



PROGRAM KREATIVITAS MAHASISWA

ISOLASI BAKTERI RHIZOSFER TOLERAN ASAM
DARI PERAKARAN LEGUM *Calliandra* sp.

BIDANG KEGIATAN:

PKMI-AI

Diusulkan oleh:

Allia Laksmi Nurdini	(G34061578/2006)
Amaryllis Anindyaputri	(G34050939/2005)
Delly Trianggana	(G34061454/2006)
Rio Adhitya Reginaldi	(G34060045/2006)

INSTITUT PERTANIAN BOGOR

BOGOR

2009

1. Judul Kegiatan : Isolasi Bakteri Rhizosfer Tahan Asam dari Perakaran Legum Calliandra sp.
2. Bidang Kegiatan : PKM-AI
3. Ketua Pelaksana Kegiatan

4. Anggota Pelaksana Kegiatan : 3 orang
5. Dosen Pendamping

Bogor, 31 Maret 2009

Menyetujui

Ketua Departemen Biologi

Ketua Pelaksana Kegiatan

Dr. Ir. Ence Darmo Jaya S., M.S.
NIP. 131 851 278

Allia Laksmi Nurdini
NRP. G34061578

Wakil Rektor Bidang
Kemahasiswaan I

Dosen Pendamping

Prof. Dr. Ir. Yonny Koesmaryono, MS
NIP. 131 473 999

Dr. Nisa Rachmania M. M.Si
NIP. 132 045 531

ISOLASI BAKTERI RHIZOSFER TOLERAN ASAM DARI PERAKARAN LEGUM *Calliandra* sp.

Nurdini AL, Anindyaputri A, Tringgana D, Reginaldi RA

ABSTRAK

Tanah masam banyak dijumpai di wilayah beriklim tropis basah, termasuk Indonesia. Tanah masam dapat menyebabkan ketidaksuburan tanah karena kadar pH yang rendah. Tanaman legum *Calliandra* sp. yang mendominasi Taman Wisata Alam Situ Gunung memiliki kemampuan tumbuh di tanah masam. Penelitian ini bertujuan melakukan seleksi galur rhizobakteria yang toleran terhadap kondisi asam dari tanah di sekitar perakaran *Calliandra* sp. Sampel tanah diambil dari tanaman *Calliandra* sp. yang terletak di dekat danau dan hutan Situ Gunung dengan pH tanah 4.5. Isolasi rhizobakteria menggunakan media Pikovskaya, YMA (Yeast Manitol Agar), dan NA (Nutrient Agar). Hasil isolat dari dua sampel tanah rhizosfer menunjukkan adanya 9 isolat rhizobakteria. Hasil seleksi pada media Pikovskaya menghasilkan 3 isolat bakteri pelarut fosfat. Seleksi pada media YMA menghasilkan 2 isolat bakteri penambat nitrogen. Seleksi pada media NA menghasilkan 2 isolat rhizobakteria. Pewarnaan Gram menghasilkan 1 isolat Gram positif dan 6 isolat Gram negatif. Satu isolat yaitu isolat D2 menunjukkan hasil positif terhadap uji antagonis terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*.

Kata kunci: Rhizobakteria, bakteri pelarut fosfat, bakteri penambat nitrogen, tanah masam, *Calliandra* sp.

PENDAHULUAN

Tanah masam banyak dijumpai di wilayah beriklim tropis basah, termasuk Indonesia (Tan, 2008). Tanah masam dapat menyebabkan ketidaksuburan tanah karena kadar pH yang rendah langsung menurunkan kapasitas nutrisi kation, seperti K^+ , Ca^{2+} , dan Mg^{2+} . Tanaman pada umumnya sukar tumbuh pada tanah masam karena kurang suburnya tanah dan memiliki efek racun akibat kadar aluminium dan mangan yang berlebih. Namun tanaman legum dapat tumbuh di tanah masam akibat adanya bakteri pemfiksasi nitrogen yang berada di sekitar perakaran (Kennedy, 1992).

Rhizobakteria atau plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) adalah bakteri yang hidup di daerah perakaran (rhizosfer) dan berperan penting dalam pertumbuhan tanaman. Rhizobakteria dapat meningkatkan kualitas pertumbuhan tanaman melalui beberapa mekanisme yaitu produksi hormon pertumbuhan, kemampuan fiksasi nitrogen dari udara untuk meningkatkan ketersediaan nitrogen tanah, penghasil osmoprotektan pada kondisi cekaman kekeringan, dan penghasil osmolit tertentu yang dapat membunuh patogen tanaman di tanah (Kloepper, 1993). Galur rhizobakteria banyak ditambahkan pada tanah pertanian karena keuntungannya yang dapat memfiksasi nitrogen jika bersimbiosis dengan tanaman legum.

Bakteri rhizosfer mempunyai kemampuan mengkoloni perakaran tanaman sehingga dapat mendukung pertumbuhan tanaman dan berperan dalam menghambat mikroflora akar lainnya atau patogen tanaman (Soesanto, 2008). Pertumbuhan bakteri rhizosfer menghendaki kisaran pH optimal sedikit alkali. Pada pH tanah 5.0 beberapa galur *Rhizobium* masih dapat hidup. Kisaran pH yang sangat rendah akan mempengaruhi perkembangan *Rhizobium* dan bahkan akan menghambat infeksi bakteri tersebut (Islami, 1995). Bakteri yang banyak ditemukan sebagai penambat nitrogen yang bersimbiosis dengan tanaman pepolongan ialah bakteri dari genus *Rhizobium* atau *Bradyrhizobium* (Madigan et al., 2006). Isgitani (2005) melaporkan bahwa penambahan bakteri fosfat pada pertumbuhan sorghum menyebabkan peningkatan yang besar kadar fosfat tersedia di tanah.

TUJUAN

Penelitian ini bertujuan melakukan seleksi galur rhizobakteria yang toleran terhadap kondisi asam dari tanah di sekitar perakaran *Calliandra* sp.

BAHAN DAN METODE

Bahan yang digunakan ialah sampel tanah dengan kode H4.5 dan D4.5, media NA (Nutrient Agar), YMA (Yeast Manitol Agar), Pikovskaya, NB (Nutrient Broth), YMB (Yeast Malt Broth), aquades, congo red, rifampisin, alkohol 70%, bahan-bahan pewarnaan Gram seperti ungu kristal, iodine, safranin, alkohol 95%.

Pengambilan Contoh Tanah

Pengambilan contoh tanah dilakukan dari tanggal 4 Juli sampai 6 Juli 2008 di Taman Wisata Alam Situ Gunung. Ada 13 titik pengambilan contoh tanah yang berbeda. Pengambilan tanah dilakukan dengan menggali tanah sedalam 10 cm dari permukaan tanah di sekitar perakaran tanaman polong-polongan. Tanah yang diambil kurang lebih 50 gram dan diukur pH-nya.

Isolasi Mikroorganisme dari Tanah

Dari 13 sampel tanah yang didapat diambil dua sampel tanah yaitu D4.5 dan H4.5 yang memiliki pH terendah yaitu 4,5. Sebanyak 1 gram contoh tanah dimasukkan ke dalam media cair YMB, NB dan Pikovskaya secara aseptik untuk dihomogenisasi selama tiga hari. Isolasi mikroorganisme dilakukan dengan dua teknik yaitu pengenceran dan cawan gores. Teknik pengenceran dimulai dengan mengambil 1 ml media dan ditambahkan ke dalam 9 ml garam fisiologis sebagai pengenceran 10^1 . Tahap ini berlanjut sampai pengenceran 10^6 . Dua sampel tersebut diambil 0,1 ml dan dicawakan dengan media yang sama dengan sebelumnya. Setiap cawan diinkubasi pada suhu ruang (25-30 C) selama 24-48

jam hingga teramati koloni yang tumbuh. Semua perlakuan dilakukan secara aseptik dengan dua kali ulangan.

Teknik cawan gores (Hadioetomo, 1990) dilakukan dengan mengambil satu lup media biakan yang telah dihomogenisasi sesuai dengan media sebelumnya. Setiap cawan diinkubasi pada suhu ruang selama 24-48 jam hingga teramati koloni yang tumbuh teknik ini juga dilakukan secara aseptik.

Pemurnian dan Peremajaan Isolat

Pemurnian isolat dilakukan dengan mengambil koloni yang memiliki ciri morfologi yang berbeda dan digores ke cawan replika untuk didapatkan koloni yang benar-benar murni. Biakan murni yang diperoleh ditumbuhkan di agar-agar miring untuk disimpan, dan kemudian dilakukan pewarnaan Gram. Setelah biakan beumur 18 jam dilakukan pewarnaan Gram dengan seperangkat pewarnaan Gram yaitu ungu kristal, larutan iodium Gram, alkohol 95%, dan safranin. Preparat yang sudah diwarnai diamati dengan menggunakan mikroskop.

Uji Antagonis

Isolat ditumbuhkan ke media cawan NA berupa garis lurus kemudian diinkubasi selama 24 jam. Bakteri patogen *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* kemudian digoreskan secara tegak lurus pada isolat yang telah tumbuh sebanyak tiga kali (3 ulangan) kemudian diinkubasi.

Uji Antagonis pada Media yang Sesuai

Isolat ditumbuhkan ke media cawan asal yaitu YMA, Pikovskaya, dan NA. Bakteri patogen digores sesuai dengan uji antagonis.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Rhizosfer merupakan daerah yang ideal bagi tumbuh dan berkembangnya mikroorganisme tanah. Keadaan ini didukung oleh fungsinya, yaitu sebagai penyedia nutrisi dan juga sebagai tempat tumbuh dan berkembangnya mikroorganisme. Beberapa macam nutrisi disekresikan di dalam rhizosfer, yang sangat dipengaruhi oleh berbagai faktor lingkungan di dalam tanah. Beberapa bakteri penyedia hara yang terdapat pada rhizosfer akar disebut sebagai rhizobakteri pemacu tanaman atau dikenal sebagai plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). PGPR dibagi menjadi dua kelompok yaitu berperan dalam siklus nutrisi dan sebagai biokontrol patogen tanaman (Basan & Holguin, 1998). Intesitas interaksi yang besar antara rhizobakteria dan akar tanaman berada pada jarak satu cm dari permukaan akar (Tate, 2000).

Bakteri yang diisolasi di Situ Gunung berasal dari perakaran legum *Calliandra* sp. karena spesies ini mendominasi wilayah tersebut. *Calliandra* sp. merupakan legum yang dapat berasosiasi membentuk bintil akar dengan rhizobakteria (Schroth & Sinclair, 2003) dan hidup pada tanah masam (NRC, 1993). Sebanyak 13 contoh tanah didapatkan dari perakaran *Calliandra* sp.

dengan kisaran pH 4,5-5,9. Contoh tanah berasal dari hutan dan danau. Pemilihan pH terkecil ini dimaksudkan agar rhizobakteria yang berhasil diisolasi toleran terhadap tanah masam (Tabel 1).

Tabel 1 Lokasi pengambilan contoh tanah dan pH

Sampel	Lokasi pengambilan	pH	Jenis legum
1	Di depan wisma	5.3	Calliandra sp.
2	Di jalan dekat air terjun	5.9	Calliandra sp.
3	Di dekat danau Situ Gunung	5.1	Calliandra sp.
4	Di depan aula	5.1	Calliandra sp.
5	Jalan menuju Curug	5.9	Calliandra sp.
6	Jalan menuju Curug	5.2	Calliandra sp.
7	Hutan Situ Gunung	4.5	Calliandra sp.
8	Hutan Situ Gunung	5.5	Calliandra sp.
9	Di dekat danau Situ Gunung	5.5	Calliandra sp.
10	Di dekat danau Situ Gunung	5.5	Calliandra sp.
11	Di dekat danau Situ Gunung	4.5	Calliandra sp.
12	Di depan penginapan	5.1	Calliandra sp.
13	Jalan menuju danau Situ Gunung	5.5	Calliandra sp.

Tabel 2 Sampel tanah dan biakan yang berhasil diisolasi

Kode isolat	Asal Sampel, pH	Media isolasi	Ciri Morfologi
Hp1.1	Hutan, 4.5	NA	Bundar, licin, cembung, berlendir, batang, Gram -, kuning
Hp1.2	Hutan, 4.5	NA	Bundar, licin, cembung, berlendir, batang, Gram -, putih
D2	Danau, 4.5	Pikovskaya	Bundar, licin, cembung, berlendir, batang, Gram -, putih
H5	Hutan, 4.5	YMA	Bundar, berombak. cembung, berlendir, batang, Gram -, putih
Hp1.3	Hutan, 4.5	Pikovskaya	Bundar, licin, cembung, berlendir, batang, Gram -, putih
H1	Hutan, 4.5	Pikovskaya	Bundar, licin, cembung, berlendir, batang, Gram +, putih
H1	Hutan, 4.5	YMA	Bundar, berombak. cembung, berlendir, batang, Gram -, putih

Isolasi dilakukan dengan menggunakan medium YMA, Pikovskaya, dan NA. Isolasi bakteri pelarut fosfat menggunakan medium Pikovskaya yang mengandung fosfat. Hasil dari metabolisme fosfat akan menghasilkan zona bening di sekitar isolat (Pradhan & Sukla, 2006). Isolasi bakteri penambat nitrogen digunakan media YMA dengan rifampisin. Media YMA mengandung merah kongo (difenildiazo-bis-_-naftilaminsulfonat) sebagai pewarna. Secara umum, bakteri penambat nitrogen memproduksi koloni berwarna putih atau menyerap

pewarna secara berkala. Dari seluruh isolat, lima isolat berasal dari hutan (H) dan satu isolat berasal dari danau (D). Isolat-isolat rhizobakteria didapatkan dari hasil metode cawan gores dengan kode isolat H dan D serta dengan metode pengenceran dengan kode isolat Hp (H pengenceran). Isolat dipilih berdasarkan penampakan morfologi dari koloni-koloni tunggal (Tabel 2).

Hasil isolasi didapatkan tujuh isolat rhizobakteria yaitu dua isolat berasal dari media NA, dua isolat berasal dari media YMA, tiga isolat berasal dari media Pikovskaya. Berdasarkan hasil pengamatan, diketahui bahwa empat isolat dapat memetabolisme fosfat yang terdapat dalam media Pikovskaya dan dua isolat dapat menyerap merah kongo yang terdapat dalam media YMA sehingga bakteri ini tergolong bakteri penambat nitrogen. Peningkatan rhizosfer dalam perakaran dapat meningkatkan absorpsi fosfat (Islami & Utomo, 1995). Tanaman legum membutuhkan fosfor lebih banyak dibandingkan dengan tanaman serupa yang disuplai oleh nitrogen. Nodul penting untuk mentransport fosfor, biasanya mempunyai konsentrasi tinggi pada tanaman. Fiksasi nitrogen membutuhkan energi yang tinggi sehingga membutuhkan ATP yang banyak pula. Sehingga fosfor dibutuhkan dalam pembentukan dan untuk menjaga fungsi nodul (Sylvia et al., 1999).

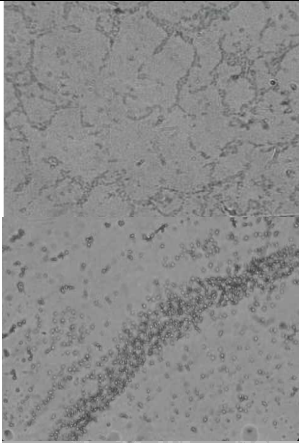
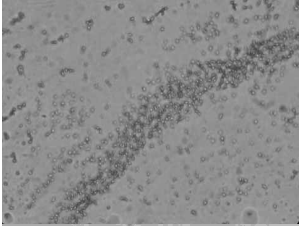
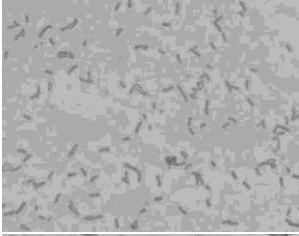
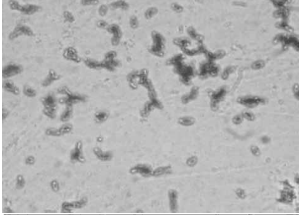
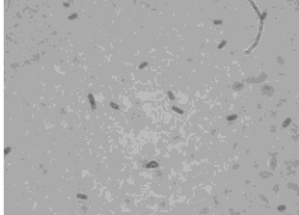
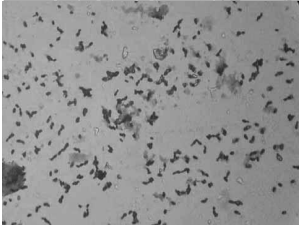
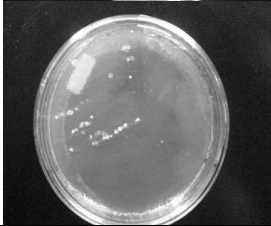
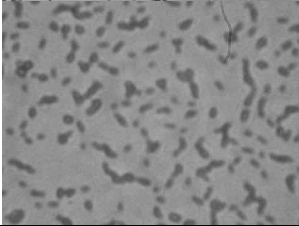
Pewarnaan Gram dilakukan ketika isolat berumur 18 jam. Hasil pewarnaan Gram pada ketujuh isolat menunjukkan enam isolat dengan Gram negatif dan satu isolat dengan Gram positif (Tabel 3). Kloepper et al. (1992) menunjukkan bahwa rhizosfer lebih cenderung memiliki bakteri dengan Gram negatif daripada Gram positif.

Legum berbintil menyumbang cukup banyak dalam hal jumlah terfiksasi ke dalam biosfer. Kebanyakan tanaman tidak dapat hidup pada pH yang sangat rendah (di bawah 4.0) dan sangat tinggi (di atas 9.0) karena pada pH tersebut merupakan kondisi yang sangat beracun pada akar tanaman. Pada pH kurang dari 6.0, kelarutan aluminium, Mn, dan Fe meningkat sehingga dapat bersifat racun yang dapat menghambat pertumbuhan akar (Kennedy 2000). Namun tanaman legum *Calliandra* sp. yang dijadikan contoh yang tampak subur dan tidak terganggu pertumbuhannya. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri rhizosfer yang menyebabkan pertumbuhannya subur. Defisiensi fosfat banyak terjadi pada tanah masam di daerah tropis, pada tanah liat yang tinggi kandungan Al dan Fe diserap sangat banyak sehingga penggunaan pupuk menjadi tidak ekonomis.

Rhizobakteria dapat melarutkan fosfat dengan menghasilkan asam organik pengkelat (Vessey et al., 2004). Pada tanah masam, aktivitas dilakukan oleh fungi karena sebagian besar pertumbuhan bakteri herotrof terhambat, kecuali pada tanah masam yang tergenang. Pada kondisi asam, asam organik menjadi beracun untuk pertumbuhan mikroorganisme (Tate, 2000), maka galur-galur bakteri rhizosfer yang dapat hidup pada kondisi asam namun tidak mengganggu pertumbuhan tanaman jarang ditemukan.

Uji antagonis menunjukkan hasil yang positif dengan terbentuknya zona hambat (Tabel 4, 5). Isolat D2 yang ditumbuhkan pada media Pikovskaya menghambat pertumbuhan bakteri baik *Escherichia coli* yang merupakan bakteri kontrol Gram negatif, maupun *Staphylococcus aureus* yang merupakan kontrol Gram positif (Gambar 1a, 1b). Dengan demikian, isolat D2 berpotensi sebagai agen biokontrol untuk *E. coli* maupun *S. aureus*.

Tabel 3 Gambar Koloni dan Mikroskopis Isolat

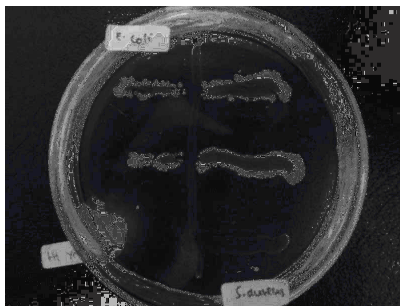
Kode isolat	Asal Sampel, pH	Media isolasi	Bentuk koloni	Bentuk sel
Hp1.1	Hutan, 4.5	NA		
Hp1.2	Hutan, 4.5	NA		
D2	Danau, 4.5	Pikovs kaya		
H5	Hutan, 4.5	YMA		
Hp1.3	Hutan, 4.5	Pikovs kaya		
H1	Hutan, 4.5	Pikovs kaya		
H1	Hutan, 4.5	YMA		

Tabel 4 Hasil Uji Antagonis

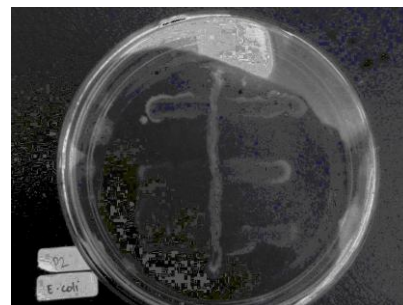
Kode isolat	Hasil uji	
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Hp1.1	-	-
Hp1.2	-	-
D2	+	+
H5	-	-
Hp1.3	-	-
H1	-	-
H1	-	-

Tabel 5 Hasil Uji Antagonis pada Media yang Sesuai

Kode isolat	Media isolasi	Hasil uji	
		<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Hp1.1	NA	-	-
Hp1.2	NA	-	-
D2	Pikovskaya	+	+
H5	YMA	-	-
Hp1.3	Pikovskaya	-	-
H1	Pikovskaya	-	-
H1	YMA	-	-



(a)



(b)

Gambar 1 Hasil Uji Antagonis Isolat D2 dengan *E. coli* dan *S. aureus* pada Media NA (a) dan Pikovskaya (b).

KESIMPULAN

Bakteri rhizosfer tahan asam berhasil diisolasi dari perakaran legum *Calliandra* sebanyak tujuh isolat. Berdasarkan hasil uji antagonis diperoleh satu isolat yang menghambat pertumbuhan *E. coli* dan *S. aureus* yaitu isolat D2 sehingga isolat D2 dapat berpotensi menjadi agen bikontrol untuk kedua bakteri tersebut.

DAFTAR PUSTAKA

- Hadioetomo RS. 1990. Mikrobiologi Dasar dalam Praktek. Jakarta: PT Gramedia.
- Islami T, Utomo WH. 1995. Hubungan Tanah, Air, dan Tanaman. Semarang: IKIP Semarang Pr.
- Kennedy IR. 2000. Acid Soil and Acid Rain. New York: J Wiley.
- Kloepper JW, McInroy JA, Bowen KL. 1992. Comparative identification by fatty acid analysis of soil, rhizosphere, and geosphere bacteria of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Soil* 139:85–90.
- Klopper J. 1993. Soil Microbial Ecology. New York: Dekker.
- [NRC] National Research Council. 1993. Sustainable Agriculture and the Environment in the Humid Tropics. Washington: National Academies Pr.
- Schroth G dan Sinclair FL, editor. 2003. Trees, Crops and Soil Fertility: Concepts and Research Methods. Cambridge: CABI.
- Soesanto L. 2008. Pengendalian Pengantar Hayati Penyakit Tanaman. Jakarta: PT. Rajagrafindo Persada.
- Sylvia DM, JJ Fuhrmann, PG Hartel, DA Zuberer. 1999. Principles and Application of Soil Microbiology. New Jersey: Pearson Education.
- Tan KH. 2008. Soils in the Humid Tropics and Monsoon Region of Indonesia. New York: CRC Pr.
- Tate RL. 2000. Soil Microbiology. New York: J Wiley.