan logistik:

$$N(t) = \frac{K}{1 + (K - N_0)/N_0 e^{-rt}}$$

Keterangan:

- $N(t)$: jumlah sel/ml setelah waktu t
 N_0 : jumlah sel/ml pada saat t_0
 K : faktor daya dukung lingkungan
 r : konstanta

Waktu generasi rata-rata dihitung berdasarkan data masing-masing kurva pertumbuhan pada bagian yang menunjukkan fase eksponensial (hasil rata-rata lima data fase eksponensial). Dengan menggunakan rumus persamaan waktu generasi (Fardiaz, 1988) sebagai berikut:

$$u = \frac{2.303 (\log N - \log N_0)}{t - t_0} \quad \text{dan} \quad t_g = \frac{0.693}{u}$$

Keterangan:

- u : konstan kecepatan pertumbuhan
 N_0 : jumlah sel/ml pada saat t_0
 N : jumlah sel/ml setelah waktu t
 t_0 : waktu awal
 t : waktu akhir
 t_g : waktu generasi



Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

Pengamatan morfologi koloni dan penentuan waktu generasi dilakukan untuk melengkapi data mengenai pencirian bakteri bintil akar kedelai tumbuh lambat.

Penyiapan Antigen

Kedua belas galur bakteri yang diuji, disiapkan sebagai antigen. Galur ini sebelumnya ditumbuhkan dalam tabung reaksi berukuran 15x160 mm berisi medium agar miring MEK dan diinkubasikan pada suhu 28°C selama 7 hari. Biakan yang tumbuh disuspensikan ke dalam tabung reaksi lain yang berisi 4 ml NaCl 0.85% dengan menggunakan jarum inokulasi dan dilihat kemurnian selnya dengan menggunakan pewarnaan gram. Kemudian dipipet sebanyak 1 ml, dan diinokulasikan ke dalam botol gepeng yang berisi 50 ml medium agar sintetik. Selanjutnya diinkubasikan pada suhu 28°C selama 5 dan 7 hari. Agar antigen yang disiapkan mencukupi, tiap galur dibuat dua ulangan (duplo).

Ke dalam masing-masing biakan yang berumur 5 dan 7 hari disuspensikan 10 ml NaCl 0.85% yang telah disaring dengan millipore 0.22 um. Suspensi sel bakteri ini dikocok dengan 5 buah manik-manik steril untuk melepaskan sel bakteri dari permukaan agar. Jika masih menempel dibantu dengan menggunakan batang kaca steril yang ujungnya bersudut 120°. Kemudian suspensi sel yang diperoleh dituangkan ke dalam tabung sentrifugasi (15 x 96 mm) yang terbuat dari polistirena dan dipusing dengan kecepatan 6 500 rpm selama



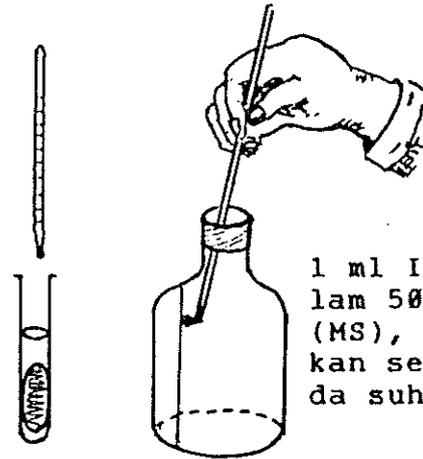
15 menit pada suhu dingin (4°C). Sebelumnya tabung sentrifugasi didesinfeksi berturut-turut dengan alkohol 70% dan 96%. Pemutaran dilakukan dengan sentrifugasi dingin 4°C dengan rotor RPS 40T (Ultracentrifuge, Hitachi). Setelah disentrifugasi, supernatannya dibuang dan presipitat (gentel sel) yang ada di dasar tabung disuspensikan kembali dengan penambahan larutan garam fisiologis (NaCl 0.85%) steril secara bertahap sambil dikocok, hingga mencapai konsentrasi $1-10 \times 10^9$ sel/ml. Jumlah sel bakteri ini dihitung dengan menggunakan hemasitometer (Hadioetomo, 1990). Kepekatan suspensi tersebut setara dengan tabung ke-8 larutan BaSO_4 standar McFarland, seperti terlihat pada Tabel Lampiran 3.

Suspensi sel bakteri yang berumur 5 hari dicampur dengan suspensi sel yang berumur 7 hari, kemudian ditempatkan ke dalam tabung-tabung reaksi kecil (12x75 mm, bertutup kapas dan dilapisi kain) sebanyak 2-3 ml/tabung dan disimpan dalam lemari es bersuhu -10°C (Freezer). Bagan lengkap proses penyiapan antigen dapat dilihat pada Gambar 6.

Produksi Antiserum

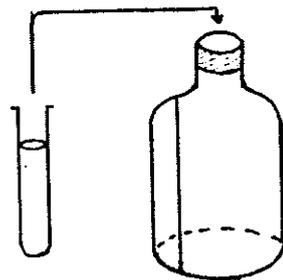
Penyuntikan Antigen untuk Imunisasi

Proses imunisasi diawali dengan menyuntikkan antigen ke dalam tubuh kelinci. Kelinci yang dipakai sebanyak 18 ekor berasal dari Balai Pembibitan Ternak dan Hijauan Makanan Ternak, UPT Cisarua, Bogor, dengan bobot 2.5-3.0 kg/ekor. Masing-masing dua ekor kelinci disiapkan untuk



1 ml Inokulum disebar dalam 50 ml Medium Sintetik (MS), kemudian diinkubasikan selama 5 dan 7 hari pada suhu 28°C

Suspensi biakan (7 hari) berisi 4 ml NaCl 0.85%



dituangkan 10 ml NaCl 0.85%

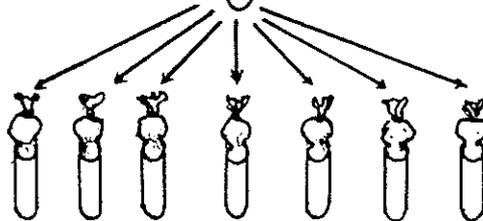
Suspensi sel dibuat dengan cara mengaduk larutan fisiologis bersama manik-manik kaca steril



dituangkan ke dalam tabung sentrifus plastik (polistirena yang didesinfeksi dengan alkohol 70% dan 96%, kemudian dipusing dengan kecepatan 6 500 rpm selama 15 menit pada suhu dingin (4°C))



Supernatan dibuang, ke dalam presipitat ditambahkan larutan garam fisiologis steril sampai konsentrasi $1-10 \times 10^9$ sel/ml



disimpan ke dalam tabung reaksi kecil (12x75 mm) sebanyak 2-3 ml/tabung pada suhu -10°C

Gambar 6. Bagan Proses Penyiapan Antigen

galur 50, 42, 28, dan 20, dua ekor untuk galur standar (53 dan 52), dan delapan ekor untuk galur uji lainnya (47, 43, 30, 26, 25, 23, 18 dan 07).

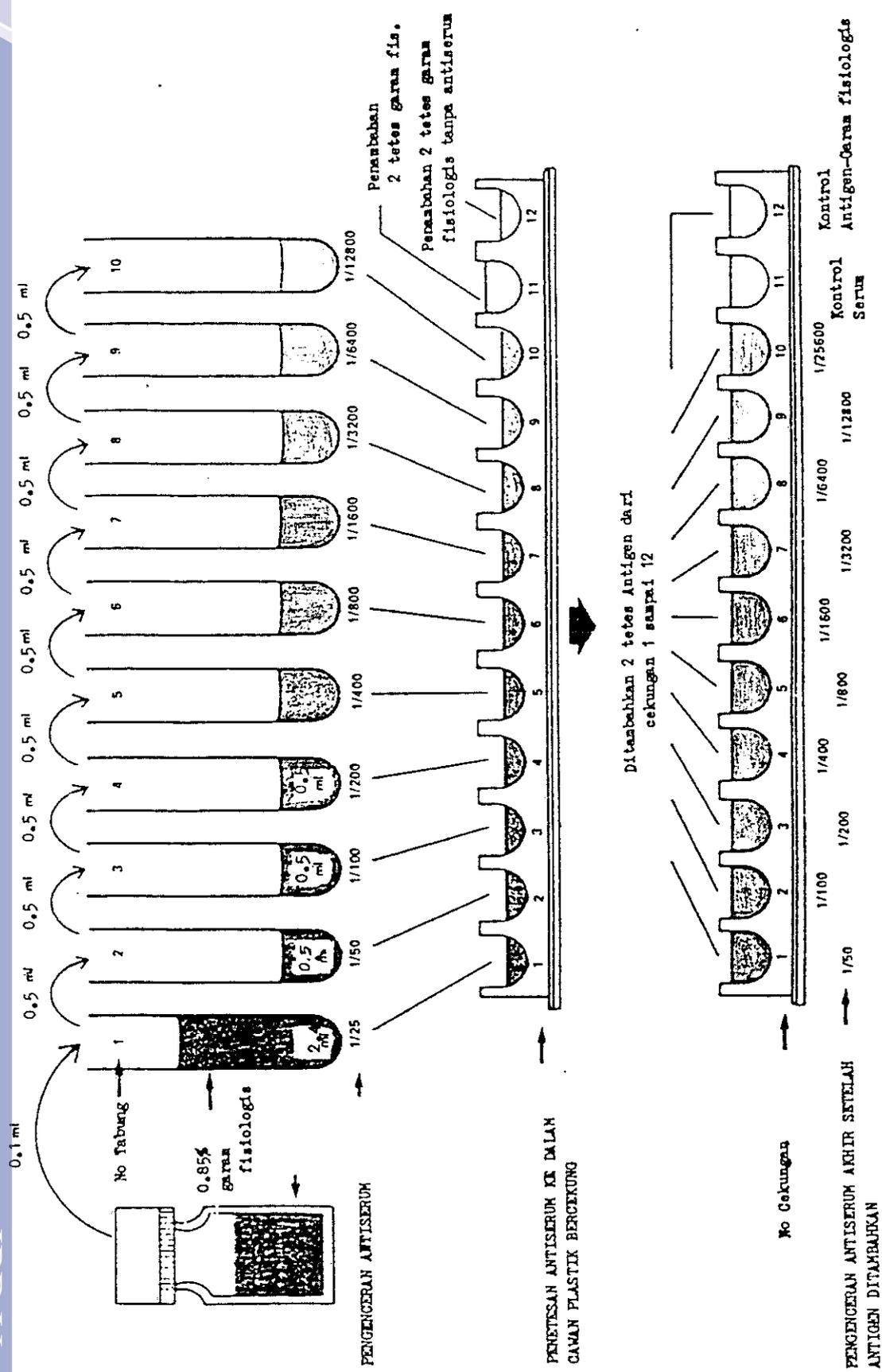
Sebanyak 1 ml suspensi sel bakteri dicampur dengan 1 ml adjuvan Freund lengkap sebelum disuntikkan ke tubuh kelinci percobaan (New Zealand White Rabbit). Pencampuran dilakukan secara ultrasonik dengan bantuan alat MSE Ultrasonic Soniprep 150, selama 30 detik pada suhu 4°C. Selanjutnya dengan alat suntik (Terumo Syringe) berukuran 2.5 ml (23Gx1½ atau 0.65x32 mm), suspensi sel yang sudah dicampur adjuvan tersebut dihisap dan disuntikkan secara subkutan di atas skapula kanan kelinci. Penyuntikan dilakukan perlahan-lahan untuk menghindari terjadinya shock pada tubuh hewan. Seminggu kemudian dilakukan penyuntikan kedua sebanyak 1 ml dengan alat suntik berukuran 1 ml (26Gx½ atau 0.45x13 mm), di atas skapula kiri kelinci.

Dua minggu setelah penyuntikan kedua, pengambilan darah dilakukan pada vena marginal telinga kelinci untuk menentukan titer antiserum yang dihasilkan. Caranya dengan membuat pengenceran antiserum sampai 6 400, kemudian mereaksikannya dengan antigen homolog (Vincent, 1970; Somasegaran dan Hoben, 1985). Proses pengenceran antiserum dapat dilihat pada Gambar 7.

Bila titer antiserum yang dicapai kurang dari 1 600 maka pada kelinci diberikan suntikan ulangan sebanyak 1 ml antigen tanpa adjuvan, secara subkutan pada bagian dalam



Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



Gambar 7. Skema Penentuan Titer Antiserum dengan Pengenceran Tabung.

paha belakang. Dua minggu setelah penyuntikan ini, dilakukan pengambilan darah untuk memperoleh titer antiserum. Titer yang dikehendaki berkisar antara 3 200-6 400.

Mengingat titer antiserum yang dihasilkan masih rendah maka penyuntikan dilanjutkan lagi secara intravena (IV) berturut-turut sejumlah 0.5 ml, 1.0 ml, selang tiga hari pada vena marginal telinga kelinci. Kelinci diistirahatkan selama seminggu, untuk menentukan titer antiserum, kemudian selang tiga hari, penyuntikan dilakukan kembali sejumlah 1.5 ml dan 2.0 ml. Seminggu kemudian dilakukan pengambilan darah untuk menentukan titer antiserum. Dua hari berikutnya pengambilan darah sejumlah volume besar (bleeding) dilakukan pada pusat-pusat pengumpulan darah seperti pada telinga, jantung, dan leher. Untuk lebih jelasnya prosedur penyuntikan antigen ke dalam tubuh kelinci ini dapat dilihat pada Tabel 1.

Pada saat kelinci disuntikkan sejumlah 1.0 ml antigen, ada tiga galur (galur 43, 25 dan 23) yang menyebabkan kelinci mati, oleh karena itu dilakukan penyuntikan ulang ke dalam kelinci baru. Prosedur penyuntikan yang dilakukan hasil modifikasi dari Schmidt, Bankole dan Bohlool (1968). Untuk lebih jelasnya, prosedur penyuntikan antigen (galur 43, 25 dan 23) dapat dilihat dalam Tabel 2.

Pengambilan Darah dan Penyimpanan Serum.

Setelah titer cukup tinggi ($T > 3\ 200$), pengambilan darah dilakukan dalam jumlah besar untuk persediaan antiserum.



Tabel 1. Prosedur Penyuntikan Antigen ke dalam Tubuh Kelinci (Modifikasi dari Ariyanto, 1988).

Hari ke-	Prosedur
1	Penyuntikan 1 ml Suspensi Antigen (Ag) dan 1 ml Complete Freund's Adjuvant (CFA) pada skapula kanan, secara subkutan (Sc)
7	Penyuntikan 1 ml Suspensi Ag pada skapula kiri (Sc)
14	Tes darah untuk menentukan titer, apabila $T < 1600$ diberi suntikan ulangan 1 ml Ag (Sc) pada bagian dalam paha belakang
28	Tes darah dan titer, apabila $T < 1600$ diberi suntikan sepuluh hari berikutnya secara intravena (IV)
38	Penyuntikan 0.5 ml Suspensi Ag pada vena marginal telinga secara intravena (IV)
42	Penyuntikan 1.0 ml Suspensi Ag (IV) pada vena marginal telinga
49	Tes darah untuk menentukan titer antiserum
51	Penyuntikan 1.5 ml Suspensi Ag (IV) pada vena marginal telinga
55	Penyuntikan 2.0 ml Suspensi Ag (IV) pada vena marginal telinga
63	Tes darah dan titer
65	Bleeding dari pusat-pusat pengumpulan darah, seperti pada telinga, jantung dan leher



Tabel 2. Prosedur Penyuntikan Antigen ke dalam Tubuh Kelinci (Modifikasi dari Schmidt, Bankole, dan Bohlool, 1968).

Hari ke-	Prosedur
1	Penyuntikan 0.5 ml Suspensi Ag pada vena marginal telinga secara intravena
2	Penyuntikan 1.0 ml Suspensi Ag (IV)
3	Penyuntikan 1.5 ml Suspensi Ag (IV)
4 - 6	Istirahat
7	Penyuntikan 1.5 ml Suspensi Ag (IV)
8	Penyuntikan 2.0 ml Suspensi Ag (IV)
9	Penyuntikan 2.0 ml Suspensi Ag (IV) dan 2.0 ml Suspensi Ag (Sc)
16	Tes darah untuk menentukan titer
18	Bleeding dari pusat-pusat pengumpulan darah, seperti telinga, jantung dan leher

Sebelumnya, bulu-bulu pada bagian luar vena marginal telinga kelinci (pembuluh darah vena bagian luar kelinci) dicukur terlebih dahulu dengan bantuan pisau silet. Darah diambil dengan bantuan alat suntik (Terumo Syringe) 10 ml dan 20 ml, dengan ukuran jarum 20Gx1½ (0.90x38 mm) serta dihisap secara perlahan-lahan. Setelah itu darah ditampung dalam labu Erlenmeyer 500 ml steril yang ditutup dengan aluminium foil. Sebelum darah diambil vena marginal telinga kelinci diseka dengan kapas yang dibubuhi silol atau alkohol 70%, begitu pula setelah darah diambil. Bekas luka diseka dengan kapas yang dibubuhi alkohol 70%, dan ditutup



sampai darah membeku. Apabila aliran darah yang diambil dengan alat suntik bergerak lambat atau tidak keluar lagi, maka pengambilan darah dihentikan dan dibuat pengambilan darah baru pada vena marginal telinga kelinci di bagian atasnya. Pengambilan darah juga dilakukan melalui jantung dengan bantuan alat suntik (Terumo Syringe) 30 ml dengan ukuran jarum 18Gx1½ (1.20x38 mm). Jika darah sudah tidak keluar lagi, maka pengambilan darah terakhir dilakukan melalui leher, yang sekaligus dapat mematikan kelinci.

Darah yang tertampung dalam labu Erlenmeyer diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam. Jika darah sudah membeku, gumpalan darah yang menempel pada dinding tabung dilepaskan dengan bantuan batang aplikator kayu steril atau jarum inokulasi. Cairan bening yang diperoleh (serum) dipusing dengan kecepatan 5 000 rpm selama 15 menit, pada suhu 4°C (Beckmann), untuk mengendapkan sisa-sisa butiran darah merah. Cairan bening (serum) dapat diambil kembali dengan menginkubasikan labu Erlenmeyer pada suhu kamar dingin (4°C) selama 24 jam, agar gumpalan menyusut, atau cairan serum bertambah. Setelah inkubasi cairan serum dituang dalam tabung sentrifugasi dan dipusing seperti diatas. Supernatan atau serum yang diperoleh dapat dipusing kembali untuk lebih menjernihkan serum yang diperoleh. Antiserum yang telah jernih tersebut, kemudian ditempatkan dalam tabung-tabung reaksi kecil (13x45 mm) bertutup ulir sebanyak 2-3 ml per tabung, dan disimpan pada suhu -10°C di



dalam lemari es (freezer). Sebelum ditempatkan dalam tabung reaksi kecil, ke dalam antiserum ditambahkan bahan pengawet Merthiolat dengan konsentrasi akhir 0.01% (1ml larutan Merthiolat 1% dilarutkan ke dalam 100 ml antiserum). Antiserum dapat disimpan di dalam lemari es untuk waktu lebih lama dan dikeluarkan hanya bila akan digunakan.

Uji Aglutinasi

Uji aglutinasi yang digunakan ialah metode aglutinasi tabung, aglutinasi cawan plastik bercekung, dan aglutinasi dengan kaca objek (slaid). Uji aglutinasi di dalam tabung-tabung reaksi kecil (5x60 mm) dilakukan dengan cara mencampurkan 0.3 ml antigen ke dalam 0.3 ml antiserum yang juga telah diencerkan sampai 6 400. Uji aglutinasi di dalam cawan plastik bercekung dilakukan dengan cara mereaksikan 0.06 ml antigen ke dalam 0.06 ml antiserum yang telah diencerkan sampai 6 400. Pengenceran tertinggi dari antiserum yang masih menunjukkan reaksi positif digunakan sebagai titik akhir reaksi aglutinasinya. Kedua metode ini reaksinya diamati setelah diinkubasikan di dalam penangas air bersuhu 52°C selama 2 jam; 4 jam (Vincent, 1970), dan di- enapkan dalam refrigerator (lemari es bersuhu 4°C) selama 24 jam (Somasegaran dan Hoben, 1985). Uji aglutinasi dengan menggunakan kaca objek (slaid) dilakukan dengan mencampurkan satu tetes antigen dengan satu tetes anti-serum. Reaksi diamati setelah 1-2 menit pencampuran (Somasegaran dan Hoben, 1985). Metode-metode ini dilakukan



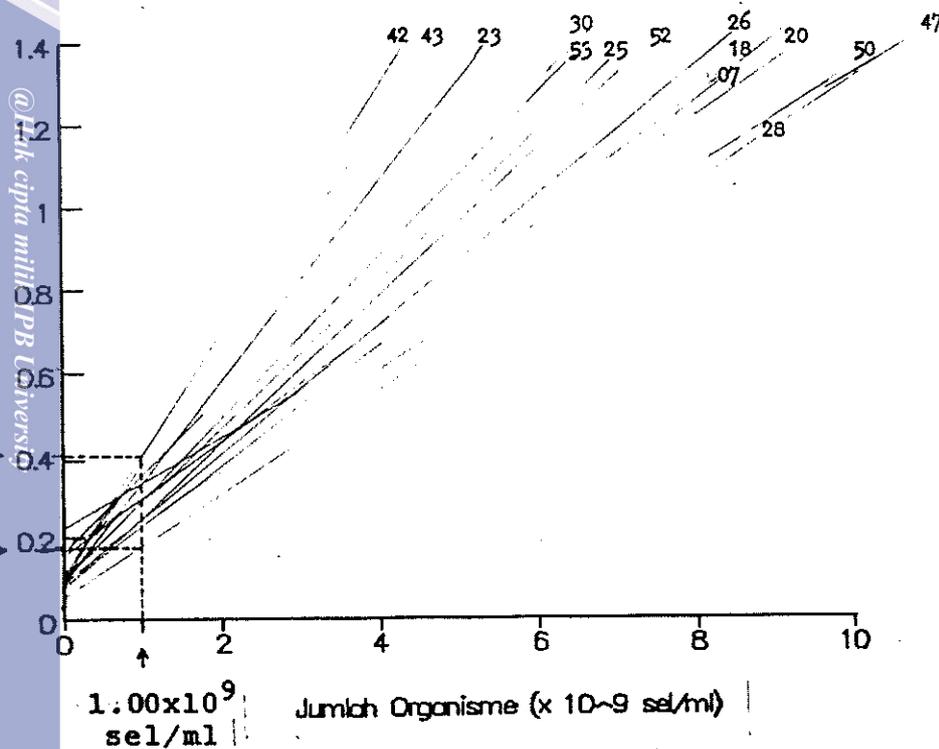
untuk menentukan nilai titer antiserum dengan antigen homolognya.

Uji aglutinasi silang menggunakan pengenceran antiserum 1/100 dan konsentrasi antigen $5-10 \times 10^9$ sel/ml (Vincent, 1970). Pengenceran antiserum 1/100 diharapkan dapat terikat oleh sejumlah antigen tersebut.

Pengukuran pengenceran antigen dilakukan dengan spektrofotometer Spectronic 20 (Bausch and Lomb, N.Y., USA) dengan rapat optis (OD_{620}) sebesar 0.43 (%T 37) agar kerapatan sel dalam biakan kurang lebih seragam. Penentuan kerapatan sel ini tidak jauh berbeda dengan hasil kurva standar masing-masing galur bakteri yang diuji. Kurva standar menentukan hubungan kekeruhan sel bakteri dengan rapat optis (OD_{620}) yang dihasilkan. Dari kurva standar diperoleh bahwa untuk mendapatkan organisme dengan konsentrasi 1×10^9 sel/ml, rapat optis yang dihasilkan 0.16-0.43 (Lihat Gambar Lampiran 1 sampai 14). Kecenderungan kurva standar setiap galur dapat di lihat pada Gambar 8.

Aglutinasinya dilakukan di dalam cawan plastik bercekung dengan mereaksikan 0.03 ml antigen ke dalam 0.03 ml antiserum (dengan bantuan mikropipet). Sebelumnya cawan plastik yang bercekung didesinfeksi dengan alkohol 70%, dan alkohol 96%, sedangkan pipet tipnya disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Sebagai kontrol dalam uji aglutinasi, digunakan suspensi antigen dan antiserum yang masing-masing ditetesi dengan larutan garam





Gambar 8. Kurva Standar Galur-Galur Uji yang menyatakan Hubungan antara Jumlah Organisme (sel/ml) dengan Nilai Rapat Optis ($OD_{620\text{ nm}}$)

fisiologis (NaCl 0.85%) sejumlah volume yang sama (0.03 ml). Setelah direaksikan, setiap cekungan diaduk dengan jarum inokulasi steril hingga rata. Tiap kali pengadukan jarum inokulasi disterilkan. Selanjutnya permukaan bagian atas cawan tersebut ditutup dengan aluminium foil, lalu diinkubasi di dalam penangas air bersuhu 52°C selama 2 jam dan 4 jam. Kemudian diletakkan dalam refrigerator (lemari es bersuhu 4°C) selama 24 jam. Aglutinasinya diamati dengan melihat reaksi yang terbentuk antara antigen dengan antiserum setelah dimasukkan ke dalam penangas air selama 1-2 jam dan 4 jam, serta setelah dimasukkan ke dalam refrigerator selama 24 jam, dengan bantuan mikroskop binokuler dan kaca pembesar.

Aglutinasi flagelar dikenali dengan melihat reaksi yang terbentuk antara antigen dengan antiserum (antibodi) yang merupakan agregat berukuran besar, flokulen dan lambat mengendap, sedangkan aglutinasi somatik berbentuk granular (butiran-butiran halus). Selain itu terdapat reaksi kombinasi di antara keduanya, yang menunjukkan kombinasi reaksi H dan O. Hal ini dilihat dengan membuat latar belakang gelap dan penyinaran secara tak langsung (Vincent, 1970).

Pada metode aglutinasi tabung, reaksi positif ditandai dengan terbentuknya granula di dasar tabung dengan supernatan jernih, sedangkan reaksi negatif dengan terbentuknya larutan yang putih keruh. Pada aglutinasi slaid dan aglutinasi dengan cawan plastik yang bercekung, reaksi positif ditandai dengan terbentuknya granula (butiran-butiran halus sampai butiran kasar) dengan area jernih disekitarnya, sedangkan reaksi negatif, ditandai dengan adanya cairan putih keruh yang tampak menyebar.

Penetapan titer yang menyatakan hubungan antara antigen dengan antibodi dilakukan untuk beberapa galur (galur 53, 52, 50, 42, 20, 30, dan 18), mengingat terbatasnya alat. Galur-galur ini dipilih mewakili kelompok titer antiserumnya, yaitu kelompok titer $> 1\ 600$, $1\ 600$ dan $< 1\ 600$. Selanjutnya dibuat histogram yang menyatakan hubungan nilai titer antiserum dengan dosis antigen yang disuntikkan.



HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Pengamatan

Hasil pengamatan morfologi koloni terhadap ke-12 galur uji dan 2 galur standar di atas medium MEK yang dibubuhi zat warna merah kongo pada suhu 28°C menunjukkan bahwa semua galur tersebut memiliki ciri-ciri berbentuk bundar, cembung, berlendir, dan tembus cahaya sesuai dengan ciri khas bakteri bintil akar yang tergolong Bradyrhizobium (Jordan, 1984). Pemunculan koloni terjadi setelah 7 hari inkubasi pada suhu 28°C, dengan diameter koloni antara 0.1 sampai 4.0 mm, sedangkan tipe koloninya, yaitu large mucoid (LM), small dry (SD) dan kombinasi LM dan SD, sesuai ciri-ciri yang dikemukakan oleh Fuhrmann, 1990. Pengamatan morfologi koloni tersebut dapat dilihat dalam Tabel 3.

Penumbuhan bakteri bintil akar kedelai di atas medium agar MEK yang dibubuhi zat warna merah kongo tersebut, juga telah memperlihatkan bahwa semua galur cenderung tidak mampu menyerap warna merah dengan baik. Salah satu contoh morfologi koloni bakteri bintil akar dapat dilihat dalam Gambar 9, sedangkan tipe koloninya dapat dilihat dalam Gambar 10.

Ciri lain yang menunjukkan bahwa bakteri tergolong tumbuh lambat ditunjang oleh hasil perhitungan waktu generasinya. Galur-galur uji memiliki waktu generasi antara 8.34 sampai 17.88 jam.

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

Tabel 3. Ciri-ciri Koloni Galur Uji di atas Medium Agar Cawan MEK + Merah Kongo, pada suhu 28°C, setelah 7 hari.

Kode galur	Diameter (mm)	Ciri-ciri koloni	Tipe koloni
53	0.5-1.0	bundar, cembung, tembus cahaya	SD
52	0.5-1.0	bundar, cembung, tembus cahaya	SD
50	0.5-1.0 1.0-1.5	bundar, cembung, tembus cahaya berlendir, bundar, cembung, relatif tembus cahaya	SD LM
47	0.5-1.0 1.0-1.5	bundar, cembung, tembus cahaya berlendir, bundar, cembung, relatif tembus cahaya	SD LM
43	0.1-0.5	bundar, cembung, tembus cahaya	SD
42	1.0-2.5	berlendir, bundar, cembung, relatif tembus cahaya	LM
30	2.0-4.0	berlendir, bundar, cembung, relatif tembus cahaya	LM
28	1.5-3.0	berlendir, bundar, cembung, relatif tembus cahaya	LM
26	0.1-0.5	bundar, cembung, tembus cahaya	SD
25	0.5-1.0 1.0-2.0	bundar, cembung, tembus cahaya berlendir, bundar, cembung, relatif tembus cahaya	SD LM
23	0.1-0.5	bundar, cembung, tembus cahaya	SD
20	0.5-1.0	bundar, cembung, tembus cahaya	SD
18	0.1-0.5	bundar, cembung, tembus cahaya	SD
07	0.1-0.5	bundar, cembung, tembus cahaya	SD

Keterangan:

SD = Small dry

LM = Large Mucoid





@Hak cipta milik IPB University



(A)

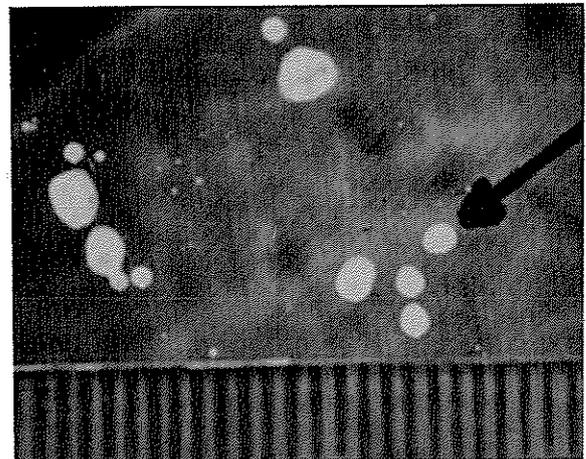


(B)

Gambar 9. Morfologi Koloni Galur Uji dengan Metode Cawan Gores di atas Medium Agar MEK + Merah Kongo, setelah 7 hari inkubasi pada suhu 28°C (A) Galur 50 (B) Galur 42



(A)



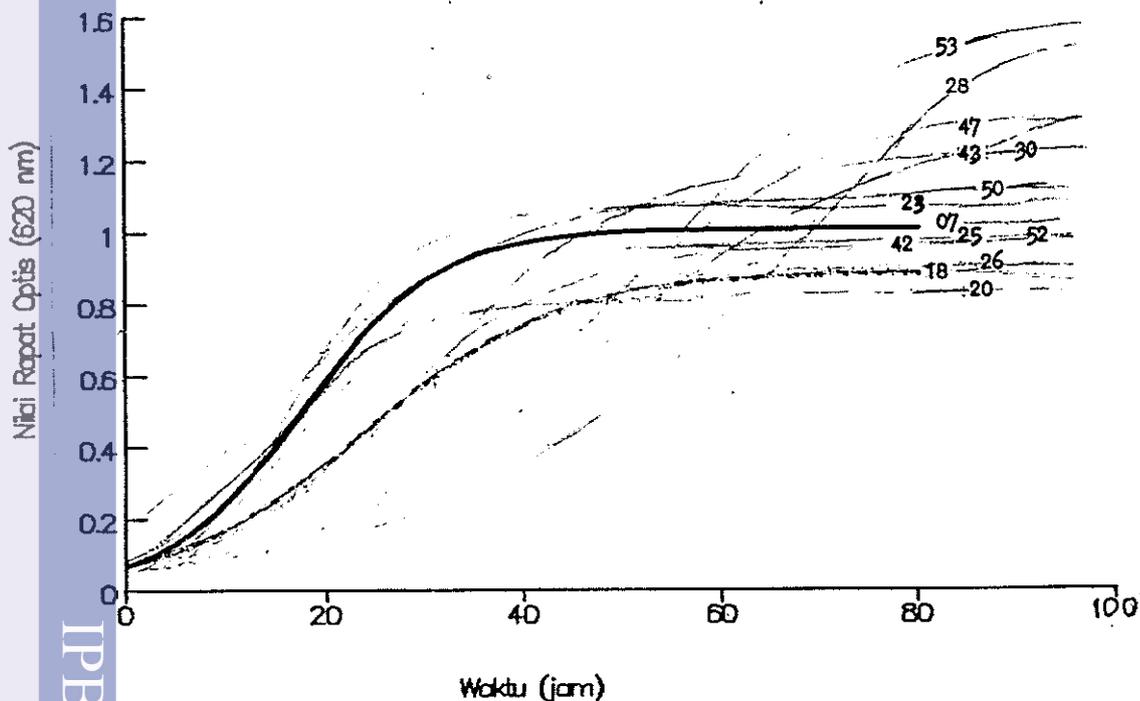
(B)

Gambar 10. Morfologi Koloni dua Galur Uji di atas Medium Agar Cawan MEK + Merah Kongo, (A) Tipe Koloni SD (Galur 30), (B) Tipe Koloni Dimorfis, LM dan SD (Galur 50). Foto: Perbesaran Asli x10.

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

Hasil pertumbuhan bakteri di atas medium kaldu MEK dengan perlakuan pengocokan pada suhu 28°C selama 3-4 hari menunjukkan bahwa semua galur cenderung tumbuh mengikuti persamaan kurva sigmoid, seperti fase pertumbuhan bakteri pada umumnya. Pendugaan kurva pertumbuhan dan waktu generasi masing-masing galur bakteri bintil akar kedelai efektif diuraikan secara sistematis pada Gambar Lampiran 15 sampai Gambar Lampiran 28. Kecenderungan kurva pertumbuhan setiap galur dapat di lihat pada Gambar 11.

Hasil penyuntikan antigen secara subkutan menunjukkan bahwa kelinci percobaan mampu membentuk antibodi saat pengambilan darah pertama (hari ke-14), tetapi penetapan nilai



Gambar 11. Hasil Kurva Pertumbuhan Galur-Galur Uji berdasarkan Model Persamaan Logistik (Hasibuan, 1988)

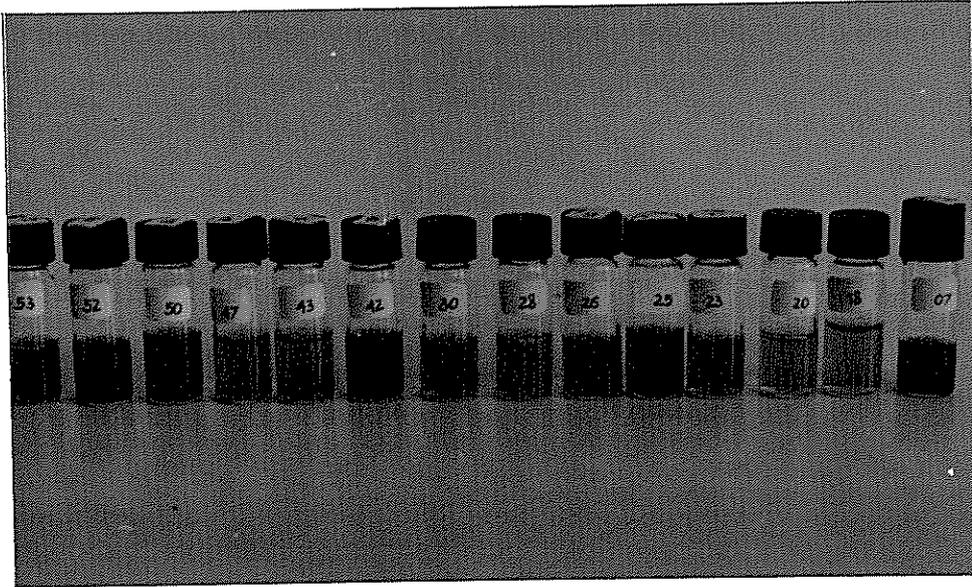


titer antiserum yang dihasilkan semua galur uji masih rendah (kurang dari 1 600), sehingga dilakukan penyuntikan ulangan. Dua minggu setelah penyuntikan ulangan (hari ke-28), nilai titer antiserum yang dihasilkan mengalami kenaikan tetapi masih kurang dari 1 600. Oleh karena itu, dilakukan penyuntikan antigen kembali secara intravena. Hasil penyuntikan antigen secara intravena (IV) pada hari ke-49 (seminggu setelah penyuntikan ke-dua (IV) nilai titer antiserum yang dihasilkan masih belum mencapai nilai titer yang dikehendaki (1 600) sehingga penyuntikan antigen (IV) yang ketiga dan keempat dilakukan, tetapi dengan jumlah 1.5 ml dan 2.0 ml. Seminggu kemudian, pengambilan darah dilakukan, yaitu pada hari ke-63 dan nilai titer antiserum yang dihasilkan sudah mencapai 1 600 (tabung ke-6). Galur tersebut masing-masing adalah 53, 52, 50, 47, 42, dan 28.

Pengambilan darah sejumlah volume yang lebih besar dilakukan 2 hari berikutnya (hari ke-63), sebagai persediaan antiserum. Selanjutnya, antiserum ditempatkan dalam tabung-tabung reaksi kecil (13x45 mm) bertutup ulir sebanyak 2-3 ml per tabung, seperti terlihat dalam Gambar 12, dan disimpan pada suhu -10°C di dalam lemari es. Sebelum ditempatkan dalam tabung reaksi kecil, antiserum ditambahkan bahan pengawet Merthiolat 0.01% (Somasegaran dan Hoben, 1985).

Hubungan antara dosis antigen yang disuntikkan dengan nilai titer antiserum yang dihasilkan, dapat dilihat pada





Gambar 12. Siapan Antiserum Galur-Galur Uji yang dihasilkan Antigen Homolognya

Tabel 4, tetapi hanya dilakukan untuk beberapa galur sesuai kelompok titernya, yaitu galur 53, 52, 50, 42, 20, 30, dan 18. Nilai titer antiserum semua galur uji terbagi menjadi 3 kelompok, yaitu kelompok pertama dengan nilai titer antiserum $> 1\ 600$ (Galur 53, 52 dan 25); kelompok kedua dengan nilai titer 1 600 (Galur 50, 47, 42, 28 dan 23) dan kelompok ketiga dengan titer $< 1\ 600$ (Galur 43, 30, 26, 20, 18 dan 07).

Histogram yang menunjukkan hubungan antara dosis antigen dengan nilai titer antiserum pada galur-galur yang telah disebutkan terdahulu dapat dilihat seperti Gambar 13.

Mengingat ada tiga galur (43, 25, dan 23) yang menyebabkan kelinci mati setelah disuntikkan antigen sejumlah



Tabel 4. Nilai titer antiserum pada hari ke-14, 28, 49 dan 63

Kode Galur	Nilai Titer hari ke- (dosis antigen)			
	14 (3 ml)	28 (4 ml)	49 (5.5 ml)	63 (9 ml)
53	1 600	3 200	6 400	6 400
52	400	800	3 200	3 200
50	400	400	800	1 600
42	400	400	1 600	1 600
30	x	100	400	400
20	200	200	800	800
18	100	200	200	200

Keterangan:

Reaksi positif terjadi antara antibodi dengan antigen homolognya di dalam cawan plastik yang bercekung setelah dipanaskan dalam penangas air 52°C selama 4 jam dan direfrigerator selama 24 jam.

x = tidak terdeteksi

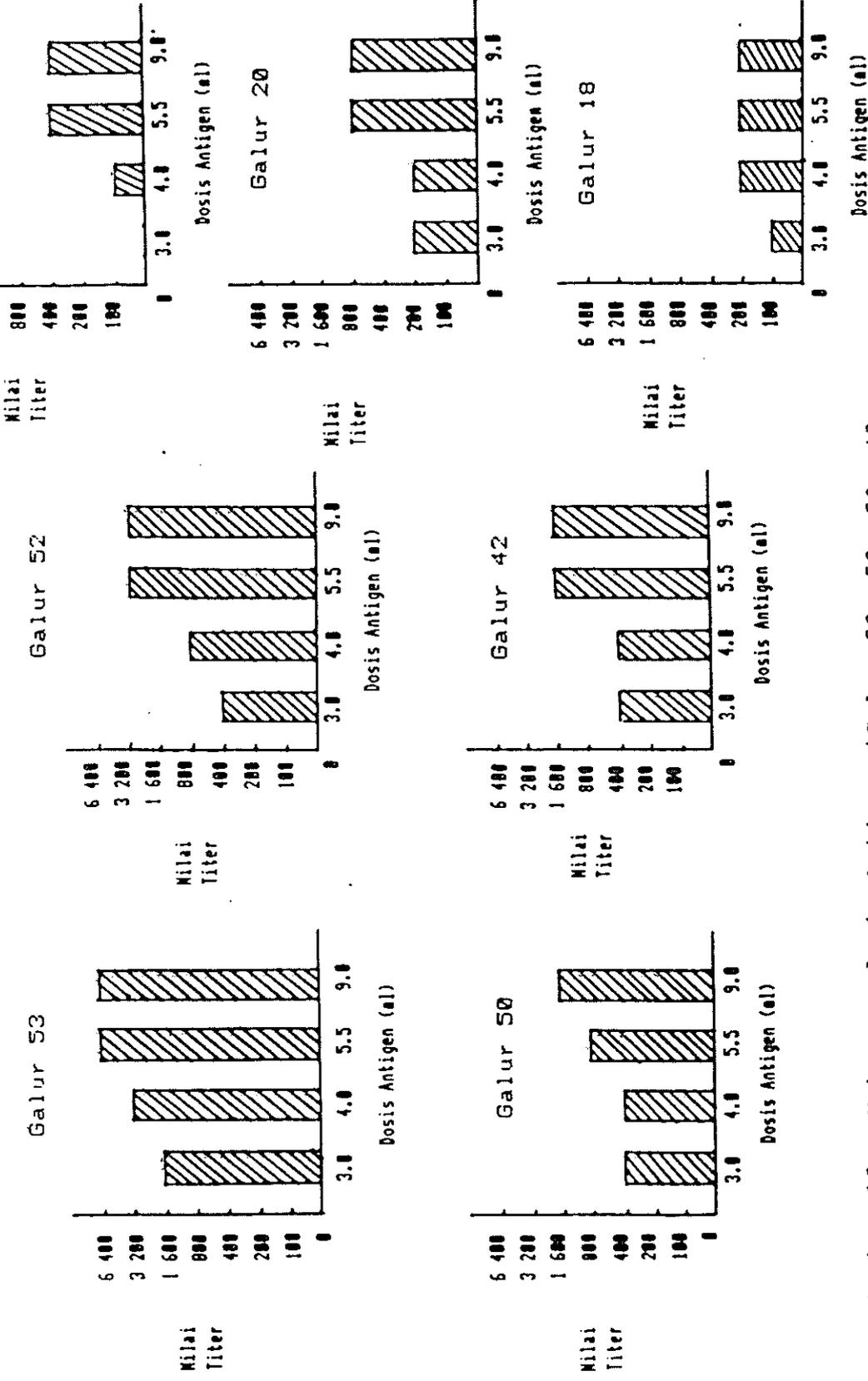
1.0 ml (secara intravena) maka ketiga galur ini diulang kembali penyuntikannya ke dalam kelinci baru dengan mengikuti metode penyuntikan yang dilakukan Schmidt, Bankole dan Bohlool (1968) yang telah dimodifikasi (Tabel 2). Penetapan nilai titer antiserum yang dihasilkan pada hari ke-16 masing-masing adalah 800 (galur 43), 1 600 (galur 23), dan 3 200 (galur 25).





Ante 30

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
 1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
 2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



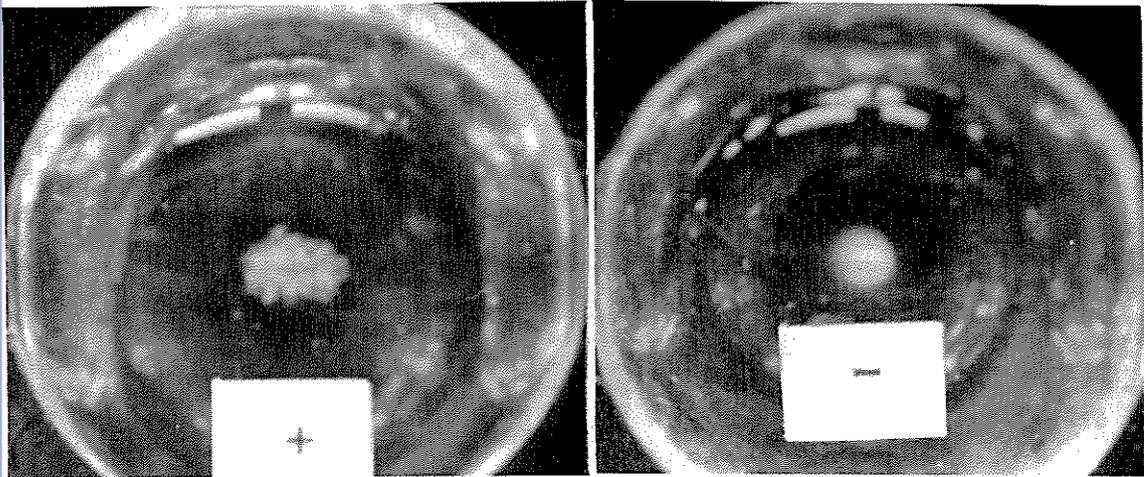
Gambar 13. Hubungan dosis Antigen (Galur 53, 52, 50, 42, 30, 20 dan 18) pada hari ke-14, 28, 49 dan 63 terhadap Nilai Titer Antiserum.

Hasil pengamatan uji aglutinasi dengan cawan plastik bercekung setelah dibiarkan di dalam penangas air bersuhu 52°C selama 2 jam dan 4 jam tidak berbeda hasilnya bila diamati langsung. Hasil reaksi ini tampak lebih jelas, setelah dienapkan selama 24 jam di dalam refrigerator (lemari es bersuhu 4°C), sehingga yang diamati selanjutnya hanya reaksi yang terbentuk setelah dimasukkan refrigerator selama 24 jam. Aglutinasi slaid yang dilakukan pada saat penentuan nilai titer antiserum (hari ke-14) tidak menunjukkan hasil reaksi positif yang jelas, karena beberapa galur (galur 47, 42, 28 dan 18), reaksinya terbentuk setelah 10 menit, bahkan 2 galur (galur 30 dan 26) tidak terdeteksi, sedangkan aglutinasi tabung yang dilakukan walaupun menunjukkan hasil reaksi positif yang jelas tetapi tidak dilakukan lebih lanjut mengingat keterbatasan tabung, selain jumlah antigen dan antiserum yang dibutuhkan cukup besar.

Reaksi positif ditandai dengan terbentuknya granula (butiran-butiran halus sampai butiran kasar) dengan cairan jernih tampak disekitarnya, sedangkan reaksi negatif tidak terbentuk granula, dan cairan putih keruh tampak menyebar (Gambar 14).

Dari 14 reaksi aglutinasi homolog, 5 diantaranya tampak kuat (antigen-antiserum 53, 52, 47, 43 dan 42), sedangkan 9 lainnya tampak lemah (antigen-antiserum 50, 30, 28, 26, 25, 23, 20, 18 dan 07). Dari 182 reaksi silang yang dilakukan hanya 35 (19.23%) yang menunjukkan terjadinya





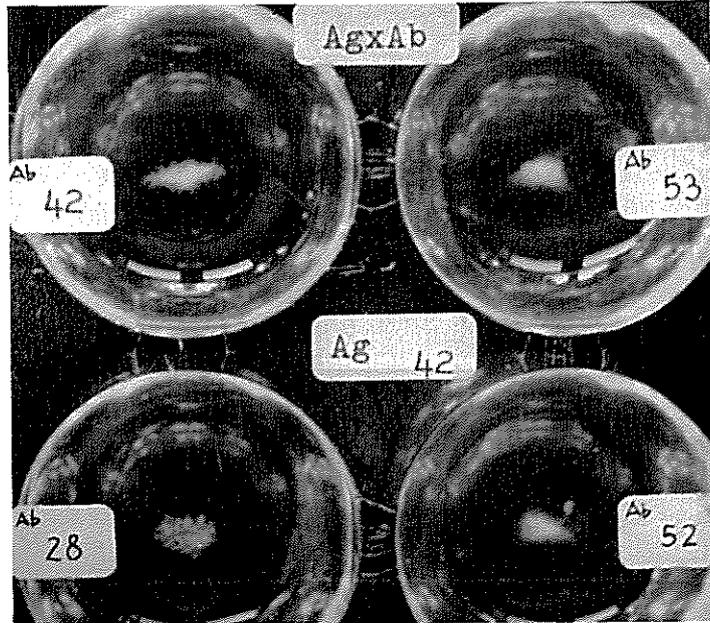
(A)

(B)

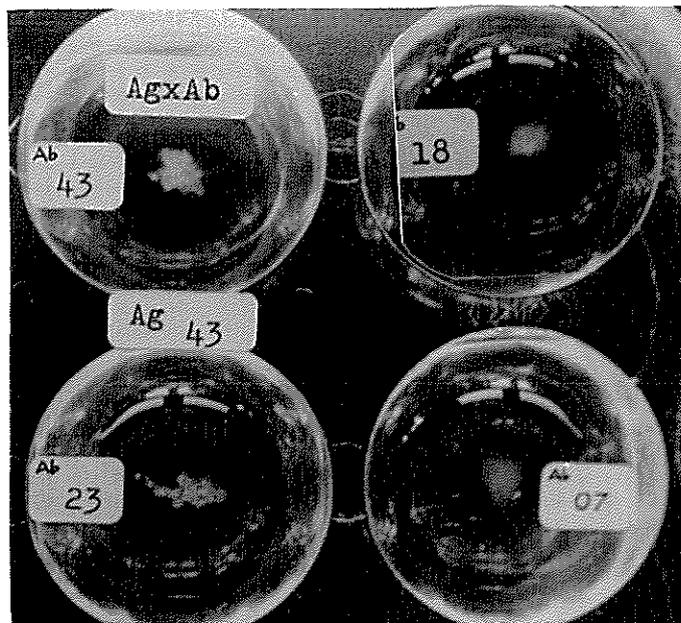
Gambar 14. Reaksi Aglutinasi Antigen-Antibodi di dalam Cawan Plastik bercekung. (A) Reaksi positif (Antigen 42 dengan Antibodi 28) (B) Reaksi negatif (Antigen 26 dengan Antibodi 28). Foto: Perbesaran Asli x20.

pembentukan gumpalan positif (Gambar 15 dan 16), sedangkan sebagian besar tidak bereaksi (80.77%), seperti terlihat dalam Gambar 17 (tidak semua data ditampilkan).

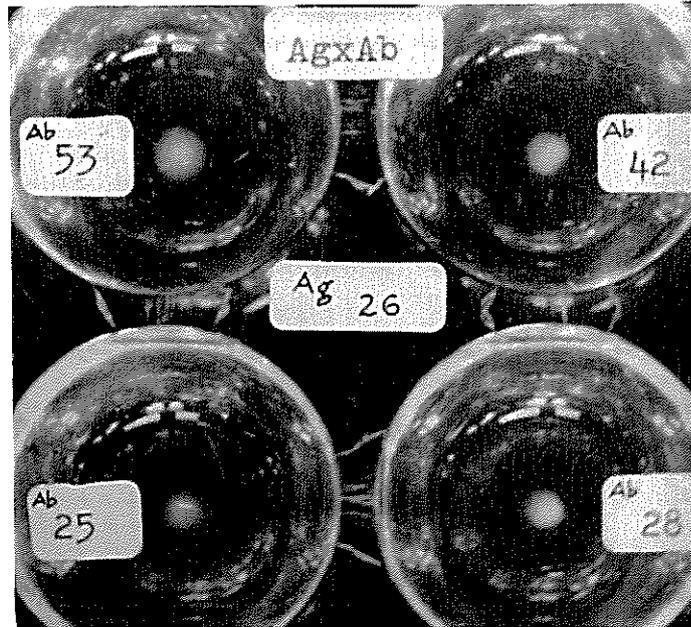
Dari 35 reaksi silang yang terbentuk, 1 di antaranya menunjukkan reaksi yang tampak sangat kuat (antigen 42-antiserum 28), 13 reaksi tampak kuat (antigen 52-antiserum 53, antigen 50-antiserum 47, antigen 43-antiserum 23, antigen 30-antiserum 53, antigen 30-antiserum 52, antigen 28-antiserum 42, antigen 25-antiserum 18, antigen 25-antiserum 07, antigen 23-antiserum 18, antigen 23-antiserum 07, antigen 20-antiserum 50, antigen 18-antiserum 07, antigen 07-antiserum 18), dan 21 reaksi lainnya tampak lemah,



Gambar 15. Reaksi Aglutinasi Positif antara Antigen 42 dengan Antibodi 53, 52, 42 dan 28. Foto: Perbesaran Asli x10.



Gambar 16. Reaksi Aglutinasi Positif antara Antigen 43 dengan Antibodi 43, 23, 18 dan 07. Foto: Perbesaran Asli x10.



Gambar 17. Reaksi Aglutinasi Negatif antara Antigen 26 dengan Antibodi 53, 42, 25 dan 28. Foto: Perbesaran Asli x10.

seperti terlihat dalam Tabel 5. Dari uji aglutinasi ada beberapa jenis reaksi silang yang tampak (Tabel 6).

Hasil pengamatan uji aglutinasi silang terhadap semua galur menunjukkan bahwa antigen yang diuji ada yang mampu membentuk aglutinasi terhadap antiserum dari galur lain. Dengan demikian, dapat dikatakan bahwa secara serologis galur-galur bakteri bintil akar kedelai efektif tersebut ada yang sekerabat. Pengelompokan galur tersebut masing-masing adalah kelompok galur 43, 23, dan 07 yang antigennya dapat dikenali oleh antiserum dari galur 43, 26, 23, 18, dan 07; kelompok galur 50, 47, dan 20 yang antigennya dapat dikenali oleh antiserum dari galur 50, 47 dan 20; kelompok galur 42, 30, dan 28. Antigen galur 42 dapat dikenali oleh

Tabel 5. Reaksi Galur-Galur Bakteri Bintil Akar Kedelai berdasarkan Uji Aglutinasi

Galur Uji	Aglutinasi dengan antiserum dari galur:													
	53	52	50	47	43	42	30	28	26	25	23	20	18	07
53	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
52	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50	-	-	+	++	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
47	-	-	+	++	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
43	-	-	-	-	++	-	-	-	+	-	++	-	+	-
42	+	+	-	-	+	++	+	+++	-	-	-	+	-	-
30	++	++	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
28	+	-	-	-	-	++	+	+	-	-	-	-	-	-
26	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	++	++
23	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	++
20	-	-	++	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++
07	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	++	+

Keterangan:

Reaksi diamati di dalam cawan plastik yang bercekung, setelah dipanaskan dalam penangas air 52°C selama 4 jam dan refrigerator selama 24 jam, dengan dua kali ulangan.

+++ : reaksi penggumpalan jelas (flokulen), agregat besar (butiran kasar), lambat mengendap (reaksi sangat kuat);
 ++ : penggumpalan yang terjadi berkurang (butiran tidak begitu besar), lambat mengendap (reaksi kuat); + : penggumpalan berupa granula (berbutiran halus (reaksi lemah);
 - : reaksi tidak terjadi (granula tidak terbentuk).

Antiserum dari galur 53, 52, 43, 42, 30, 28 dan 20, antigen galur 30 dapat dikenali oleh antiserum dari galur 53, 52, 42, 30, dan 28, sedangkan antigen galur 28 dapat dikenali oleh antiserum dari galur 53, 42, 30 dan 28; kelompok galur 25, dan 18 yang antigennya dapat dikenali oleh antiserum

Tabel 6. Uji Aglutinasi Silang antara Antigen-Antibodi pada Galur yang sama dan Jenis Reaksinya

Ag	Ab	Reaksi	Ab	Ag	Reaksi	Jenis
42	28	+++	42	28	++	A (1)
18	07	++	18	07	++	B (1)
50	47	++	50	47	+	C ₁ (3)
43	23	++	43	23	+	
23	07	++	23	07	+	C ₂ (1)
52	20	+	52	20	++	
47	20	+	47	20	+	D (3)
43	07	+	43	07	+	
30	28	+	30	28	+	
53	52	-	53	52	++	E ₁ (4)
53	30	-	53	30	++	
52	42	-	52	42	++	
52	30	-	52	30	++	E ₂ (3)
25	18	++	25	18	-	
25	07	++	25	07	-	
23	18	++	23	18	+	F ₁ (5)
53	42	-	53	42	+	
53	28	-	53	28	+	
43	42	-	43	42	+	
26	23	-	26	23	+	
26	07	-	26	23	+	F ₂ (5)
43	26	+	43	26	-	
43	18	+	43	18	-	
42	30	+	42	30	-	
42	20	+	42	20	-	
30	20	+	30	20	-	G (65)
53	26	+	53	26	-	
26	25	-	26	25	-	

Keterangan:

Huruf yang berbeda menyatakan jenis reaksi yang terbentuk, sedangkan angka di belakangnya menunjukkan banyaknya reaksi

dari galur 25, 18 (untuk antigen 25), dan 07 (untuk antigen 18); Galur 53, dan 26 merupakan galur yang berbeda dari yang lain karena antigennya masing-masing dapat dikenali oleh antiserumnya sendiri, sedangkan galur 52 antigennya hanya dikenali oleh antiserum dari galur 53, dan 52.



Pembahasan

Dalam penelitian sebelumnya dihasilkan 12 galur uji yang menunjukkan ciri-ciri bakteri bintil akar kedelai yang tergolong tumbuh lambat dan terbukti keunggulannya, karena efektif dalam menambat nitrogen (Tedja Imas, 1991).

Di dalam pencirian kecepatan tumbuh bakteri berdasarkan kriteria cepat-lambatnya pemunculan koloni di atas medium agar MEK yang dibubuhi zat warna merah kongo, terlihat bahwa semua galur bakteri tumbuh dengan lambat yang ditandai munculnya koloni setelah 7 hari inkubasi pada suhu 28°C, berdiameter antara 0.1 sampai 4.0 mm, dan cenderung tidak mampu menyerap warna merah dengan baik. Semua galur bakteri bintil akar kedelai mempunyai ciri-ciri berbentuk bundar, cembung, berlendir, dan relatif tembus cahaya. Pengamatan morfologi ini diikuti pula dengan tipe koloninya. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa dari 12 galur uji; 3 galur bertipe koloni large mucoid (LM) dengan ciri-ciri berlendir, bundar, cembung, relatif tembus cahaya dan berdiameter koloni antara 1.0 sampai 4.0 mm; 6 galur bertipe koloni small dry (SD) dengan ciri-ciri berbentuk bundar, cembung, tembus cahaya dan berdiameter koloni antara 0.1 sampai 1.0 mm; 3 galur lainnya bertipe koloni dimorfis, yaitu SD dan LM dengan diameter koloni antara 0.5 sampai 2.0 mm, sedangkan tipe koloni large watery (LW) dengan ciri-ciri berair, datar, tembus cahaya, berupa granula dan



cenderung tidak teratur, dengan diameter koloni > 1 mm, tidak dijumpai dalam penelitian ini.

Ciri-ciri ini sesuai yang dikemukakan oleh Fuhrmann (1990), dimana tipe koloni LM paling banyak dijumpai dalam populasi Bradyrhizobium yang menodulasi tanaman kedelai dengan ciri-ciri berlendir, cembung, tembus cahaya atau tidak, dan berdiameter > 1 mm setelah 7-10 hari pertumbuhan pada suhu 28°C . Selanjutnya diikuti tipe SD dengan ciri-ciri koloni yang lebih cembung, relatif tembus cahaya atau tidak, dan berdiameter ≤ 1 mm. Menurut Fuhrmann (1990), galur tipe koloni LM banyak dijumpai dalam populasi asli bakteri bintil akar kedelai di USA, dan cenderung memiliki kemampuan menambat nitrogen lebih besar dibandingkan galur tipe koloni SD. Dua dari 3 galur uji yang bertipe koloni LM (galur 42 dan 28) memang memiliki nilai efektivitas simbiotik yang tinggi (168.46% dan 133.50% pada kontrol N), selebihnya bertipe koloni SD dan kombinasi SD dan LM (dimorfis). Dengan demikian pendapat Fuhrmann tidak sepenuhnya berlaku untuk galur-galur uji yang diteliti.

Dua galur standar, masing-masing galur 52 (USDA 110) dan galur 53 (USDA 122) bertipe koloni small dry (SD) dengan diameter koloni antara 0.5 sampai 1.0 mm.

Peneliti lain yang mengamati diameter koloni melaporkan bahwa galur-galur bakteri bintil akar kedelai tumbuh lambat dengan diameter koloni berkisar antara 0.5 sampai 1.5 mm setelah 7 hari inkubasi pada suhu 28°C (Ariyanto,



1988), sedangkan USDA 110 berkisar antara 1.0 sampai 2.5 mm, dan USDA 122 berkisar antara 1.5 sampai 3.5 mm (Muller dan Wollum II, 1989). Selanjutnya peneliti lain (Bradley, Thornton dan Jones (1988) juga melaporkan bahwa galur-galur Bradyrhizobium memiliki koloni dimorfis dengan dua tipe koloni yang tampak kering dan berair (D: drier, dan W: wetter). Koloni ini tumbuh di atas medium agar MEK setelah diinkubasi pada suhu 28°C sampai koloni berumur 20 hari. Dengan demikian galur-galur uji yang diteliti memiliki kesesuaian terhadap pendapat beberapa peneliti di atas, namun tak satu galurpun memiliki tipe koloni yang berair.

Ciri lain yang menunjukkan bahwa bakteri tergolong tumbuh lambat ditunjang oleh hasil perhitungan waktu generasinya. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa semua galur bakteri bintil akar kedelai tumbuh lambat memiliki waktu generasi antara 8.34 sampai 17.88 jam. Dengan demikian hasil ini sesuai ciri dari kelompok bakteri bintil akar kedelai yang tumbuh lambat, dengan waktu generasi lebih dari 6 jam (Stowers, 1985), 6-9 jam (Somasegaran dan Hoben, 1985), 8-20 jam (Israel et al., 1986), 6.7-13.0 jam (Keyser et al., 1982) atau 9.57-18.55 jam (Ariyanto, 1988).

Reaksi aglutinasi positif ditandai dengan terbentuknya gumpalan agregat besar sampai kecil berupa butiran-butiran halus, dengan cairan jernih disekitarnya. Dari ke-3 metode aglutinasi yang dilakukan ternyata aglutinasi dengan menggunakan cawan plastik bercekung menunjukkan penampakan



reaksi lebih baik dibandingkan dengan aglutinasi kaca objek (slaid), dan sama baiknya dengan aglutinasi tabung. Namun aglutinasi tabung memerlukan volume lebih besar dibandingkan aglutinasi dengan cawan plastik bercekung. Selain itu memerlukan tabung-tabung reaksi yang banyak jumlahnya. Hal ini terlihat pada saat melakukan penetapan nilai titer antiserum.

Kelinci (hewan) percobaan mampu membentuk antibodi pada hari ke-14, yaitu saat pengambilan darah pertama dari hasil penyuntikan antigen homolognya secara subkutan untuk semua galur uji yang disuntikkan. Namun nilai titer antiserum yang dihasilkan masih rendah (100-1 600). Begitu pula nilai titer antiserum hari ke-28 (setelah penyuntikan ulangan) menunjukkan nilai titer yang rendah yaitu 200-3 200. Nilai titer antiserum mengalami peningkatan setelah dilakukan penyuntikan secara intravena (hari ke-49) tetapi nilai ini masih rendah (kurang dari nilai titer yang harus dicapai yaitu 3 200-6 400), namun ada pula yang telah mencapai titer 1 600 dan 3 200. Pengujian pada hari ke-63 tidak menunjukkan kenaikan nilai titer antiserum yang berarti. Dengan demikian galur-galur yang di uji memiliki respon yang tinggi (optimal) pada hari ke-49 dengan dosis penyuntikan 5.5 ml, berbeda dengan galur standar yang masih menunjukkan respon tinggi pada hari ke-63 dengan dosis penyuntikan 9.0 ml. Perbedaan respon pembentukan antibodi ini kemungkinan berkaitan dengan perbedaan sifat-sifat



antigeniknya atau sifat molekularnya yang tidak sama. Menurut Dudman (1971) komponen-komponen antigenik yang berperan dalam reaksi aglutinasi sangat sulit ditentukan, kemungkinan sekali komponen tersebut berkaitan erat dengan substansi somatik bakteri bintil akar kedelai yang biasanya berupa polisakarida ekstraselular. Selain itu kemungkinan pada saat penyuntikan antigen titer antiserum yang dihasilkan telah mencapai titik puncak dan mengalami penurunan. Penurunan ini disebabkan karena antigen telah habis, sel B tidak berdiferensiasi menjadi sel plasma dan sel plasma penghasil antibodi akan mati (Pelczar dan Chan, 1981). Respon antibodi yang dihasilkan dapat berubah secara kualitatif karena adanya perbedaan kelas dari imunoglobulin (Ig) (Pasaribu dan Joeniman, 1988). Meskipun IgG banyak terdapat di dalam serum, namun daya aglutinasinya kurang dibandingkan IgM (Bergersen, 1980). Sedangkan IgM hanya dihasilkan setelah 10-14 hari penyuntikan antigen.

Penyuntikan yang berbeda dapat menimbulkan respon pembentukan antibodi yang berbeda, seperti yang dihasilkan dalam penelitian ini. Hasil penyuntikan antigen secara intravena terhadap kelinci memiliki respon antibodi yang lebih baik dibandingkan secara subkutan. Harlow dan Lane (1988), melaporkan bahwa penyuntikan antigen secara intravena menunjukkan respon terbentuknya antibodi cepat, dapat menimbulkan dan merangsang emboli paru-paru (pulmonary embolism) serta dapat menimbulkan kematian hewan percobaan



Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :

- a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
- b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

karena shock (lethal anaphylactic shock). Di samping itu, metode intravena memerlukan antigen terlarut dengan jumlah volume penyuntikan 1 ml, dan konsentrasinya tidak perlu tinggi (OD 0.365 atau 43.15%T), sedangkan metode subkutan memiliki respon imun yang lambat pada kelinci percobaan, memerlukan antigen partikulat atau terlarut, dan penyuntikannya dengan volume 0.8 ml setiap situs (tempat), tetapi lokasi injeksinya harus 10 situs (tempat). Metode penyuntikan subkutan mudah dilakukan (simple) bila dibandingkan metode intravena (Bergersen, 1980), karena metode intravena memerlukan ketrampilan yang lebih baik. Pengambilan darah pada umumnya dilakukan pada vena/arteri telinga, yaitu pada vena lateralis dan arteria centralis telinga, sedangkan pengambilan darah dari jantung dilakukan untuk memperoleh seluruh darah kelinci dan ini dilakukan oleh orang yang sudah berpengalaman (Smith dan Mangkoewidjojo, 1988).

Metode intravena ternyata menunjukkan respon antibodi yang cukup baik, hal ini terbukti setelah hari ke-16 nilai titer antiserum yang dihasilkan ada yang tinggi (3 200). Nilai titer antiserum galur-galur yang diulang dengan prosedur penyuntikan hasil modifikasi Schmidt, Bankole dan Bohlool (1968) menunjukkan nilai titer sebesar 3 200 untuk galur 25, 1 600 untuk galur 23 dan 800 untuk galur 43. Nilai titer antiserum dapat ditingkatkan, dengan cara menyuntikan kembali suspensi antigen selang waktu 2 hari berikutnya, sebelum pengambilan darah dalam volume besar



(bleeding). Prosedur penyuntikan ini sangat baik untuk dikembangkan, mengingat dalam waktu relatif singkat (hari ke-16), antibodi sudah terbentuk dengan nilai titer antiserum tinggi.

Hasil reaksi aglutinasi dengan cawan plastik bercekung, setelah dibiarkan dalam penangas air bersuhu 52°C selama 2 jam dan 4 jam tidak berbeda hasilnya bila diamati langsung, walaupun menurut Vincent (1970) aglutinasi flagelar dapat terlihat setelah 1-2 jam yang ditandai dengan terbentuknya gumpalan agregat berukuran besar, flokulen dan lambat mengendap, sedangkan aglutinasi somatik terlihat setelah 4 jam yang ditandai dengan terbentuknya gumpalan agregat berupa granula-granula berbutiran halus. Dengan kata lain, variasi perlakuan pemanasan (2 jam dan 4 jam) tidak mempengaruhi penampilan reaksi aglutinasinya, apabila diamati langsung. Pembentukan reaksi aglutinasi ini tampak lebih tegas setelah diterapkan dalam refrigerator (lemari es bersuhu 4°C) selama 24 jam. Hal ini sesuai dengan Somasegaran dan Hoben (1985), yang mengemukakan bahwa penampakan reaksi aglutinasi pada cawan plastik bercekung dilakukan setelah dimasukkan dalam penangas air bersuhu 52°C selama 4 jam, dan dibiarkan selama 24 jam dalam refrigerator (4°C). Selain itu, penampakan reaksi aglutinasi (reaksi antigen-antibodi pada cawan plastik bercekung) juga dapat dilakukan dengan menginkubasikan pada inkubator bersuhu 37°C selama 2 jam dan refrigerator (4°) selama 24 jam.



Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

Penampilan reaksi aglutinasi homolog, dan reaksi silangnya ada yang menunjukkan perbedaan terhadap gumpalan yang terbentuk, yaitu dari flokulen, agregat berukuran besar (butiran-butiran kasar) sampai berupa granula-granula yang lebih kecil (butiran-butiran halus). Dengan demikian, dapat diduga bahwa reaksi-reaksi tersebut kemungkinan besar merupakan reaksi aglutinasi flagelar, dan reaksi aglutinasi somatik, karena ciri-ciri reaksi ini sesuai dengan ciri yang telah dikemukakan sebelumnya. Namun demikian, perlu dilakukan penelaahan lebih lanjut dengan mengenal komponen-komponen antigenik yang berperan karena hasil penelitian ini belum mencirikan sifat-sifat antigenik bakteri bintil akar kedelai secara spesifik. Hal ini dikemukakan pula oleh Bergersen (1980) bahwa aglutinasi penting untuk memastikan organisme dengan memeriksa struktur antigeniknya, jika antigeniknya bervariasi. Selanjutnya, dikatakan pula bahwa antigen flagelar sel-sel yang motil dapat disiapkan dengan mensentrifugasi biakan berumur 18 jam dalam medium kaldu, sel-sel disuspensikan dengan garam fisiologis, dan penambahan formalin ke dalam suspensi sel membuat antigen somatik tidak aktif. Komponen antigenik berkaitan erat dengan substansi somatik bakteri bintil akar kedelai yang biasanya berupa polisakarida ekstraselular (Dudman, 1971). Means, dan Johnson (1968) melaporkan juga bahwa komponen terlarut antigen bakteri dari galur-galur bakteri Rhizobium japonicum yang dianggap berperan sebagai situs antigenik

adalah antigen-antigen somatik sel yang terdiri dari gabungan senyawa-senyawa yang mengandung protein, polisakarida, dan lipida.

Dari 14 reaksi aglutinasi homolog, 5 diantaranya tampak kuat (antigen-antiserum 53, 52, 47, 43 dan 42), sedangkan 9 lainnya tampak lemah (antigen-antiserum 50, 30, 28, 26, 25, 23, 20, 18 dan 07). Dari 182 reaksi silang yang dilakukan ternyata sebagian besar tidak bereaksi (80.77%) dan hanya 35 (19.23%) yang menunjukkan terjadinya pembentukan gumpalan positif. Dari 35 reaksi yang terbentuk, 1 diantaranya menunjukkan reaksi yang tampak sangat kuat (antigen 42-antiserum 28), 13 tampak kuat dan 21 lainnya tampak lemah reaksinya.

Ketepatan antigen untuk bereaksi dengan antibodi sangat menentukan reaksi aglutinasi yang terbentuk karena apabila antigen berlebih dan antibodi berlebih akan mengurangi reaksi penampakan aglutinasinya (Somasegaran dan Hoben, 1985). Penggunaan pengenceran antiserum 1/100 dan konsentrasi antigen $5-10 \times 10^9$ sel/ml berkaitan dengan hal tersebut di atas. Aglutinasi hanya terjadi pada tabung-tabung yang berisi pengenceran antiserum yang lebih tinggi tingkat pengencerannya (Pasaribu dan Joeniman, 1988). Hal ini berkaitan dengan fenomena prozon, yang mungkin disebabkan oleh efek stabil dari protein berkonsentrasi tinggi pada partikel. Protein melapisi partikel-partikel dan



menghasilkan penolakan elektrostatis antara individu partikel. Dengan demikian menimbulkan usaha yang melawan terhadap molekul antibodi untuk mengikat partikel bersama-sama. Apabila suatu saat konsentrasi protein menurun akibat diencerkan maka molekul antibodi dapat menggunakan efek penggumpalannya dan menghasilkan aglutinasi. Reaksi aglutinasi telah memperlihatkan akan kebutuhan elektrolit di dalam medium dengan konsentrasi garam fisiologis (Pasaribu dan Joeniman, 1988). Reaksi benar-benar tidak terjadi apabila antigen letaknya terlalu dalam dan antibodinya berlebihan.

Hasil pengujian reaksi aglutinasi 12 galur uji dan 2 galur standar terhadap antiserum dari galur-galur tersebut menunjukkan bahwa beberapa galur diantaranya dapat bereaksi secara silang. Dengan demikian, secara serologis galur-galur bakteri bintil akar kedelai tersebut ada yang sekerabat. Telaah hasil uji aglutinasi ini, mendorong pembentukan kelompok berdasarkan kekerabatan antigeniknya, yaitu kelompok galur 43, 23, dan 07, yang antigeniknya dapat dikenali oleh antiserum dari galur 43, 26, 23, 18, dan 07; kelompok galur 50, 47, dan 20, yang antigeniknya dapat dikenali oleh antiserum dari galur 50, 47, dan 20 sendiri; kelompok galur 42, 30, dan 28, yang masing-masing antigeniknya terdiri dari antigen galur 42 dapat dikenali oleh antiserum dari galur 53, 52, 43, 42, 30, 28, dan 20; antigen galur 30 dapat dikenali oleh antiserum dari galur 53, 52,



42, 30, dan 28; antigen galur 28 dapat dikenali oleh anti-serum dari galur 53, 42, 30, dan 28; kelompok galur 25, dan 18, yang antigennya masing-masing dapat dikenali oleh anti-serum dari galur 25, 18, dan 07 untuk antigen 25; sedangkan antigen 18 dapat dikenali oleh antiserum dari galur 18, dan 07; galur 26 merupakan galur yang berbeda dari galur lainnya karena hanya dapat dikenali oleh antiserum homolognya sendiri. Galur standar USDA 110 dan 122 (galur 52 dan 53) tidak dikenali oleh antiserum dari galur uji, berarti galur ini asing bagi galur uji. Untuk lebih jelasnya, pengelompokan galur-galur ini terlihat seperti pada Tabel 7.

Pengelompokan ini tidak berlaku umum, hanya berlaku pada jumlah galur dan antiserum yang dipakai. Dengan demikian pengelompokan yang terjadi sangat tergantung pada jumlah antiserum yang terpakai. Semakin banyak jumlah antiserum yang terpakai semakin luas pengelompokan yang terbentuk, sebaliknya semakin sedikit jumlah antiserum yang terpakai semakin sempit pula pengelompokan yang terbentuk.

@Hak cipta milik IPB University

IPB University



Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :

- a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
- b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

Tabel 7. Pengelompokan Galur-Galur Bakteri Bintil Akar Kerdelai berdasarkan Uji Aglutinasi yang terbentuk

Kelompok	Galur Uji	Aglutinasi dengan antiserum dari galur:													
		43	26	23	18	07	50	47	20	53	52	42	30	28	25
1	43	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	23	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	07	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	50	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	47	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	20	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
3	42	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
	30	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
	28	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-
4	25	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	18	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	52	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
	53	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	26	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Keterangan:

Pengelompokan diperoleh dengan melihat kekerabatan antigenik setiap galur dalam uji aglutinasi.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Dua belas galur uji yang tergolong tumbuh lambat dan efektif dalam menambat nitrogen, telah dibuktikan tumbuh lambat berdasarkan hasil penegasan terhadap pengamatan morfologi koloni dan waktu generasinya.

Penumbuhan kedua belas galur efektif dan dua galur standar (USDA 110; USDA 122) di atas medium agar MEK yang dibubuhi zat warna merah kongo, memperlihatkan bahwa semua galur bakteri tumbuh lambat yang ditandai munculnya koloni setelah 7 hari inkubasi pada suhu 28 C, dan berdiameter antara 0.1 sampai 4.0 mm, serta cenderung tidak mampu menyerap warna merah dengan baik. Semua galur bakteri bintil akar kedelai tersebut juga memiliki ciri-ciri berbentuk bundar, cembung, berlendir, dan relatif tembus cahaya. Berdasarkan ciri-ciri tersebut, dari 12 galur yang diteliti ternyata 6 galur bertipe koloni SD, 3 galur bertipe koloni LM dan 3 galur lainnya bertipe koloni dimorfis (SD dan LM), sedangkan 2 galur standar USDA 110 dan 122 bertipe koloni SD. Ciri pertumbuhan lain di dalam medium kaldu MEK yang diberi perlakuan pengocokan menunjukkan bahwa semua galur bakteri bintil akar kedelai tumbuh lambat dengan waktu generasi antara 8.34 sampai 17.88 jam.

Hasil reaksi aglutinasi terlihat setelah antiserum dari semua galur bakteri direaksikan dengan antigen

homolognya yang ditandai dengan terbentuknya granula (butiran-butiran halus sampai butiran kasar) dengan cairan yang jernih tampak disekitarnya. Namun hasil pengujian ini menunjukkan bahwa variasi perlakuan pemanasan di dalam penangas air bersuhu 52°C selama 2 jam dan 4 jam ternyata tidak mempengaruhi penampilan reaksi aglutinasi yang terbentuk, dengan perkataan lain reaksi aglutinasi flagelar dan somatik sukar dibedakan. Pembentukan reaksi aglutinasi tampak lebih tegas setelah diterapkan selama 24 jam dalam refrigerator (lemari es bersuhu 4°C).

Pada reaksi antigen-antibodi homolog, 5 tampak kuat reaksinya pada galur 53, 52, 47, 43 dan 42, sedangkan 9 lainnya tampak lemah pada galur 50, 30, 28, 26, 25, 23, 20, 18 dan 07. Hasil pengujian reaksi aglutinasi silang yang terjadi, terhadap keempat belas galur yang diuji beberapa galur menunjukkan reaksi, sehingga secara serologis galur-galur bakteri bintil akar kedelai tersebut ada yang sekera-bat. Dari hasil uji aglutinasi, galur-galur uji dapat dibedakan satu sama lainnya berdasarkan ciri-ciri antigeniknya. Perbedaan yang kecil diantara galur dapat terhim-pun dalam suatu kelompok, masing-masing yaitu kelompok galur 43, 23, dan 07; kelompok galur 50, 47, dan 20; kelompok galur 42, 30, dan 28; kelompok galur 25, dan 18; kelompok galur 53 dan 52. Galur 26 merupakan galur yang berbeda dari galur lainnya.



Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

Saran

Penelaahan serologis terhadap galur-galur bakteri bintil akar kedelai efektif yang sekerabat, perlu diteliti lebih lanjut agar diperoleh gambaran kekerabatan yang lebih baik, terutama untuk mengetahui sifat-sifat dan komponen antigeniknya yang lebih spesifik. Hal ini disarankan karena teknik serologis secara aglutinasi hanya bisa mengenal galur-galur bakteri secara garis besarnya saja berdasarkan kekerabatan atau kesamaan antigeniknya, sedangkan sifat-sifat dan lokasi komponen antigeniknya belum dapat diketahui secara optimal. Teknik serologis dengan elektroforesis, seperti SDS-Page (Sodium Dodecyl Sulfat Polyacrilamide Gel Elektroforesis) sangat baik untuk dilakukan karena dapat mengenal lebih lanjut serotypenya, tetapi teknik ini membutuhkan biaya yang cukup besar mengingat bahan-bahannya sangat mahal.

Ketepatan antigen untuk bereaksi dengan antibodi sangat berperan dalam uji aglutinasinya, oleh karena itu penelitian lanjutan diperlukan pula untuk mengetahui apakah reaksi yang negatif, benar-benar negatif. Pengenceran antiserum sangat baik untuk dilakukan dalam membuktikan ada-tidaknya penggumpalan tersebut. Selain itu, pengenceran antiserum dapat dimanfaatkan pula untuk mengetahui nilai titer antiserum dari galur-galur bakteri baik yang sekerabat maupun yang tidak sekerabat, sehingga pengenceran tertinggi dari antiserum yang masih menunjukkan reaksi positif



Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :

- a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
- b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

terlihat lebih jelas. Pemurnian terhadap antiserum bisa juga dilakukan untuk membedakan aglutinasi flagelar dan somatik yang terbentuk.

Metode penyuntikan antigen Schmidt, Bankole dan Bohlool (1968) secara intravena patut dikembangkan lebih lanjut, mengingat respon antibodi yang dihasilkan cukup baik yang ditunjukkan oleh nilai titer antiserumnya, namun kelinci yang digunakan harus berbobot besar (2.5-3.0 kg pada umur 6 bulan) untuk menghindari kematian akibat shock. Selain itu, metode penyuntikan antigen secara intravena perlu ketrampilan dalam melakukannya.

@Hak cipta milik IPB University

IPB University



Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip, sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

DAFTAR PUSTAKA

- Alexander, M. 1977. Introduction to soil microbiology. 2nd. ed. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Ariyanto, W. S. 1988. Telaah fisiologis dan serologis galur-galur bakteri bintil akar kedelai. Skripsi S-1. Jurusan Biologi, FMIPA-IPB, Bogor.
- Bergersen, F. J. 1980. Methods for evaluating biological nitrogen fixation. John Wiley & Sons. Toronto.
- Buckman, H. C., and N. C. Brady. 1984. The nature and properties of soil. The Macmillan Publishing Co., New York.
- Bradley, R. S., P. Thornton, and P. Jones. 1988. Colony dimorfism in Bradyrhizobium strains. Appl. Environ. Microbiol. 21: 973-985.
- Brock, T.D., and K.M. Brock. 1973. Basic Microbiology with Applications. p.125-127. Prentice Hall Inc., Englewood Cliffs, New Jersey.
- Date, R.A. 1982. Collection, isolation, characterization, and conservation of Rhizobium. p.95-109. In J. M. Vincent (eds.). Nitrogen Fixation in Legumes. Academic Press, Sydney.
- Dudman, W.F. 1971. Antigenic analysis of Rhizobium japonicum by immunodiffusion. Appl. Environ. Microbiol. 21: 973-985.
- Fardiaz, S. 1988. Fisiologi Fermentasi. Pusat Antar Universitas (PAU) Pangan dan Gizi-IPB. Bogor.
- Fuhrmann, J. 1990. Symbiotic effectiveness of indigenous soybean Bradyrhizobia as related to serological, morphological, rhizobitoxine, and hydrogenase phenotypes. Appl. Environ. Microbiol. 56: 224-229.
- Freire, J.R.J. 1977. Inoculation of soybean. p. 335-379. In J. M. Vincent, A. S. Whitney, and J. Bose (eds.). Exploiting the legume-Rhizobium symbiosis in tropical agriculture. Dept. Agron. Soil. Sci., Univ. of Hawaii.
- Hadjoetomo, R. S. 1990. Mikrobiologi dasar dalam praktek. Gramedia, Jakarta.

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.

2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

- Harlow, and D. Lane. 1988. *Antibodies a Laboratory Manual*. Cold spring Harbor Laboratory, USA.
- Hasibuan, K. M. 1988. *Pemodelan Matematika di dalam Biologi Populasi, Dinamika Populasi*.
- Israel, D.W., J.N. Mathis, W.M. Barbour, and G.H. Elkan. 1986. Symbiotic effectiveness and host-strain interaction of Rhizobium fredii USDA 191 on different soybean cultivars. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 898-903.
- Jordan, D.C. 1984. Family III. Rhizobiaceae Conn. 1938. p. 234-244. In N. R. Krieg and J. G. Holt (eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 9th. ed., vol. 1. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- Keyser, H.H., B.B. Bohlool, T.S. Hu, and D.F. Weber. 1982. Fast-growing rhizobia isolated from root-nodule of soybean. *Science* 215: 1613-1632.
- Means, U.M., and H.W. Johnson. 1968. Thermostability of antigen associated with serotype of Rhizobium japonicum. *Appl. Environ. Microbiol.* 16: 203-206.
- Muller, M.D., and Wollum II, A.G. 1989. Variation among different cultures of Bradyrhizobium japonicum strains USDA 110 & 122. *Can. J. Microbiol.* 35: 583-588.
- Norris, D.O. 1965. Acid production by Rhizobium, a unifying concept. *Plant and Soil* 22: 143-166.
- Pasaribu, D. 1981. Hara nitrogen kedelai. h. 385-388. Dalam S. Josodiwondo, R. Utji dan U.C. Warsa (eds.). *Mikrobiologi di Indonesia*. Kumpulan Makalah Kongres Nasional Mikrobiologi III, Jakarta 26-28 Nopember 1981.
- Pasaribu, F.H., dan B. Joeniman. 1988. *Pengantar Imunologi*. Laboratorium Teknologi Biomedis. Pusat Antar Universitas (PAU)-Bioteknologi-IPB. Bogor.
- Pelczar, M.J. and R.D. Reid. 1972. Serological and Diagnostic Methods. p. 541-546. In Pelczar (eds.). *Microbiology*. Mc Graw Hill Book Company, New York.
- _____, and E.C.S. Chan. 1981. *Elements of microbiology*. McGraw-Hill Book Co., Inc., New York.
- Rivai, M. A. 1970. *Kamus Mikologi Asing-Indonesia*. Pusat Pembinaan dan Pengembangan Bahasa. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan. Jakarta.

@Hak cipta milik IPB University

IPB University

- Roitt, L.M. 1985. Pokok-pokok Ilmu Kekebalan. Gramedia, Jakarta.
- Russel, E.W. 1961. Soil conditions and plant growth. 9th. ed., Longmans, London.
- Saraswati, R. 1986. Pengaruh pemberian terak baja, fosfor dan inokulan Rhizobium terhadap penambatan N, serapan hara, dan pertumbuhan tanaman kedelai (Glycine max L. Merr.) pada podzolik merah kuning yang dikapur. Tesis MS, IPB, Bogor.
- Schmidt, Bankole and Bohlool. 1968. Procedure Injecting and Bleeding Rabbits. p. 304-309. In Somasegaran, P. and H. J. Hoben. 1985. Methods in Legume Rhizobium Technology. University of Hawaii NIFTAL Project and MIRCEN. Dept. Agronomy and Soil Science, Hawaii.
- Somasegaran, P., and H.J. Hoben. 1985. Methods in legume-Rhizobium technology. University of Hawaii NIFTAL Project and MIRCEN, Dept. Agron. and Soil Sci., Hawaii.
- Stowers, M.D. 1985. Carbon metabolism in Rhizobium species. Ann. Rev. Microbiol. 39: 89-108.
- Stowers, M.D., and G.H. Elkan. 1980. Criteria for selecting infective and efficient strains of Rhizobium for the use in tropical agriculture. Tech. Bul. No. 264. North Carolina Agricultural Service.
- Sumarno, Sugito, Rodiah, dan O. Sutrisno. 1985. Varietas Kerinci kedelai unggul baru untuk lahan sawah bekas padi. Buletin Penelitian (1):31-38. Balai Penelitian dan Pengembangan Pertanian. Bogor.
- Smith, J.B., and S. Mangkoewidjaja. 1988. Penelitian Pembiakan dan Penggunaan Hewan Percobaan di daerah tropis. UI-Press, Jakarta.
- Tedja Imas. 1991. Kekerabatan serologik isolat bakteri bintil akar tanaman kedelai tumbuh lambat dan efektif asal lahan sawah. Tesis MS, IPB, Bogor.
- Vincent, J.M. 1970. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. IBP Handbook 15. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- _____. 1977. Rhizobium: General microbiology. p. 277-366. In R.W.F. Hardy and W.S. Silver (eds.). A treatise on dinitrogen fixation. Section IV, Biology. John Wiley & Sons, New York.

@ Hak cipta milik IPB University

IPB University



_____. 1982. The legume-Rhizobia symbiosis. p. 1-4. In J.M. Vincent (eds.). Nitrogen Fixation in legumes. Academic Press, Sydney.

_____. The basic serology of rhizobia. p. 13-26. In J.M. Vincent (eds.). Nitrogen Fixation in legumes. Academic Press, Sydney.

_____. Nature and basic properties of the rhizobia. p. 5-12. In J.M. Vincent (eds.). Nitrogen Fixation in legumes. Academic Press, Sydney.

_____, P.S. Nutman, and F.A. Skinner. 1979. The identification and classification of Rhizobium, p. 49-69. In F.A. Skinner and D.W. Lovelock (eds.). Identification methods for microbiologist. Academic Press, London.

Jutono. 1985. Inokulasi Rhizobium pada kedelai. h. 217-230. Dalam S. Somaatmadja, M. Ismunadji, Sumarno, M. Syam, S.O. Manurung, dan Yuswadi (eds.). Kedelai. Balai Penelitian dan Pengembangan Pertanian. Bogor.

@Hak cipta milik IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :

- a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
- b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.





@Hak cipta milik IPB University

LAMPIRAN

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

Tabel Lampiran 1. Komposisi Medium Agar MEK^a

Kandungan Bahan	Jumlah Bahan (gram)
Mannitol	10.0
K ₂ HPO ₄	0.5
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.2
NaCL	0.1
Ekstrak Khamir	1.0
Agar Bacto	15.0
Air Suling	1.0

Keterangan:

a : mengikuti komposisi Vincent (1970).

Medium dididihkan sehingga agar menjadi larut, kemudian disterilkan di dalam autoklaf pada suhu 121⁰C selama 15 menit.

Bila pada medium diperlukan penambahan zat warna merah kongo maka larutan zat warna tersebut disterilkan secara terpisah. Sebelum medium dituang ditambahkan larutan merah kongo 0.25% sebanyak 10 ml/liter medium sehingga konsentrasi akhir 0.0025%.

Bila diperlukan zat warna brom timol biru maka larutan brom timol biru (0.5% dalam alkohol) ditambahkan sebanyak 5 ml/liter medium sehingga konsentrasi akhir 0.0025%. Zat warna ini berfungsi sebagai indikator pH.



Tabel Lampiran 2. Komposisi Medium Sintetik

Kandungan Bahan		Jumlah Bahan
<u>Bahan utama</u>		<u>gram/liter</u>
K_2HPO_4		1.00
KH_2PO_4		1.00
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$		0.25
$CaCl_2 \cdot 6H_2O$		0.10
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$		0.01
Natrium-glutamat		1.10
Mannitol		10.00
Agar Bacto		15.00
<u>Unsur kelumit</u>	<u>larutan stok (%)</u>	<u>ml/liter</u>
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0.0450	
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.0040	
H_3BO_3	0.0110	1.00
$NaMoO_4 \cdot 2H_2O$	0.0030	
NaCl	0.0330	
$CoCl_2 \cdot H_2O$	0.0004	

Reagen dan larutan stok ditambahkan secara berurutan ke dalam air suling yang jumlahnya paling sedikit 75% volume akhir untuk menghindari pengendapan garam-garam kalsium dan magnesium fosfat. Larutan diaduk-aduk dengan baik, kemudian disterilkan di dalam autoklaf pada suhu $121^{\circ}C$ selama 15 menit. Penambahan agar diberikan ke dalam medium sebelum medium disterilkan.



Tabel Lampiran 3. Penyiapan Larutan BaSO₄ standar McFarland dan Tingkat Kerapatan sel/ml.

Tabung ke	Larutan BaCl ₂ 1% (ml)	Larutan H ₂ SO ₄ 1% (ml)	Perkiraan kerapatan sel
1	0.1	9.9	3x10 ⁸
2	0.2	9.8	6x10 ⁸
3	0.3	9.7	9x10 ⁸
4	0.4	9.6	1.2x10 ⁹
5	0.5	9.5	1.5x10 ⁹
6	0.6	9.4	1.8x10 ⁹
7	0.7	9.3	2.1x10 ⁹
8	0.8	9.2	2.4x10 ⁹
9	0.9	9.1	2.7x10 ⁹
10	1.0	9.0	3.0x10 ⁹

@Hak cipta milik IPB University

IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



Tabel Lampiran 4. Rata-rata Bobot Kering Tajuk Tanaman Kedelai var. Wilis (45HST) dan Nilai Efektivitas Simbiotik Galur-Galur Bakteri Bintil Akar Kedelai^a

Kode galur	Bobot Kering Tajuk ^b (gram)	Efektivitas Simbiotik (%) ^c		
		USDA 110	USDA 122	Kontrol N
42	2.1313	128.84	112.48	168.46
50	2.1086	127.47	111.28	166.67
28	1.6890	102.10	89.14	133.50
20	1.6842	101.81	88.89	133.12
47	1.5788	95.44	83.22	124.77
43	1.5092	91.23	79.65	119.29
30	1.2595	76.14	66.47	99.55
26	1.2803	77.40	67.57	101.19
25	1.4700	88.86	77.58	116.19
23	1.4741	89.11	77.80	116.51
18	1.5498	93.69	81.79	122.49
07	1.4401	87.06	76.00	113.82
USDA 110	1.6542	100.00	87.30	130.75
USDA 122	1.8948	114.54	100.00	143.76
Kontrol N	1.2652	76.84	66.77	100.00
Kontrol N _o (N _o I _o) ^d	0.7856	47.49	41.46	62.09

Keterangan:

- a : berdasarkan hasil penelitian Tedja Imas (1991)
 b : tajuk merupakan bagian atas tanaman, tanpa akar dan bintil.
 c : efektivitas simbiotik dihitung berdasarkan prosentase bobot kering tanaman yang diinokulasi dengan galur uji terhadap bobot kering tanaman yang dinokulasi dengan galur standar (USDA 110 dan 122) serta kontrol N.
 d : kontrol tanaman tanpa N dan tanpa inokulasi

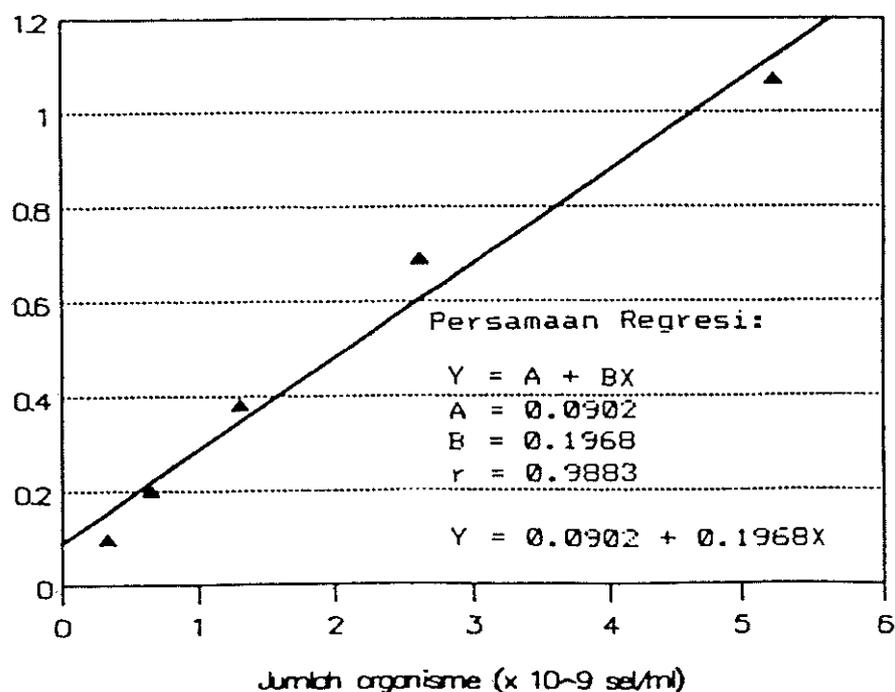
Tabel Lampiran 5. Korelasi antara jumlah sel/ml dan nilai rapat optis (OD_{620}) Galur 53 pada berbagai tingkat pengenceran

Pengenceran	Sumbu X	Sumbu Y
	Jumlah sel/ml ^a	OD_{620}
1 : 1	5.219×10^9	1.071
1 : 2	2.609×10^9	0.691
1 : 4	1.305×10^9	0.382
1 : 8	0.652×10^9	0.199
1 : 16	0.326×10^9	0.098

Keterangan:

a : Data diperoleh dari pencawanan suspensi biakan galur 53 pada medium agar MEK.

Gambar Lampiran 1. Kurva Standar Galur 53 yang menyatakan hubungan jumlah organisme (sel/ml) dengan nilai rapat optis (OD_{620}).



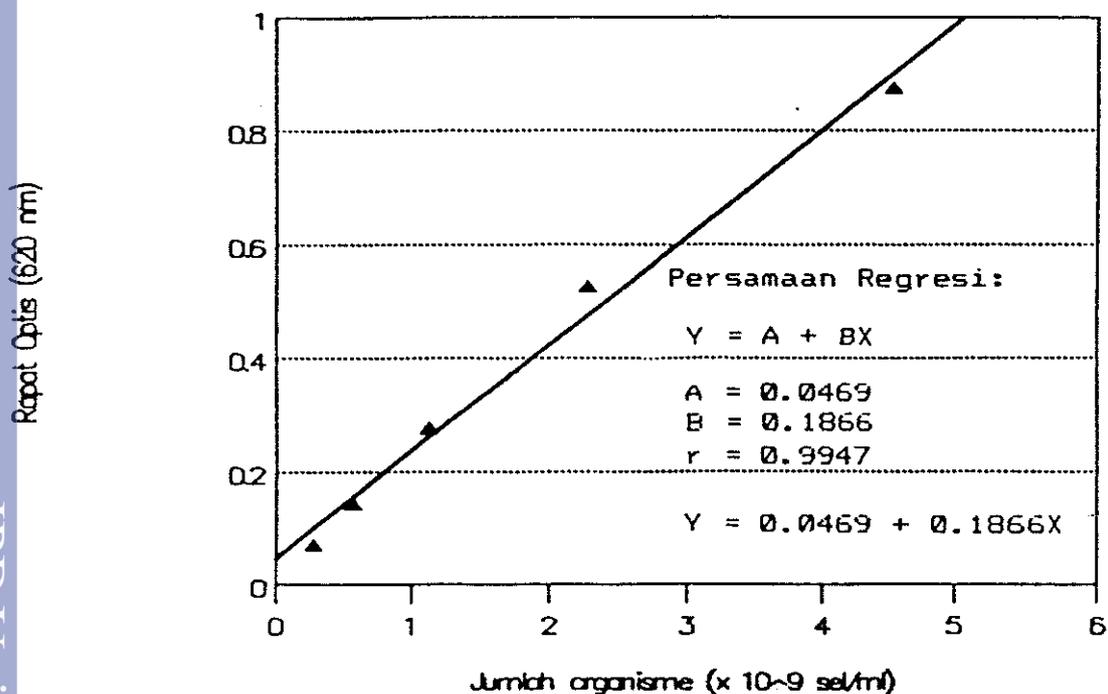
Tabel Lampiran 6. Korelasi antara jumlah sel/ml dan nilai rapat optis (OD_{620}) Galur 52 pada berbagai tingkat pengenceran

	Sumbu X	Sumbu Y
Pengenceran	Jumlah sel/ml ^a	OD_{620}
1 : 1	4.531×10^9	0.875
1 : 2	2.266×10^9	0.525
1 : 4	1.133×10^9	0.277
1 : 8	0.566×10^9	0.143
1 : 16	0.283×10^9	0.070

Keterangan:

a : Data diperoleh dari pencawanan suspensi biakan galur 52 pada medium agar MEK.

Gambar Lampiran 2. Kurva Standar Galur 52 yang menyatakan hubungan jumlah organisme (sel/ml) dengan nilai rapat optis (OD_{620}).



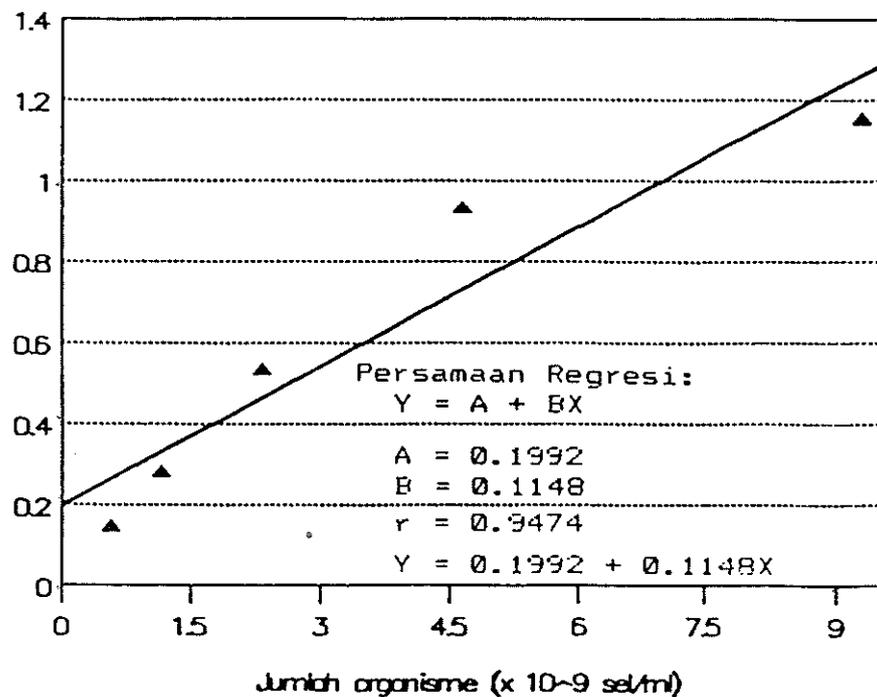
Tabel Lampiran 7. Korelasi antara jumlah sel/ml dan nilai rapat optis (OD_{620}) Galur 50 pada berbagai tingkat pengenceran

Sumbu X		Sumbu Y
Pengenceran	Jumlah sel/ml ^a	OD_{620}
1 : 1	9.250×10^9	1.155
1 : 2	4.625×10^9	0.935
1 : 4	2.313×10^9	0.535
1 : 8	1.156×10^9	0.283
1 : 16	0.578×10^9	0.146

Keterangan:

a : Data diperoleh dari pencawanan suspensi biakan galur 50 pada medium agar MEK.

Gambar Lampiran 3. Kurva Standar Galur 50 yang menyatakan hubungan jumlah organisme (sel/ml) dengan nilai rapat optis (OD_{620}).



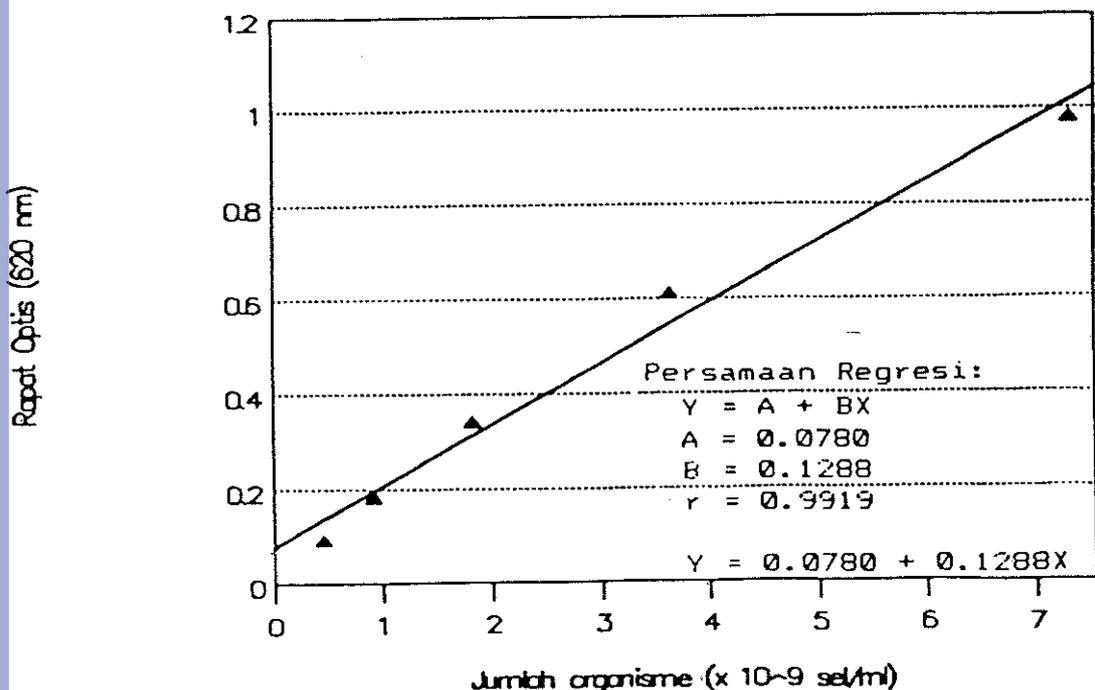
Tabel Lampiran 8. Korelasi antara jumlah sel/ml dan nilai rapat optis (OD_{620}) Galur 47 pada berbagai tingkat pengenceran

Sumbu X		Sumbu Y
Pengenceran	Jumlah sel/ml ^a	OD_{620}
1 : 1	7.281×10^9	0.981
1 : 2	3.641×10^9	0.611
1 : 4	1.820×10^9	0.341
1 : 8	0.910×10^9	0.192
1 : 16	0.450×10^9	0.092

Keterangan:

a : Data diperoleh dari pencawanan suspensi biakan galur 47 pada medium agar MEK.

Gambar Lampiran 4. Kurva Standar Galur 47 yang menyatakan hubungan jumlah organisme (sel/ml) dengan nilai rapat optis (OD_{620}).



Tabel Lampiran 9. Korelasi antara jumlah sel/ml dan nilai rapat optis (OD_{620}) Galur 43 pada berbagai tingkat pengenceran

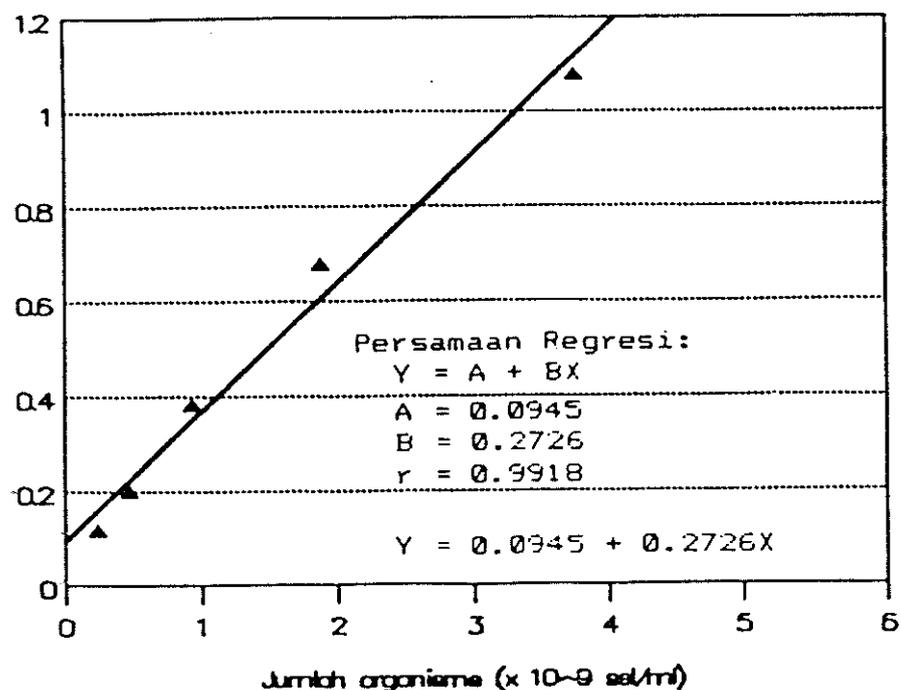
Sumbu X		Sumbu Y
Pengenceran	Jumlah sel/ml ^a	OD_{620}
1 : 1	3.750×10^9	1.078
1 : 2	1.875×10^9	0.678
1 : 4	0.938×10^9	0.382
1 : 8	0.469×10^9	0.199
1 : 16	0.234×10^9	0.116

Keterangan:

a : Data diperoleh dari pencawanan suspensi biakan galur 43 pada medium agar MEK.

Gambar Lampiran 5. Kurva Standar Galur 43 yang menyatakan hubungan jumlah organisme (sel/ml) dengan nilai rapat optis (OD_{620}).

Rapat Optis (620 nm)



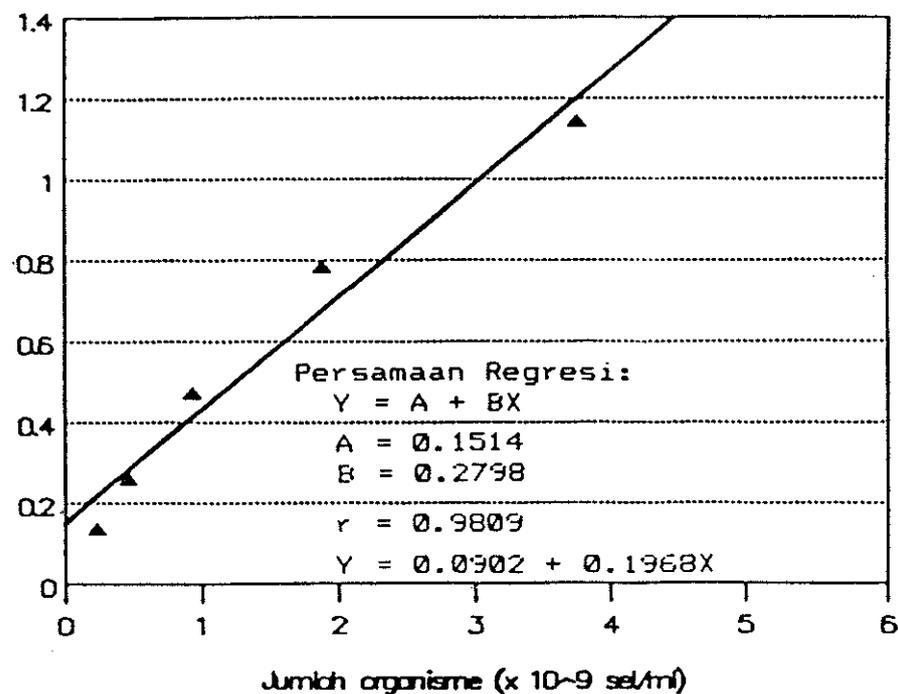
Tabel Lampiran 10. Korelasi antara jumlah sel/ml dan nilai rapat optis (OD_{620}) Galur 42 pada berbagai tingkat pengenceran

Sumbu X		Sumbu Y
Pengenceran	Jumlah sel/ml ^a	OD_{620}
1 : 1	3.750×10^9	1.141
1 : 2	1.875×10^9	0.783
1 : 4	0.938×10^9	0.470
1 : 8	0.469×10^9	0.259
1 : 16	0.234×10^9	0.137

Keterangan:

a : Data diperoleh dari pencawanan suspensi biakan galur 42 pada medium agar MEK.

Gambar Lampiran 6. Kurva Standar Galur 42 yang menyatakan hubungan jumlah organisme (sel/ml) dengan nilai rapat optis (OD_{620}).



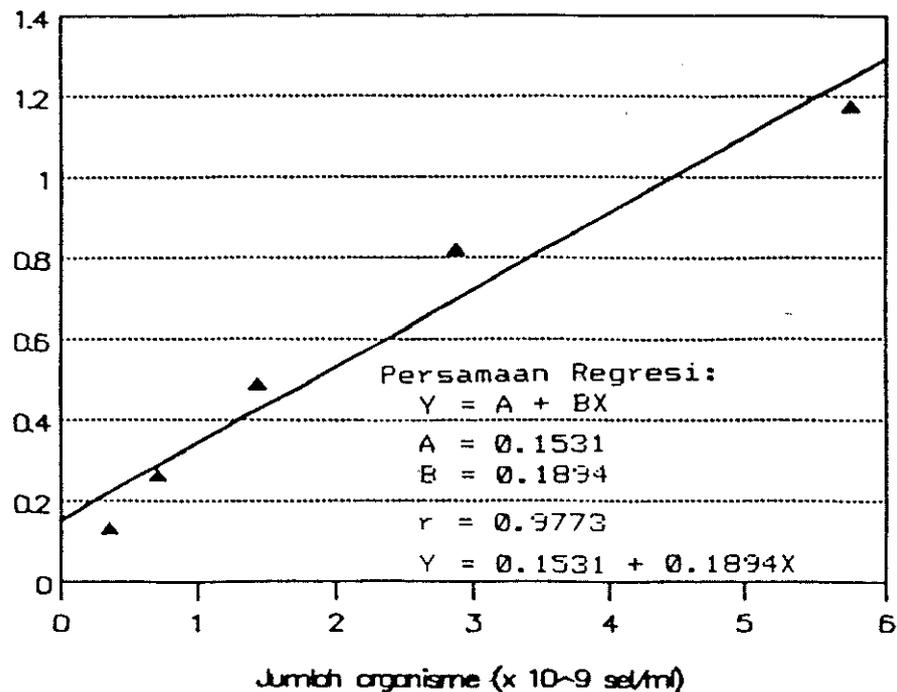
Tabel Lampiran 11. Korelasi antara jumlah sel/ml dan nilai rapat optis (OD_{620}) Galur 30 pada berbagai tingkat pengenceran

Sumbu X		Sumbu Y
Pengenceran	Jumlah sel/ml ^a	OD_{620}
1 : 1	5.750×10^9	1.174
1 : 2	2.875×10^9	0.820
1 : 4	1.438×10^9	0.488
1 : 8	0.719×10^9	0.263
1 : 16	0.359×10^9	0.131

Keterangan:

a : Data diperoleh dari pencawanan suspensi biakan galur 30 pada medium agar MEK.

Gambar Lampiran 7. Kurva Standar Galur 30 yang menyatakan hubungan jumlah organisme (sel/ml) dengan nilai rapat optis (OD_{620}).



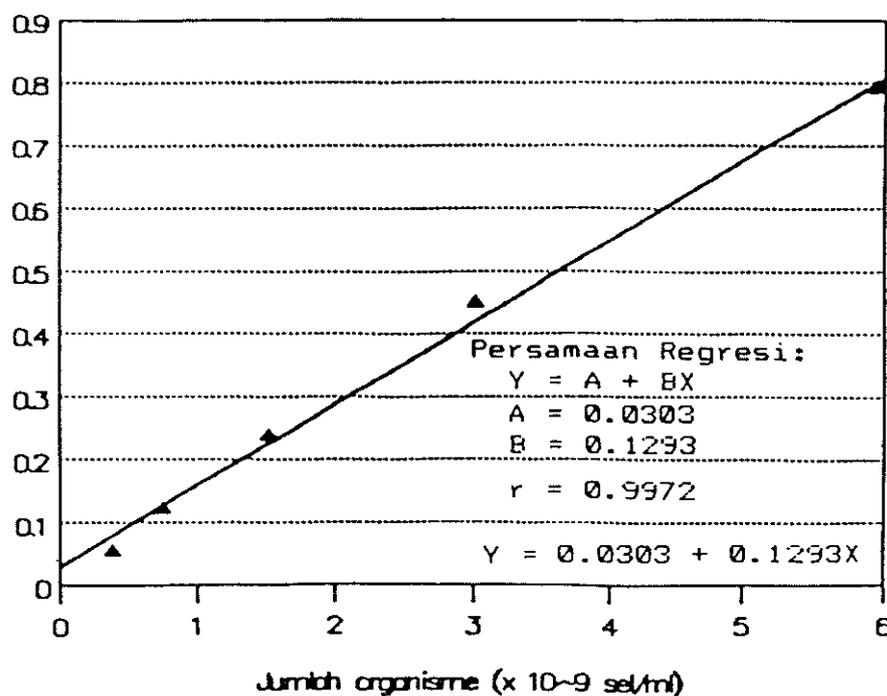
Tabel Lampiran 12. Korelasi antara jumlah sel/ml dan nilai rapat optis (OD_{620}) Galur 28 pada berbagai tingkat pengenceran

Pengenceran	Sumbu X	Sumbu Y
	Jumlah sel/ml ^a	OD_{620}
1 : 1	6.0315×10^9	0.793
1 : 2	3.016×10^9	0.451
1 : 4	1.508×10^9	0.239
1 : 8	0.754×10^9	0.123
1 : 16	0.377×10^9	0.056

Keterangan:

a : Data diperoleh dari pencawanan suspensi biakan galur 28 pada medium agar MEK.

Gambar Lampiran 8. Kurva Standar Galur 28 yang menyatakan hubungan jumlah organisme (sel/ml) dengan nilai rapat optis (OD_{620}).



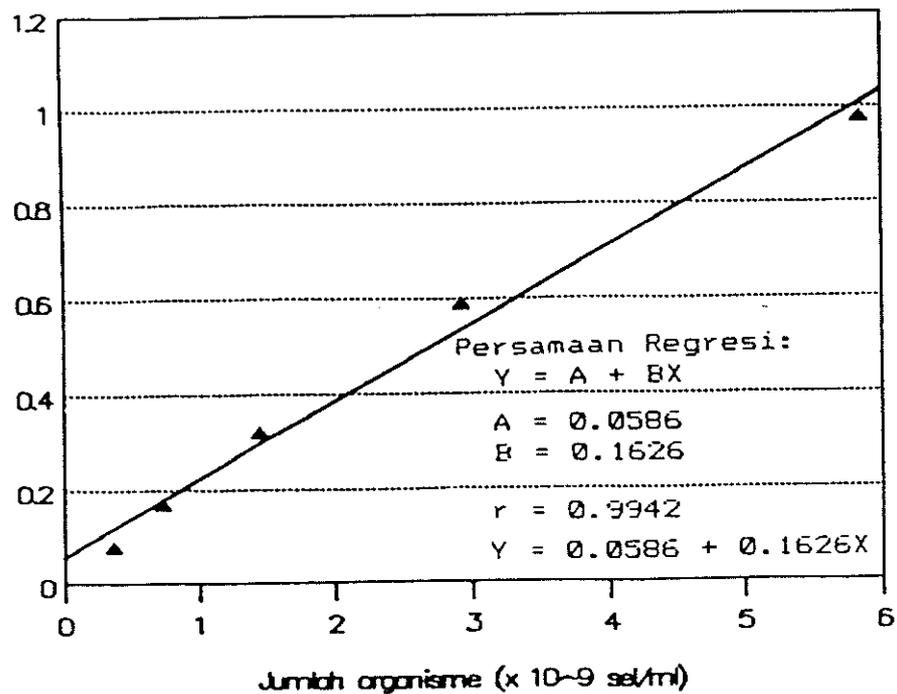
Tabel Lampiran 13. Korelasi antara jumlah sel/ml dan nilai rapat optis (OD_{620}) Galur 26 pada berbagai tingkat pengenceran

Pengenceran	Sumbu X	Sumbu Y
	Jumlah sel/ml ^a	OD_{620}
1 : 1	5.844×10^9	1.071
1 : 2	2.922×10^9	0.691
1 : 4	1.461×10^9	0.319
1 : 8	0.730×10^9	0.589
1 : 16	0.365×10^9	0.979

Keterangan:

a : Data diperoleh dari pencawanan suspensi biakan galur 26 pada medium agar MEK.

Gambar Lampiran 9. Kurva Standar Galur 26 yang menyatakan hubungan jumlah organisme (sel/ml) dengan nilai rapat optis (OD_{620}).



Rapat Optis (620 nm)

IPB University

@Hak cipta milik IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
- a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
- b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

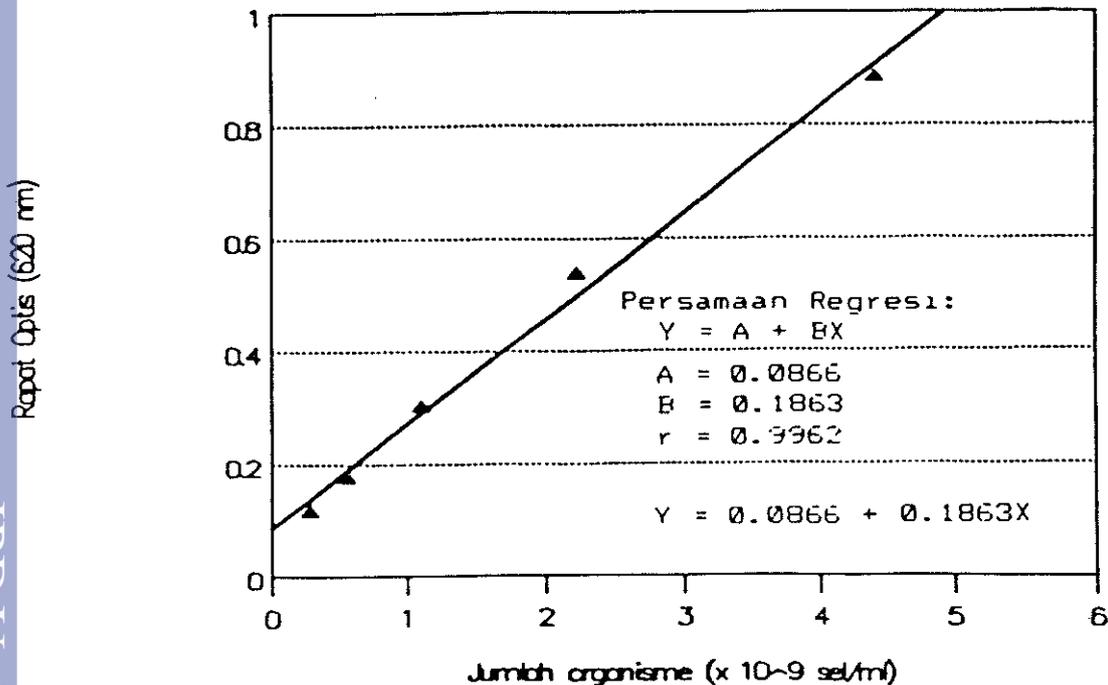
Tabel Lampiran 14. Korelasi antara jumlah sel/ml dan nilai rapat optis (OD₆₂₀) Galur 25 pada berbagai tingkat pengenceran

Sumbu X		Sumbu Y
Pengenceran	Jumlah sel/ml ^a	OD ₆₂₀
1 : 1	4.406x10 ⁹	0.886
1 : 2	2.203x10 ⁹	0.539
1 : 4	1.101x10 ⁹	0.304
1 : 8	0.551x10 ⁹	0.177
1 : 16	0.275x10 ⁹	0.117

Keterangan:

a : Data diperoleh dari pencawanan suspensi biakan galur 25 pada medium agar MEK.

Gambar Lampiran 10. Kurva Standar Galur 25 yang menyatakan hubungan jumlah organisme (sel/ml) dengan nilai rapat optis (OD₆₂₀).



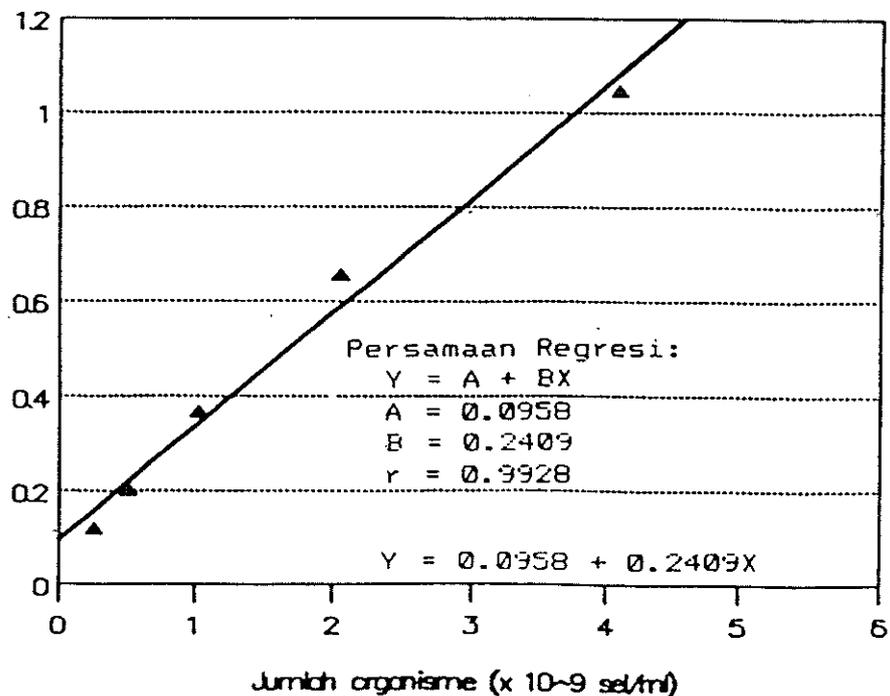
Tabel Lampiran 15. Korelasi antara jumlah sel/ml dan nilai rapat optis (OD_{620}) Galur 23 pada berbagai tingkat pengenceran

Pengenceran	Sumbu X Jumlah sel/ml ^a	Sumbu Y OD_{620}
1 : 1	4.094×10^9	1.047
1 : 2	2.047×10^9	0.656
1 : 4	1.023×10^9	0.367
1 : 8	0.512×10^9	0.202
1 : 16	0.256×10^9	0.118

Keterangan:

a : Data diperoleh dari pencawanan suspensi biakan galur 23 pada medium agar MEK.

Gambar Lampiran 11. Kurva Standar Galur 23 yang menyatakan hubungan jumlah organisme (sel/ml) dengan nilai rapat optis (OD_{620}).



Rapat Optis (620 nm)

IPB University

@Hak cipta milik IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

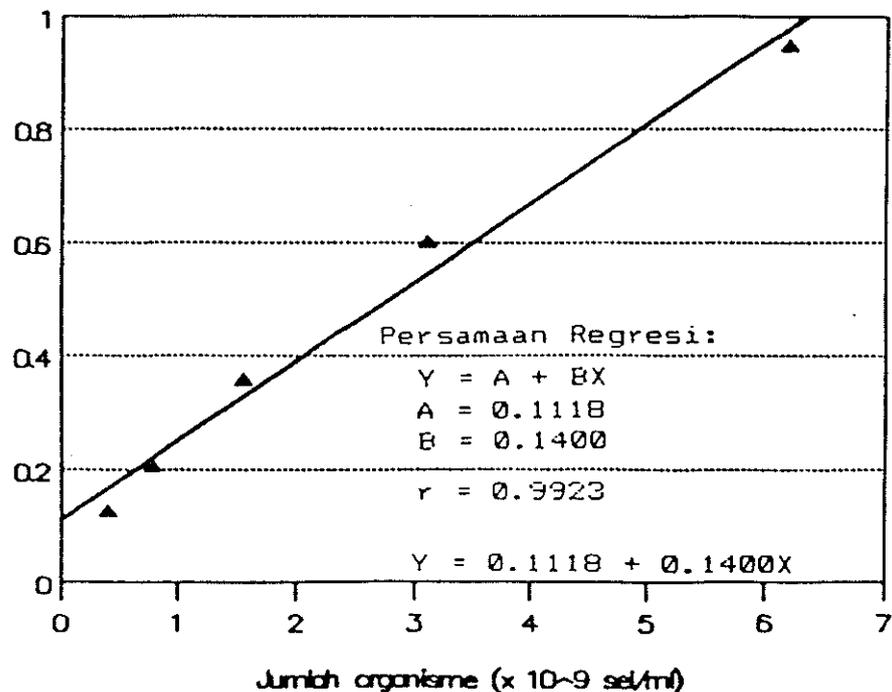
Tabel Lampiran 16. Korelasi antara jumlah sel/ml dan nilai rapat optis (OD_{620}) Galur 20 pada berbagai tingkat pengenceran

Sumbu X		Sumbu Y
Pengenceran	Jumlah sel/ml ^a	OD_{620}
1 : 1	6.188×10^9	0.947
1 : 2	3.094×10^9	0.602
1 : 4	1.547×10^9	0.357
1 : 8	0.773×10^9	0.206
1 : 16	0.387×10^9	0.126

Keterangan:

a : Data diperoleh dari pencawanan suspensi biakan galur 20 pada medium agar MEK.

Gambar Lampiran 12. Kurva Standar Galur 20 yang menyatakan hubungan jumlah organisme (sel/ml) dengan nilai rapat optis (OD_{620}).



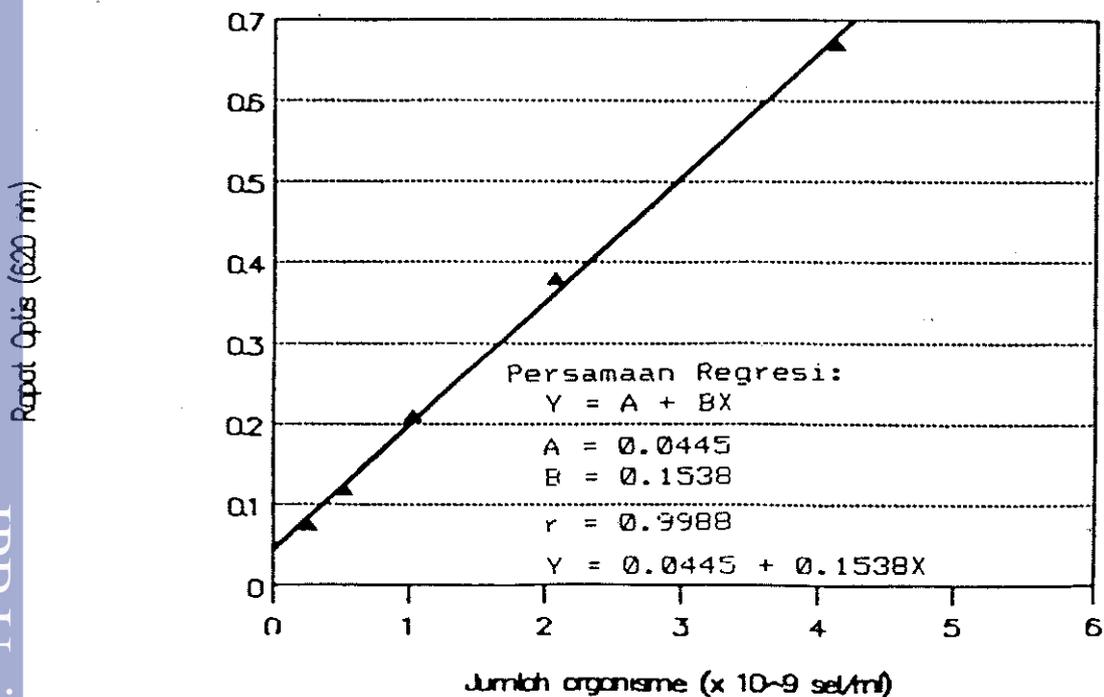
Tabel Lampiran 17. Korelasi antara jumlah sel/ml dan nilai rapat optis (OD_{620}) Galur 18 pada berbagai tingkat pengenceran

Sumbu X		Sumbu Y
Pengenceran	Jumlah sel/ml ^a	OD_{620}
1 : 1	4.125×10^9	0.670
1 : 2	2.063×10^9	0.379
1 : 4	1.031×10^9	0.210
1 : 8	0.516×10^9	0.118
1 : 16	0.258×10^9	0.075

Keterangan:

a : Data diperoleh dari pencawanan suspensi biakan galur 18 pada medium agar MEK.

Gambar Lampiran 13. Kurva Standar Galur 18 yang menyatakan hubungan jumlah organisme (sel/ml) dengan nilai rapat optis (OD_{620}).



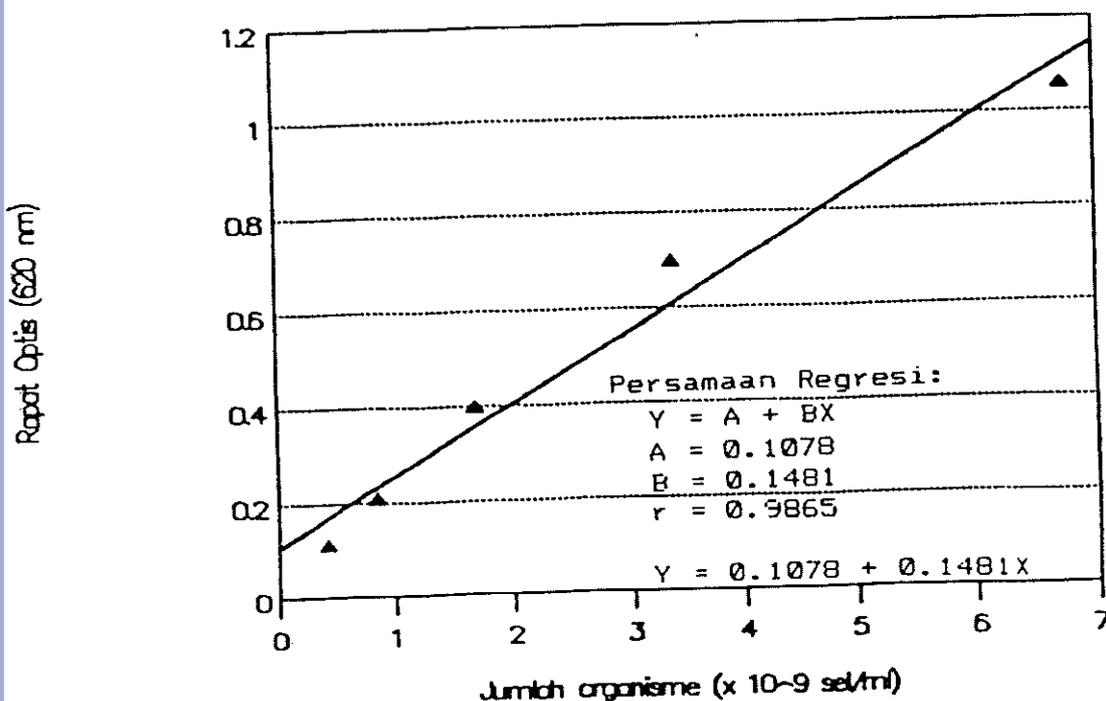
Tabel Lampiran 18. Korelasi antara jumlah sel/ml dan nilai rapat optis (OD_{620}) Galur 07 pada berbagai tingkat pengenceran

Pengenceran	Sumbu X	Sumbu Y
	Jumlah sel/ml ^a	OD_{620}
1 : 1	6.750×10^9	1.059
1 : 2	3.375×10^9	0.698
1 : 4	1.688×10^9	0.398
1 : 8	0.884×10^9	0.208
1 : 16	0.422×10^9	0.113

Keterangan:

a : Data diperoleh dari pencawanan suspensi biakan galur 07 pada medium agar MEK.

Gambar Lampiran 14. Kurva Standar Galur 07 yang menyatakan hubungan jumlah organisme (sel/ml) dengan nilai rapat optis (OD_{620}).



Tabel Lampiran 19. Waktu Generasi Rata-rata dan pH Biakan Galur-Galur Bakteri Bintil Akar Kedelai di dalam Medium Kaldu MEK

Kode Galur	Waktu Generasi Rata-rata (Jam) ^a	pH biakan ^b	
		awal	akhir
53	13.71	7.06	7.08
52	17.80	6.86	7.32
50	15.20	7.02	7.55
47	15.62	6.98	7.23
43	14.24	7.01	7.52
42	8.34	6.79	7.50
30	11.20	6.90	7.33
28	14.48	6.86	7.26
26	10.16	7.16	7.35
25	12.46	6.92	7.35
23	9.24	7.24	7.42
20	9.30	7.07	7.45
18	10.30	7.18	7.59
07	9.70	7.21	7.79

Keterangan:

- a : Hasil rata-rata lima nilai waktu generasi, selama fase eksponensial berdasarkan kurva pertumbuhan galurnya.
- b : Pengamatan dilakukan dengan pH Meter HORIBA. Pengukuran pH awal dilakukan sesaat setelah inokulasi, sedangkan pengukuran pH akhir setelah tiga hari inkubasi pada suhu 28°C.



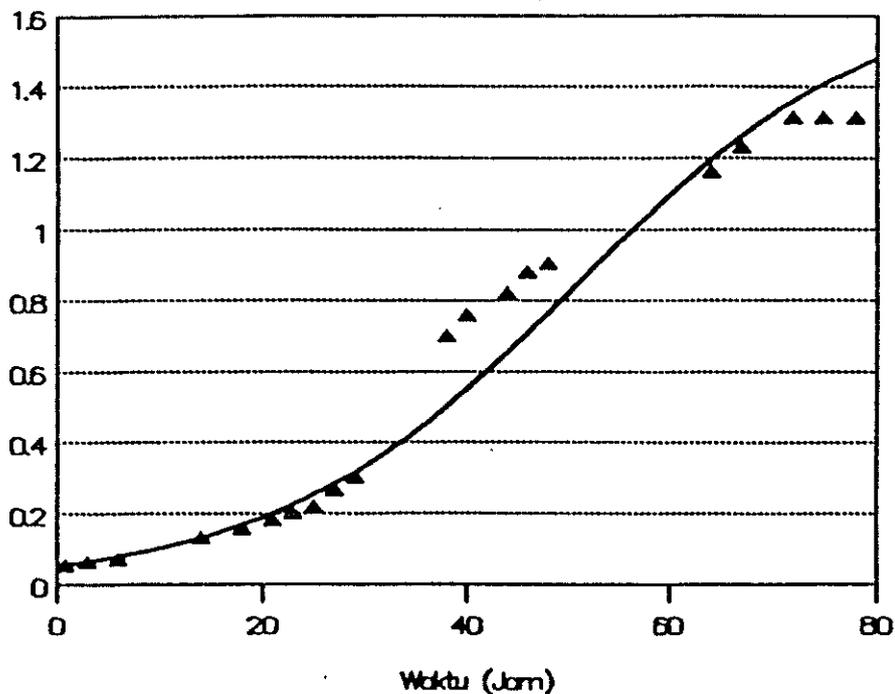
@Hak cipta milik IPB University

Tabel Lampiran 20. Hasil Pengamatan Pertumbuhan Galur-Galur Bakteri Bintil Akar Kedelai Efektif

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
 1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
 2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

Waktu Pertumbuhan (Jam)	Salur 53		Salur 57		Salur 59		Salur 47		Salur 43		Waktu Pertumbuhan (Jam)		Salur 26		Salur 28		Salur 20		Salur 42		Waktu Pertumbuhan (Jam)		Salur 25		Salur 23		Salur 20		Salur 18		Salur 07				
	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00					
0.00	0.0535	0.0814	0.1772	0.0635	0.0531	0.0416	0.0496	0.0565	0.0731	0.0416	0.0496	0.0565	0.0731	0.0416	0.0496	0.0565	0.0731	0.0416	0.0496	0.0565	0.0731	0.0416	0.0496	0.0565	0.0731	0.0416	0.0496	0.0565	0.0731	0.0416	0.0496	0.0565	0.0731		
3.00	0.0605	0.0980	0.1999	0.0799	0.0691	0.0560	0.0550	0.0701	0.0964	0.0560	0.0550	0.0701	0.0964	0.0560	0.0550	0.0701	0.0964	0.0560	0.0550	0.0701	0.0964	0.0560	0.0550	0.0701	0.0964	0.0560	0.0550	0.0701	0.0964	0.0560	0.0550	0.0701	0.0964		
6.00	0.0706	0.1018	0.2403	0.0947	0.0942	0.0964	0.0706	0.0799	0.1221	0.0964	0.0706	0.0799	0.1221	0.0964	0.0706	0.0799	0.1221	0.0964	0.0706	0.0799	0.1221	0.0964	0.0706	0.0799	0.1221	0.0964	0.0706	0.0799	0.1221	0.0964	0.0706	0.0799	0.1221	0.0964	
14.00	0.1308	0.1337	0.4089	0.1643	0.1612	0.1403	0.0804	0.0899	0.1543	0.1403	0.0804	0.0899	0.1543	0.1403	0.0804	0.0899	0.1543	0.1403	0.0804	0.0899	0.1543	0.1403	0.0804	0.0899	0.1543	0.1403	0.0804	0.0899	0.1543	0.1403	0.0804	0.0899	0.1543	0.1403	
18.00	0.1549	0.1649	0.5935	0.1911	0.2154	0.1798	0.0899	0.0996	0.1972	0.1798	0.0899	0.0996	0.1972	0.1798	0.0899	0.0996	0.1972	0.1798	0.0899	0.0996	0.1972	0.1798	0.0899	0.0996	0.1972	0.1798	0.0899	0.0996	0.1972	0.1798	0.0899	0.0996	0.1972	0.1798	
21.00	0.1805	0.1972	0.6968	0.2328	0.2798	0.3468	0.1487	0.1397	0.3799	0.3468	0.1487	0.1397	0.3799	0.3468	0.1487	0.1397	0.3799	0.3468	0.1487	0.1397	0.3799	0.3468	0.1487	0.1397	0.3799	0.3468	0.1487	0.1397	0.3799	0.3468	0.1487	0.1397	0.3799	0.3468	
23.00	0.2007	0.2336	0.7375	0.2495	0.3799	0.4498	0.1675	0.1586	0.6021	0.4498	0.1675	0.1586	0.6021	0.4498	0.1675	0.1586	0.6021	0.4498	0.1675	0.1586	0.6021	0.4498	0.1675	0.1586	0.6021	0.4498	0.1675	0.1586	0.6021	0.4498	0.1675	0.1586	0.6021	0.4498	
25.00	0.2161	0.2518	0.7905	0.2798	0.5199	0.5607	0.2366	0.2029	0.6788	0.5607	0.2366	0.2029	0.6788	0.5607	0.2366	0.2029	0.6788	0.5607	0.2366	0.2029	0.6788	0.5607	0.2366	0.2029	0.6788	0.5607	0.2366	0.2029	0.6788	0.5607	0.2366	0.2029	0.6788	0.5607	
27.00	0.2644	0.2832	0.8182	0.3096	0.6383	0.6055	0.2652	0.2299	0.7812	0.6055	0.2652	0.2299	0.7812	0.6055	0.2652	0.2299	0.7812	0.6055	0.2652	0.2299	0.7812	0.6055	0.2652	0.2299	0.7812	0.6055	0.2652	0.2299	0.7812	0.6055	0.2652	0.2299	0.7812	0.6055	
29.00	0.2993	0.3188	0.8297	0.3351	0.7033	0.6498	0.3143	0.2403	0.7305	0.6498	0.3143	0.2403	0.7305	0.6498	0.3143	0.2403	0.7305	0.6498	0.3143	0.2403	0.7305	0.6498	0.3143	0.2403	0.7305	0.6498	0.3143	0.2403	0.7305	0.6498	0.3143	0.2403	0.7305	0.6498	
38.00	0.6389	0.6021	0.9626	0.5901	0.9745	0.6882	0.3516	0.2803	0.7595	0.6882	0.3516	0.2803	0.7595	0.6882	0.3516	0.2803	0.7595	0.6882	0.3516	0.2803	0.7595	0.6882	0.3516	0.2803	0.7595	0.6882	0.3516	0.2803	0.7595	0.6882	0.3516	0.2803	0.7595	0.6882	
40.00	0.7595	0.6364	0.9788	0.6364	0.9508	0.7305	0.4225	0.3197	0.7799	0.7305	0.4225	0.3197	0.7799	0.7305	0.4225	0.3197	0.7799	0.7305	0.4225	0.3197	0.7799	0.7305	0.4225	0.3197	0.7799	0.7305	0.4225	0.3197	0.7799	0.7305	0.4225	0.3197	0.7799	0.7305	
44.00	0.8218	0.6799	1.0000	0.7011	0.9788	0.7595	0.4802	0.3497	0.7999	0.7595	0.4802	0.3497	0.7999	0.7595	0.4802	0.3497	0.7999	0.7595	0.4802	0.3497	0.7999	0.7595	0.4802	0.3497	0.7999	0.7595	0.4802	0.3497	0.7999	0.7595	0.4802	0.3497	0.7999	0.7595	
46.00	0.8794	0.7213	1.0088	0.7670	0.9914	0.8794	0.7201	0.5010	0.8386	0.8794	0.7201	0.5010	0.8386	0.8794	0.7201	0.5010	0.8386	0.8794	0.7201	0.5010	0.8386	0.8794	0.7201	0.5010	0.8386	0.8794	0.7201	0.5010	0.8386	0.8794	0.7201	0.5010	0.8386	0.8794	
48.00	0.9031	0.7570	1.0315	0.8297	1.0088	0.8796	0.8013	0.5268	0.8601	0.8796	0.8013	0.5268	0.8601	0.8796	0.8013	0.5268	0.8601	0.8796	0.8013	0.5268	0.8601	0.8796	0.8013	0.5268	0.8601	0.8796	0.8013	0.5268	0.8601	0.8796	0.8013	0.5268	0.8601	0.8796	
64.00	1.1612	0.9586	1.0315	1.1024	1.0409	0.9208	0.8637	0.5870	0.8794	0.9208	0.8637	0.5870	0.8794	0.9208	0.8637	0.5870	0.8794	0.9208	0.8637	0.5870	0.8794	0.9208	0.8637	0.5870	0.8794	0.9208	0.8637	0.5870	0.8794	0.9208	0.8637	0.5870	0.8794	0.9208	
67.00	1.2316	0.9626	1.0315	1.1549	1.0506	0.9318	0.9508	0.6900	0.8794	0.9318	0.9508	0.6900	0.8794	0.9318	0.9508	0.6900	0.8794	0.9318	0.9508	0.6900	0.8794	0.9318	0.9508	0.6900	0.8794	0.9318	0.9508	0.6900	0.8794	0.9318	0.9508	0.6900	0.8794	0.9318	
72.00	1.3138	0.9626	1.0315	1.1549	1.0969	0.9508	0.9957	0.7496	0.8794	0.9508	0.9957	0.7496	0.8794	0.9508	0.9957	0.7496	0.8794	0.9508	0.9957	0.7496	0.8794	0.9508	0.9957	0.7496	0.8794	0.9508	0.9957	0.7496	0.8794	0.9508	0.9957	0.7496	0.8794	0.9508	
75.00	1.3138	0.9626	1.0315	1.1549	1.0969	0.9508	1.0409	0.8827	0.8794	0.9508	1.0409	0.8827	0.8794	0.9508	1.0409	0.8827	0.8794	0.9508	1.0409	0.8827	0.8794	0.9508	1.0409	0.8827	0.8794	0.9508	1.0409	0.8827	0.8794	0.9508	1.0409	0.8827	0.8794	0.9508	
78.00	1.3138	0.9626	1.0315	1.1549	1.0969	0.9508	1.0969	1.2060	0.8794	0.9508	1.0969	1.2060	0.8794	0.9508	1.0969	1.2060	0.8794	0.9508	1.0969	1.2060	0.8794	0.9508	1.0969	1.2060	0.8794	0.9508	1.0969	1.2060	0.8794	0.9508	1.0969	1.2060	0.8794	0.9508	
						75.00	1.0969	1.2060		75.00	1.0969	1.2060		75.00	1.0969	1.2060		75.00	1.0969	1.2060		75.00	1.0969	1.2060		75.00	1.0969	1.2060		75.00	1.0969	1.2060			
						78.00	1.0969	1.2060		78.00	1.0969	1.2060		78.00	1.0969	1.2060		78.00	1.0969	1.2060		78.00	1.0969	1.2060		78.00	1.0969	1.2060		78.00	1.0969	1.2060		78.00	1.0969

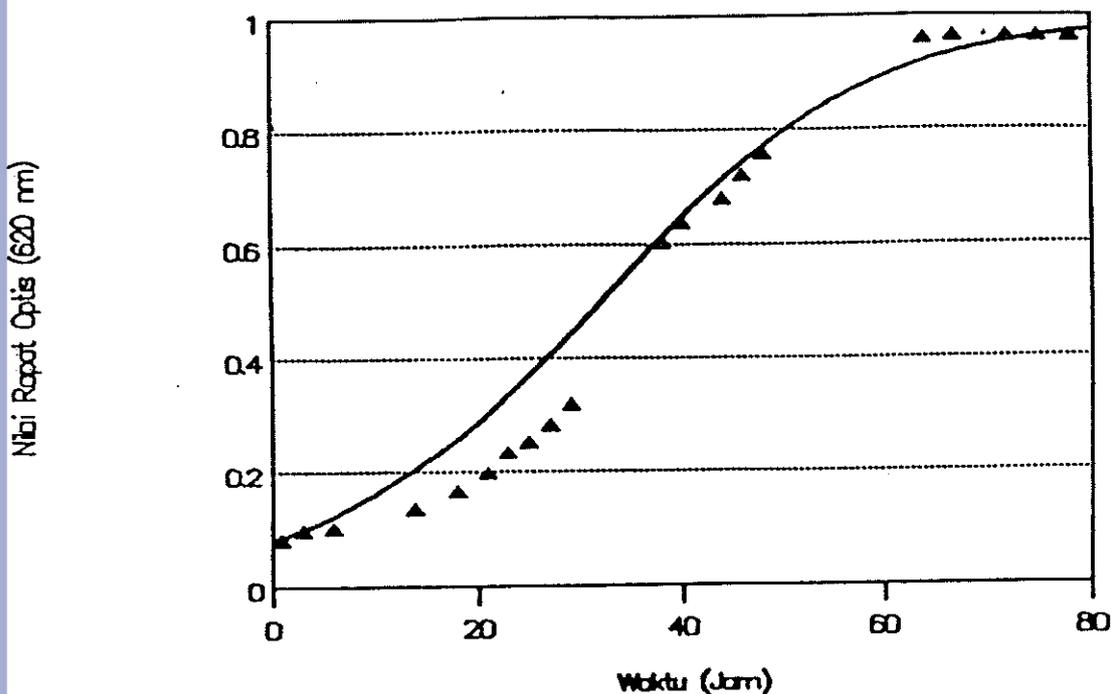
Gambar Lampiran 15. Kurva Pertumbuhan Galur 53



$K = 1.6851$
 $A = 3.4176$
 $B = 2.4751$
 $C = 1.5326$
 $r_1 = 0.0673$
 $r_2 = 0.0650$

$$N(t) = \frac{1.6851}{1 + \left(\frac{1.6851 - 0.0535}{0.0535} e^{-0.0673 t} \right)}$$

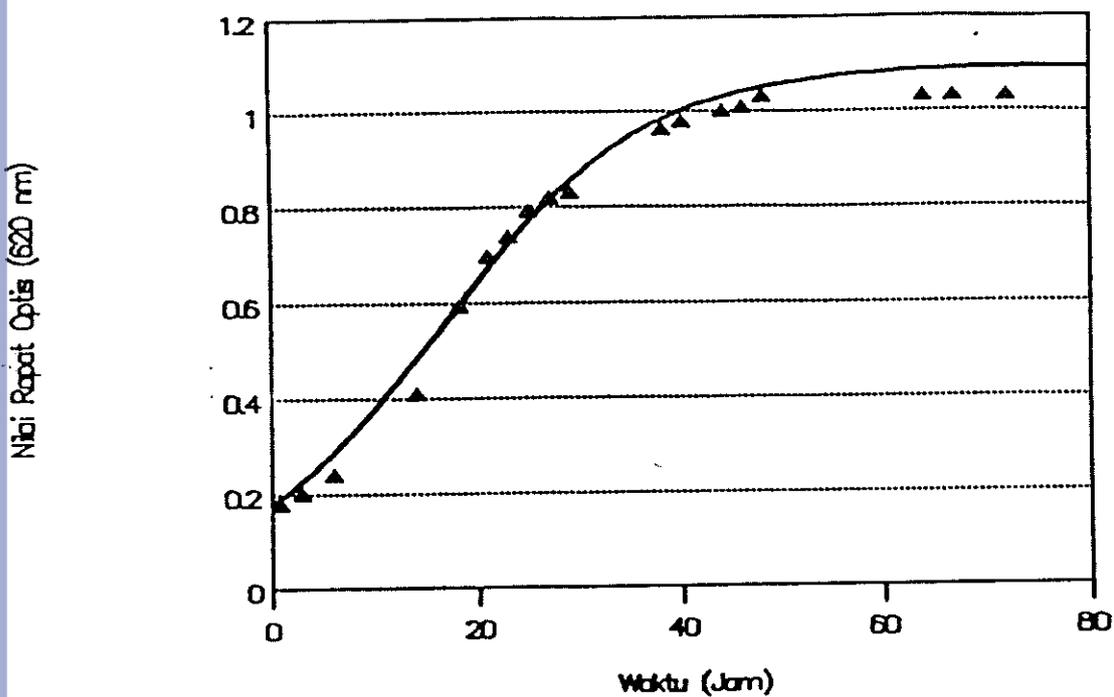
Gambar Lampiran 16. Kurva Pertumbuhan Galur 52



$K = 0.9998$
 $A = 2.4233$
 $B = -0.4147$
 $C = -3.2526$
 $r_1 = 0.0747$
 $r_2 = 0.0757$

$$N(t) = \frac{0.9998}{1 + \left(\frac{0.9998 - 0.0814}{0.0814} e^{-0.0757 t} \right)}$$

Gambar Lampiran 17. Kurva Pertumbuhan Galur 50

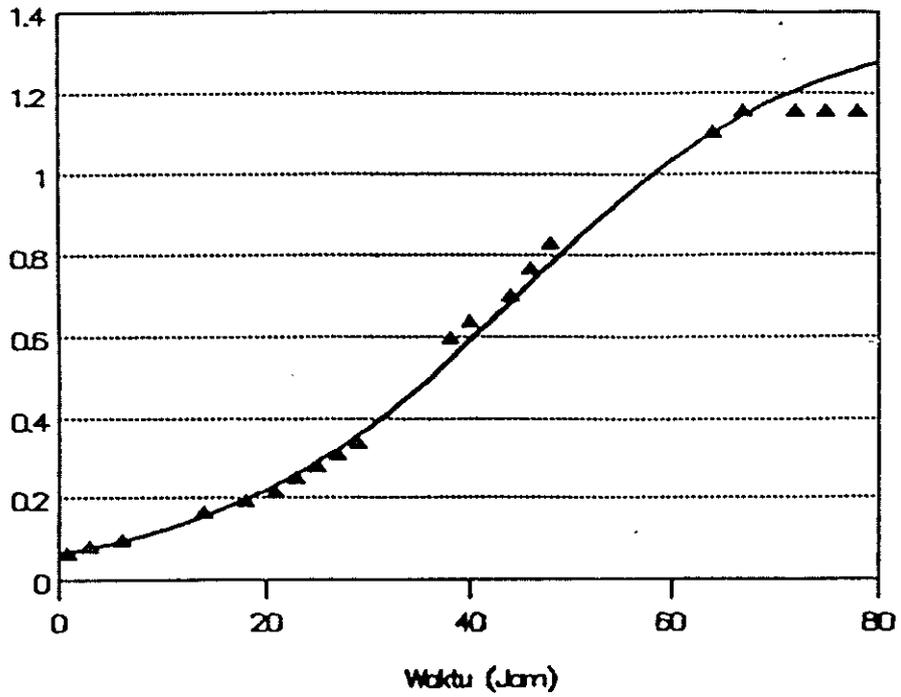


$K = 1.0955$
 $A = 1.6452$
 $B = -0.1675$
 $C = -1.9802$
 $r_1 = 0.1807$
 $r_2 = 0.0954$

$$N(t) = \frac{1.0955}{1 + \left(\frac{1.0955 - 0.1772}{0.1772} e^{-0.1807 t} \right)}$$



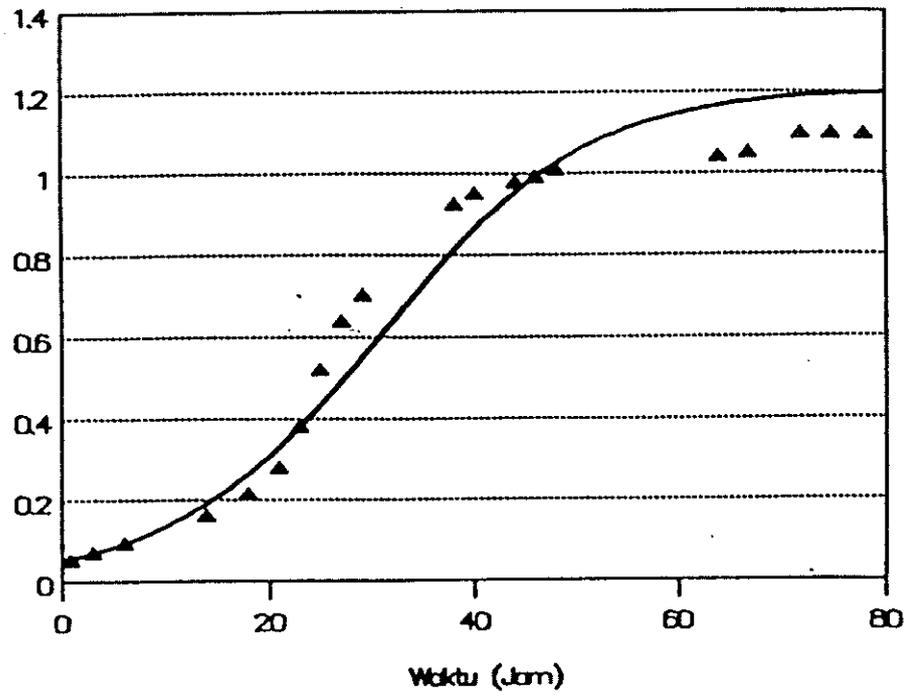
Gambar Lampiran 18. Kurva Pertumbuhan Galur 47



$K = 1.3868$
 $A = 3.0368$
 $B = 1.6008$
 $C = 0.1648$
 $r_1 = 0.0684$
 $r_2 = 0.0718$

$$N(t) = \frac{1.3868}{1 + \left(\frac{1.3868 - 0.0635}{0.0635} e^{-0.0684 t} \right)}$$

Gambar Lampiran 19. Kurva Pertumbuhan Galur 43



$$K = 1.2080$$

$$A = 3.0796$$

$$B = 0.7792$$

$$C = -1.5212$$

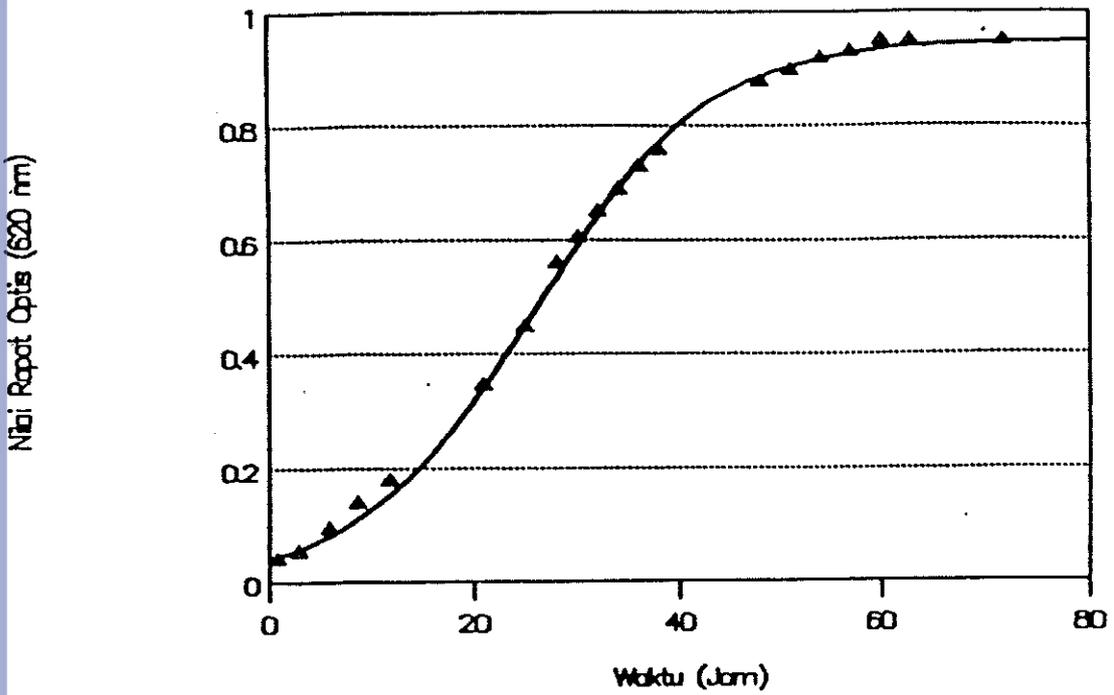
$$r_1 = 0.1000$$

$$r_2 = 0.1000$$

$$N(t) = \frac{1.6851}{1 + \left(\frac{1.6851 - 0.0535}{0.0535} e^{-0.0673 t} \right)}$$

© Hak cipta milik IPB University
 Nilai Rapat Optis (620 nm)

Gambar Lampiran 20. Kurva Pertumbuhan Galur 42



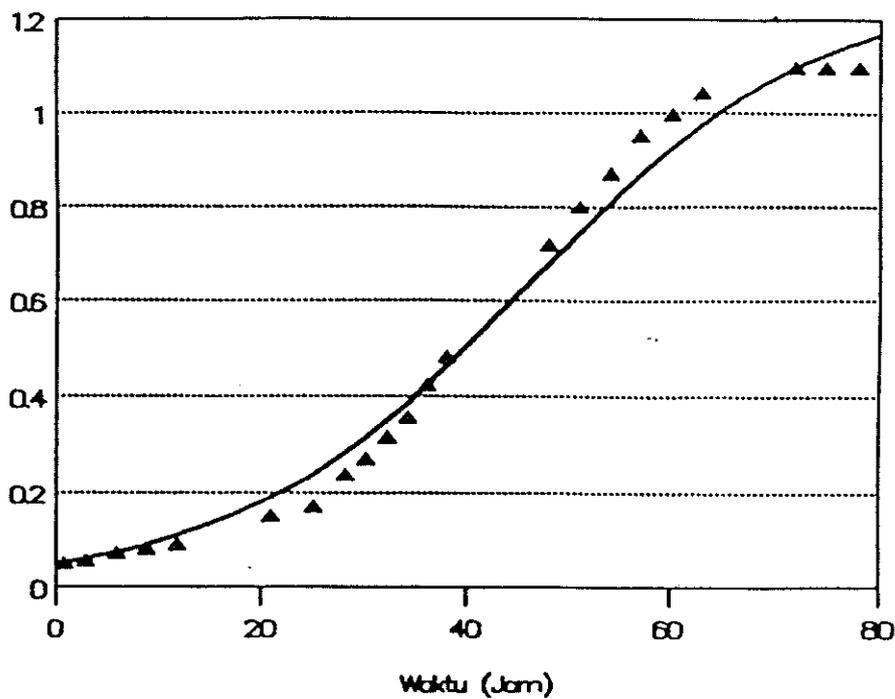
$K = 0.9583$
 $A = 3.0898$
 $B = 0.1869$
 $C = -2.8752$
 $r_1 = 0.1193$
 $r_2 = 0.1169$

$$N(t) = \frac{0.9583}{1 + \left(\frac{0.9583 - 0.0414}{0.0414} e^{-0.1193 t} \right)}$$

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

Gambar Lampiran 21. Kurva Pertumbuhan Galur 30



$K = 1.2787$
 $A = 3.2100$
 $B = 0.7063$
 $C = -1.7974$
 $r_1 = 0.0695$
 $r_2 = 0.0695$

$$N(t) = \frac{1.2787}{1 + \left(\frac{1.2787 - 0.0496}{0.0496} e^{-0.0695 t} \right)}$$

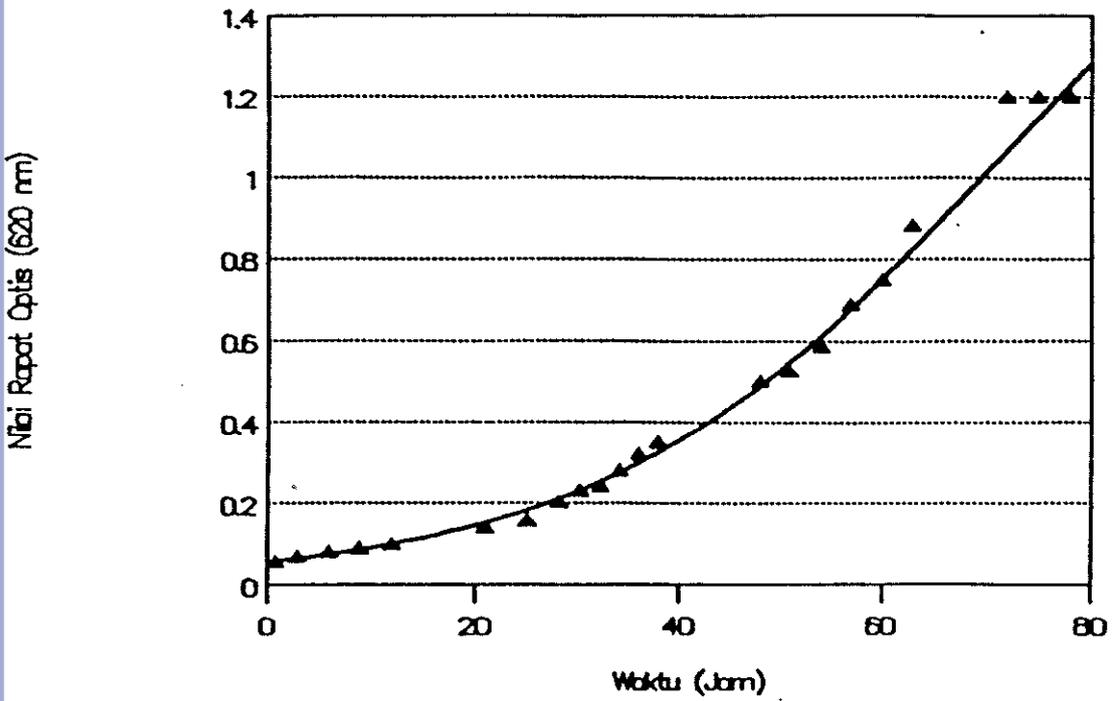
@Hak cipta milik IPB University

Nilai Rapat Optis (620 nm)

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

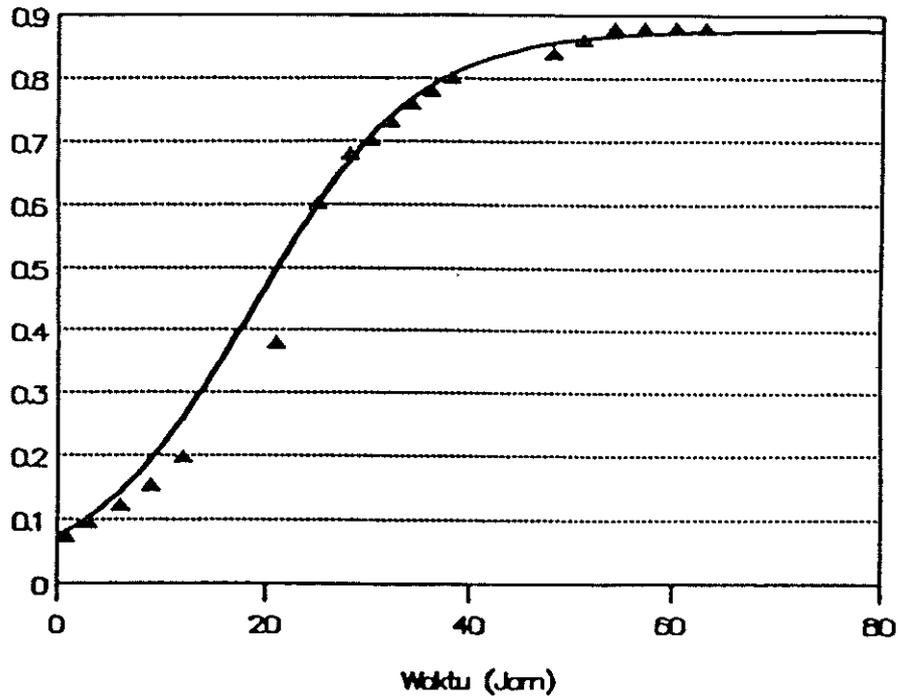
Gambar Lampiran 22. Kurva Pertumbuhan Galur 28



$K = 2.2027$
 $A = 3.6372$
 $B = 2.1496$
 $C = 0.6619$
 $r_1 = 0.0496$
 $r_2 = 0.0496$

$$N(t) = \frac{2.2027}{1 + \left(\frac{2.2027 - 0.0565}{0.0565} e^{-0.0496 t} \right)}$$

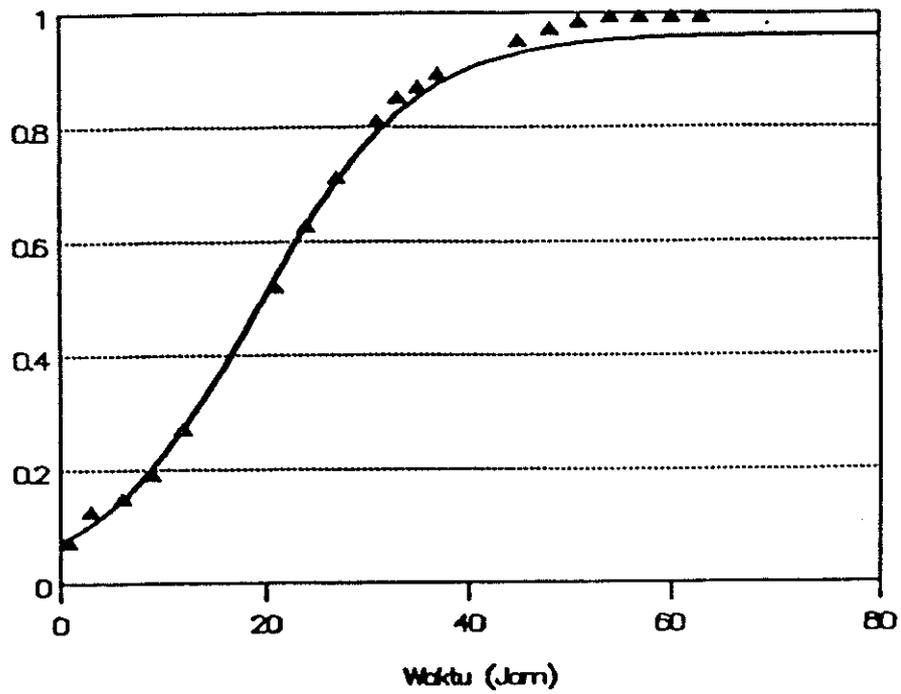
Gambar Lampiran 23. Kurva Pertumbuhan Galur 26



$K = 0.8763$
 $A = 2.3968$
 $B = -0.7864$
 $C = -3.9697$
 $r_1 = 0.1273$
 $r_2 = 0.1248$

$$N(t) = \frac{0.8763}{1 + \left(\frac{0.8763 - 0.0731}{0.0731} \right) e^{-0.1273 t}}$$

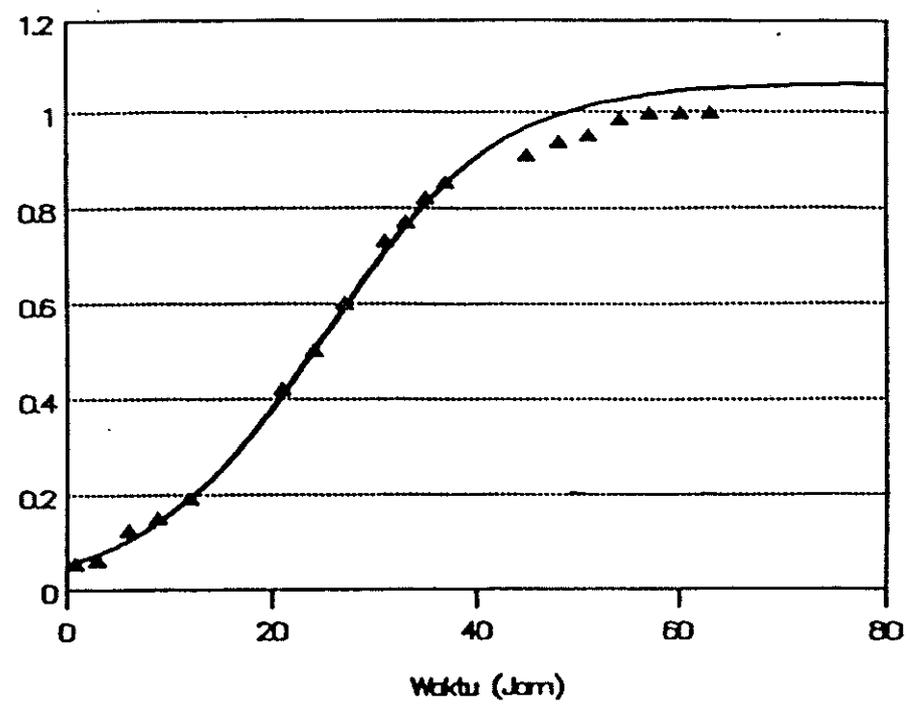
Gambar Lampiran 24. Kurva Pertumbuhan Galur 25



$K = 0.9622$
 $A = 2.5014$
 $B = 0.9415$
 $C = -0.6184$
 $r_1 = 0.1300$
 $r_2 = 0.1300$

$$N(t) = \frac{0.9622}{1 + \left(\frac{0.9622 - 0.0729}{0.0729} e^{-0.1300 t} \right)}$$

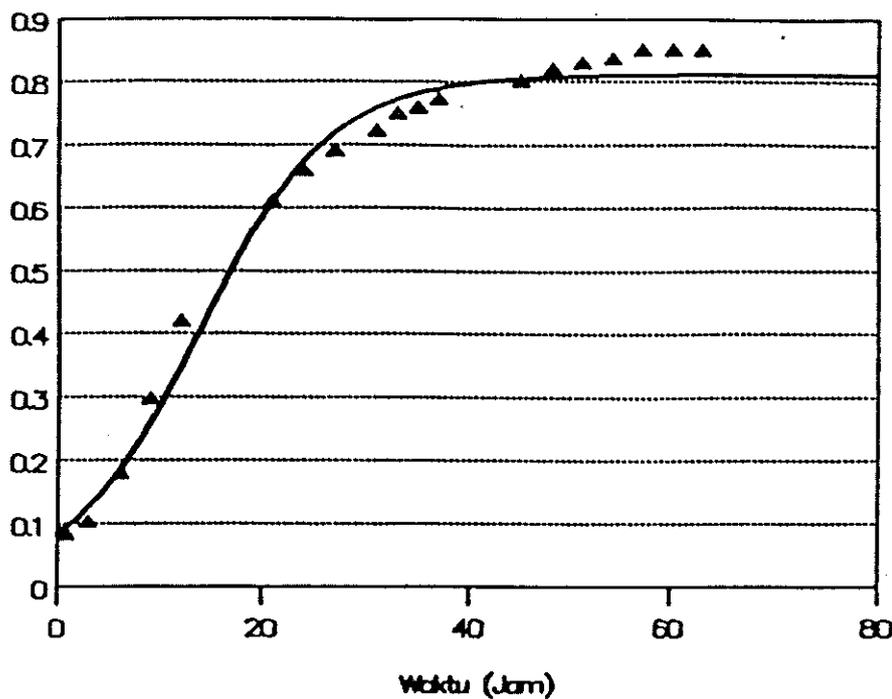
Gambar Lampiran 25. Kurva Pertumbuhan Galur 23



$K = 1.0618$
 $A = 2.9265$
 $B = 1.5210$
 $C = 0.1154$
 $r_1 = 0.1171$
 $r_2 = 0.1171$

$$N(t) = \frac{1.0618}{1 + \left(\frac{1.0618 - 0.0540}{0.0540} \right) e^{-0.1171 t}}$$

Gambar Lampiran 26. Kurva Pertumbuhan Galur 20



$$\begin{aligned}
 K &= 0.8112 \\
 A &= 2.1650 \\
 B &= -1.1145 \\
 C &= -4.3940 \\
 r_1 &= 0.1562 \\
 r_2 &= 0.1458
 \end{aligned}
 \quad
 \begin{aligned}
 N(t) &= \frac{0.8112}{1 + \left(\frac{0.8112 - 0.0835}{0.0835} e^{-0.1562 t} \right)}
 \end{aligned}$$

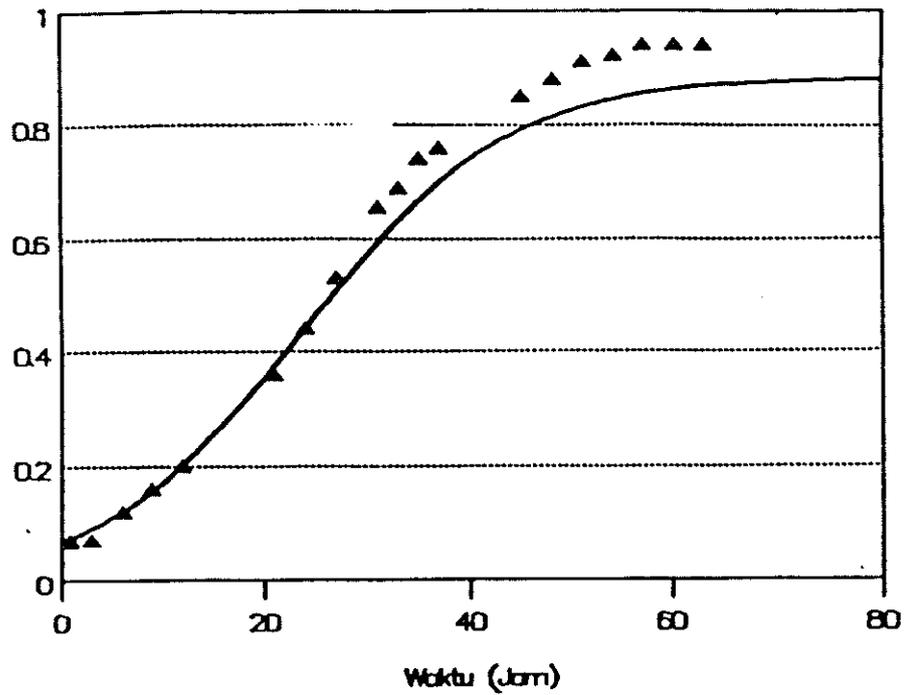
@Hak cipta milik IPB University

Nilai Rapat Optis (620 nm)

Waktu (Jam)

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
 1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
 2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

Gambar Lampiran 27. Kurva Pertumbuhan Galur 18

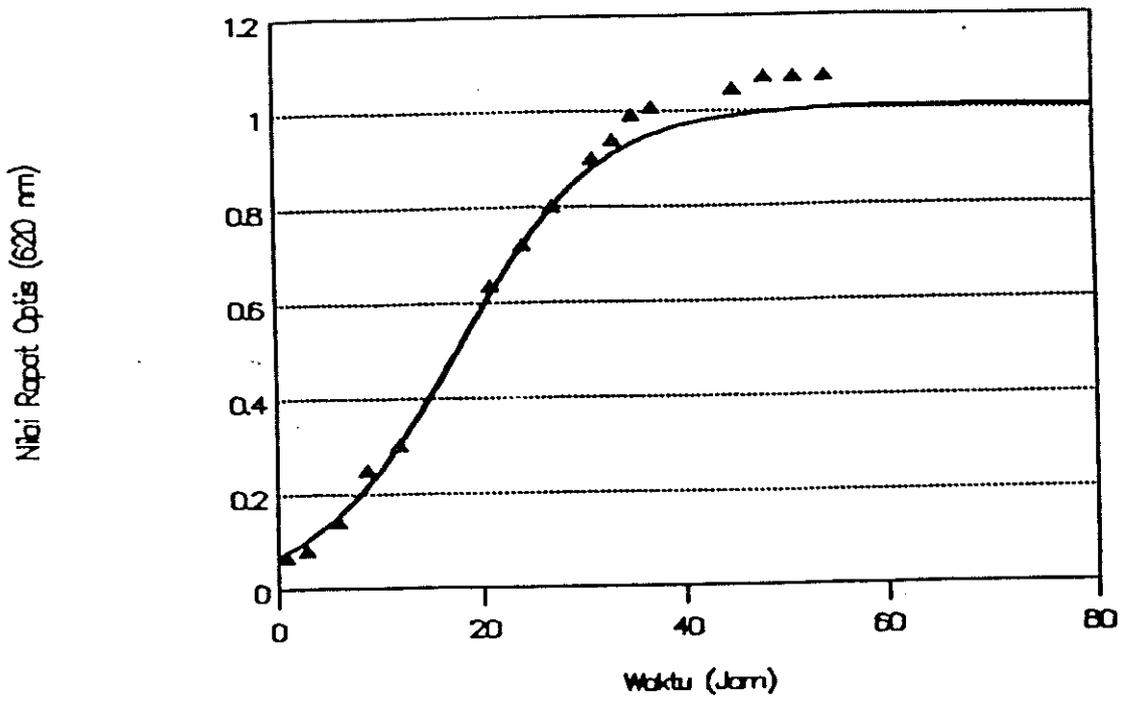


$K = 0.8848$
 $A = 2.4606$
 $B = 1.2314$
 $C = 0.0022$
 $r_1 = 0.1024$
 $r_2 = 0.1024$

$$N(t) = \frac{0.8848}{1 + \left(\frac{0.8848 - 0.0696}{0.0696} e^{-0.1024 t} \right)}$$

@Hak cipta milik IPB University
 Nilai Rapat Optis (620) (nm)

Gambar Lampiran 28. Kurva Pertumbuhan Galur 07



$$K = 1.0080$$

$$A = 2.6270$$

$$B = 0.8590$$

$$C = -0.9890$$

$$r_1 = 0.1473$$

$$r_2 = 0.1473$$

$$N(t) = \frac{1.0080}{1 + \left(\frac{1.0080 - 0.0680}{0.0680} \right) e^{-0.1473 t}}$$