Hayati, Desember 1994, hlm. 51-54
ISSN 0854-8587
Vol. 1, No. 2

Aktivitas Nitrogenase *Azospirillum* sp. dan Efektivitas Simbiotiknya dengan Jagung

IMAN RUSMANA* DAN D. DODIT HADIJAYA

Jurusan Biologi FMIPA IPB, Jalan Raya Pajajaran, Bogor 16144

Diterima 24 September 1994/Disetujui 7 November 1994

Nitrogenase Activity and Symbiotic Effectivness of *Azospirillum* sp. with Corn. Fifty out of four hundred and forty five isolates of *Azospirillum* from plant roots and rhizospheres of *Digitaria* sp., *Oryza sativa*, *Saccharum officinarum*, *Pennicetum purpureum*, and *Zea mays* that were selected randomly were tested for their ability to fix nitrogen on the bases of their Acetylene Reduction Activity (ARA). All isolates showed their capability to reduce acetylene, and each isolate had different ARA depending on its origin and hosts. Ten selected isolates with high ARA were inoculated to *Zea mays* to test their simbiotic effectivity measured on the bases of host plant development and its dry weight. Biomass produced by four isolates was higher than those of control. Furthermore, ARA did not correlate with simbiotic activity.

PENDAHULUAN

Azospirillum sp. diisolasi pertama kali dari permukaan akar rumput-rumputan makanan ternak dan beberapa tanaman serealia (Gamo, 1991). Selain pada *Gramineae*, *Azospirillum* sp. dapat juga diisolasi dari rizosfer non *Gramineae* (Gamo dan Ahn, 1991).

Azospirillum sp. terdapat di tanah sekitar akar, permukaan akar dan di dalam akar (Venkateswarlu dan Rao, 1983). Pertumbuhan *Azospirillum* sp. sangat baik pada medium yang mengandung asam malat, asam suksinat atau asam piruvat, dan cukup baik pada medium yang mengandung galaktosa dan asetat, sedangkan pada medium yang mengandung glukosa dan asam sitrat pertumbuhannya kurang baik (Okon *et al.*, 1976; Konde dan Mahendale, 1984).

Asosiasi antara *Azospirillum* sp. dengan tanaman diduga bersifat simbiosis karena *Azospirillum* sp. menggunakan senyawa malat sebagai sumber karbon untuk pertumbuhannya. Dugaan ini diperkuat dengan adanya aktivitas nitrogenase *Azospirillum* sp. yang tumbuh dalam kalus tebu (Berg *et al.*, 1980). Keadaan tersebut analog dengan Rhizobium sp. yang tumbuh pada kalus kedelai (Bednarski dan Reporter, 1978).

Azospirillum sp. menambat nitrogen pada kondisi mikroaerofil. Nitrogen yang ditambat tersebut akan diserap oleh tanaman dalam bentuk NO_3^- dan NH_4^+ (Rao, 1982). Selain mempunyai kemampuan untuk menambat N_2, *Azospirillum* sp. mampu menghasilkan zat pengatur tumbuh seperti IAA (*Indol Acetic Acid*), giberelin, auksin, serta senyawa yang menyerupai sitokinin (Venkateswarlu dan Rao, 1983).

Dari percobaan ini telah diperoleh beberapa isolat *Azospirillum* sp. dari rhizosfer dan akar beberapa tanaman, yang kemudian diuji aktivitas enzim nitrogenasenya dengan cara reduksi asetilena (Aktivitas Reduksi Asetilena = ARA). Selain itu juga diuji pengaruhnya terhadap pertumbuhan jagung (*Zea mays*). Isolat-isolat *Azospirillum* sp. tersebut dapat dipakai sebagai sumber plasma nutfah untuk penelitian selanjutnya.

BAHAN DAN METODE

Pengambilan Contoh. Contoh tanah diambil dari daerah rhizosfer beserta akar tanamannya. Contoh tanah tersebut dimasukkan ke dalam kantung-kantung plastik dan diberi label yang menyatakan nomor sandi contoh tanah yang memberikan keterangan mengenai lokasi dan waktu pengambilannya.

Isolasi *Azospirillum* sp. Metode isolasi yang dipakai yaitu metode penyuburan yang menggunakan medium semipadat Nfb (Nitrogen free bromthymol) (Dobereiner *et al.*, 1976). Beberapa potongan kecil akar (0.5-1.0 cm) dicuci menggunakan deterjen sampai bersih. Setelah potongan akar tersebut dibilas dengan air steril sebanyak tiga kali, diinokulasikan ke dalam medium semipadat Nfb. Untuk isolasi dari tanah, beberapa miligram contoh tanah diinokulasikan ke dalam medium semipadat Nfb. Setelah diinkubasi selama dua sampai empat hari pada suhu kamar (28-30°C), pembentukan *pellicel* di bawah permukaan medium diamati. Apabila pellicel terbentuk, biakan digoreskan dengan metode kuadran pada medium agar cawan Nfb yang mengandung ekstrak khamir, amonium klorida dan *congo red* (Okon *et al.*, 1977). Koloni yang tumbuh terpisah dan menunjukkan morfologi koloni yang berbeda diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000 kali. Koloni-koloni yang terdiri dari sel yang berbentuk spiral diinokulasikan ke dalam medium semipadat Nfb. Setelah diinkubasi, *pellicel* yang terbentuk diamati dan biakan disimpan pada medium agar miring.

Aktivitas Nitrogenase. Kemampuan isolat-isolat menambat N_2 diukur berdasarkan aktivitas nitrogenase dalam mereduksi asetilena (Barber *et al.*, 1976). Pengukuran ARA

*Penulis untuk korespondensi

dilakukan pada isolat berumur empat hari yang dibiakkan dalam medium semipadat Nfb. Udara yang ada di dalam kultur dibuang, kemudian asetilena dengan volume yang sama dengan volume udara yang dibuang diinjeksikan ke dalamnya. Setelah diinkubasi selama satu jam, reduksi asetilena diukur menggunakan alat Kromatografi Gas.

Pengujian Efektivitas Simbiotik. Pengujian efektivitas simbiotik dilakukan dengan cara menanam jagung pada pot-pot yang berisi tanah yang sudah disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama satu jam. Tanah yang digunakan adalah tanah jenis regosol. Pupuk P dan K diberikan pada setiap pot dengan dosis standar yang dianjurkan. Daerah perakaran diinokulasi dengan satu mililiter suspensi (10^7-10^8 sel/ml) isolat *Azospirillum* sp. Peubah yang diamati ialah tinggi dan berat kering tanaman pada umur lima minggu.

Sebagai kontrol digunakan jagung yang diberi perlakuan pupuk N dengan seperempat dosis standar dan tanpa diinokulasi biakan, serta perlakuan tanpa pupuk N dan tanpa diinokulasi biakan. Jagung yang digunakan ialah jagung hibrida Pioneer. Percobaan disusun menggunakan Rancangan Acak Lengkap dengan tiga ulangan. Setiap isolat bakteri dianggap sebagai satu macam perlakuan.

HASIL

Pengambilan Contoh dan Perolehan Isolat ***Azoprilillum*** **sp.**. Isolasi dilakukan dari 80 contoh dalam bentuk tanah rizosfer dan akar Gramineae, yaitu padi (*Oryza sativa*), jagung (*Zea mays*), tebu (*Saccharum officinarum*), *Digitaria* sp., dan rumput gajah (*Pennicetum purpureum*). Jumlah isolat *Azospirillum* sp. yang diperoleh sebanyak 445 isolat terdiri atas 243 isolat berasal dari tanah rizosfer dan 202 isolat dari akar (Tabel 1).

Tabel 1. Hasil Isolasi *Azospirillum* sp. dari Beberapa Daerah di Pulau Jawa

Propinsi	Kabupaten	Contoh Rizosfer /Akar	Jumlah Isolat	
			Tanah Rizosfer	Akar
Daerah Istimewa Yogyakarta (DIY)	Bantul	16	58	49
	Sleman	19	65	24
	Kulonprogo	7	25	29
		42	148	102
Jawa Tengah	Jepara	6	10	9
	Demak	5	7	8
		11	17	17
Jawa Barat	Bogor	16	43	47
	Sukabumi	8	26	27
		24	69	74
Jawa Timur	Nganjuk	1	3	3
	Jombang	1	3	3
	Mojokerto	1	3	3
		3	9	9
Jumlah		80	243	202

Pengukuran Aktivitas Nitrogenase. Sebanyak 50 isolat yang dipilih secara acak diukur aktivitas nitrogenasenya secara tidak langsung dengan metode Aktivitas Reduksi Asetilena (ARA). Nilai ARA yang diukur bervariasi dari 5.70 nmol C_2H_4/jam sampai 82.31 nmol C_2H_4/jam (Tabel 2).

Bila dikelompokkan berdasarkan jenis tanaman sumber isolatnya, nilai ARA rata-rata dari isolat asal tebu, padi, jagung, *Digitaria*, dan rumput gajah masing-masing ialah 36.64, 24.83, 17.16, 12.15, dan 12.14 nmol C_2H_4/jam (Tabel 3).

Efektivitas Simbiotik. Sepuluh isolat yang mempunyai nilai ARA tertinggi dipilih untuk diuji pengaruhnya terhadap pertumbuhan jagung. Kesepuluh isolat tersebut ialah T1, T2, T3, dan T4 (dari tebu), P1, P2, dan P3 (dari padi), dan J1, J2, dan J3 (dari jagung). Empat isolat yang berpengaruh terhadap berat kering akar yaitu isolat P1, P2, P3, dan J1. Dari empat isolat tersebut, tiga isolat berpengaruh terhadap berat kering tajuk yaitu isolat P1, P2, dan P3 (Tabel 4).

Tabel 2. Aktivitas Reduksi Asetilena Lima Puluh Isolat *Azospirillum* sp.

Sandi Isolat[a]	Aktivitas Reduksi Asetilena[b] (nmol C_2H_4/jam)	Sandi Isolat	Aktivitas Reduksi Asetilena[b] (nmol C_2H_4/jam)
T1	82.31	Rg1	14.00
P1	64.38	P6	13.73
T2	63.37	J13	13.64
P2	58.70	P7	13.51
T3	53.17	J14	13.43
P3	49.10	P8	13.42
J1	47.02	P9	13.06
T4	46.38	J15	13.03
T5	40.98	T8	13.01
T6	34.85	J16	12.70
P4	32.89	Ru2	12.38
J2	27.09	Ru3	12.35
J3	20.55	Rg2	12.35
P5	16.95	J17	12.27
J4	16.11	J18	10.27
J5	15.73	J19	10.15
T3	14.91	T9	10.09
J6	14.86	Rg3	10.06
J7	14.68	Ru4	9.17
R1	14.68	P10	9.16
J8	14.66	J20	8.28
J9'	14.23	T10	7.35
J10	14.22	P11	7.09
J11	14.16	P12	5.94
J12	14.06	J21	5.70

[a] T: tebu, P: padi, J: jagung, R: rumput gajah, Ru: rumput *Digitaria*

[b] per tabung reaksi berisi 10 ml biakan dalam medium Nfb yang berumur empat hari

Tabel 3. Hasil Uji Aktivitas Reduksi Asetilena Isolat *Azospirillum* sp. Berdasarkan Jenis Tanaman

Jenis Tanaman Asal Isolat	Jumlah Isolat	Aktivitas Reduksi Asetilena (nmol C_2H_4/tabung/jam)		
		Rata-rata	Minimum	Maksimum
Tebu	10	36.64	7.35	82.31
Padi	12	24.83	5.94	58.70
Jagung	21	17.16	5.70	47.02
Digitaria	4	12.15	9.17	14.68
Rumput gajah	3	12.14	10.06	14.00

Tabel 4. Nilai Rata-Rata Tinggi dan Berat Kering Jagung Umur Lima Minggu yang Diinokulasi dengan Sepuluh Isolat *Azospirillum* sp. Terpilih

Isolat	Tinggi Tanaman (cm)	Berat kering tanaman (g) Akar	Berat kering tanaman (g) Tajuk
P1	47.5 ab	3.12 ab	5.87 ab
P2	43.0 a	1.85 ab	4.03 ab
P3	40.0 a	2.30 ab	4.12 ab
J1	45.5 ab	1.85 ab	4.03 a
J2	29.0	1.33 a	2.91 a
J3	36.5 a	1.34	3.09 a
T1	33.0	1.37 a	2.69 a
T2	32.5	1.14 a	2.20
T3	40.5 a	1.42 a	3.57 a
T4	31.0	0.74 a	2.38
KN	39.0 a	1.11 a	2.88 a
KO	30.5	0.50	1.43

KN: kontrol dengan pupuk N, KO: kontrol tanpa pupuk N

Angka yang diikuti huruf a pada setiap kolom berbeda nyata dengan perlakuan KO berdasarkan uji BNT pada taraf 5%.

Angka yang diikuti huruf b pada setiap kolom berbeda nyata dengan perlakuan KN berdasarkan uji BNT pada taraf 5%.

PEMBAHASAN

Medium isolasi yang digunakan ialah medium semipadat Nfb dengan sumber karbon asam malat. Keadaan medium yang semipadat ini dapat membuat kondisi medium mikroaerofil sehingga dalam lingkungan tersebut *Azospirillum* sp. mampu menambat N_2. Pertumbuhan tersebut ditandai dengan terbentuknya pellicel di bawah permukaan medium (Okon *et al.*, 1977).

Azospirillum sp. dapat diisolasi dari tanah rizosfer dan akar. Menurut beberapa peneliti *Azospirillum* sp. termasuk bakteri diazotrof yang endorizosfer karena mampu menembus epidermis dan korteks akar dengan membentuk kapsul di dalamnya (Berg *et al.*, 1980; Reinhold *et al.*, 1986).

Kemampuan tiap-tiap isolat *Azospirillum* sp. dalam mereduksi asetilena (menambat N_2) berbeda-beda, bahkan isolat yang berasal dari satu tanaman dapat menunjukkan perbedaan. Sampai saat ini sudah diketahui tiga spesies *Azospirillum* berdasarkan sumber karbon yang digunakan untuk pertumbuhannya yaitu *Azospirillum lipoferum*, *A. brasilense*, dan *A. amazone*. *Azospirillum lipoferum* dapat menggunakan sumber karbon glukosa, sedangkan *A. brasilense* tidak dapat menggunakan sumber karbon glukosa (Konde dan Mahendale, 1984). Perbedaan penggunaan sumber karbon tersebut menyebabkan keberadaannya di alam sangat ditentukan oleh kondisi lingkungan. Oleh karena *Azospirillum* sp. banyak tumbuh di daerah rizosfer dan akar tanaman maka keberadaannya sangat ditentukan oleh eksudat akar tanaman yang berfungsi sebagai sumber makanan (Gafni *et al.*, 1986).

Eksudat akar tanaman banyak mengandung asam amino, karbohidrat dan senyawa lain yang dibutuhkan untuk pertumbuhan jasad renik. Jumlah dan kualitas eksudat sangat ditentukan oleh jenis tanaman, fase dan lingkungan pertumbuhannya. Kondisi lingkungan yang berbeda menunjukkan kemampuan isolat-isolat *Azospirillum* sp. untuk mereduksi asetilena yang berbeda pula. Myers dan Hubbel (1987) melaporkan bahwa eksudat akar secara kualitatif dan kuantitatif sangat mempengaruhi keberadaan *Azospirillum* sp.

Azospirillum sp. dikenal juga sebagai mikroorganisme diazotrof yang simbiotik, artinya *Azospirillum* sp. mampu menambat N_2 dan mengadakan asosiasi yang erat dengan tanaman inang tertentu. Dibandingkan dengan bakteri diazotrof nonsimbiotik yang lain, asosiasi *Azospirillum* lebih erat. *Azospirillum* sp. mampu tumbuh pada tanaman tebu dan membentuk struktur seperti kapsul yang mampu menambat N_2 (Berg *et al.*, 1980).

Azospirillum sp. menghasilkan hormon pertumbuhan (auksin, sitokinin, giberelin) yang dapat memacu pertumbuhan akar rambut (Gamo, 1991; Barbieri dan Galli, 1993). Terpacunya pertumbuhan akar rambut menyebabkan bertambahnya volume penyerapan akar sehingga hara yang diserap lebih banyak dibandingkan pada tanaman yang tidak berasosiasi dengan bakteri ini. Lin *et al.* (1983) melaporkan bahwa inokulasi A. brasilense Cd7 dan Sp7 pada jagung dan sorgum meningkatkan secara nyata penyerapan hara NO_3^-, K^+ dan $H_2PO_4^-$.

Hasil percobaan ini menunjukkan bahwa isolat-isolat *Azospirillum* sp. yang berasal dari inang yang berbeda memberikan pengaruh yang berbeda pada jagung. Isolat dari padi (P1, P2, dan P3) memberikan berat kering tanaman lebih tinggi bila dibandingkan isolat dari tebu (T1, T2, T3, dan T4), demikian juga bila dibandingkan dengan isolat yang berasal dari jagung (J1, J2 dan J3). Perbedaan berat kering ini diduga karena kecocokan isolat dengan tanaman inang (dalam hal ini jagung). Isolat-isolat *Azospirillum* sp. tertentu dapat hidup atau berasosiasi secara optimum pada galur tanaman tertentu (Kipe-Nolt *et al.*, 1985). Pada percobaan ini isolat yang berasal dari padi (P_1, P_2 dan P_3) lebih cocok pada jagung hibrida Pioneer, bila dibandingkan dengan isolat yang berasal dari jagung dan tebu. Isolat yang berasal dari jagung (J_1, J_2, dan J_3) meskipun mempunyai nilai ARA yang lebih kecil bila dibandingkan dengan isolat yang berasal dari tebu (T_1, T_2, T_3, dan T_4) memberikan berat kering yang lebih tinggi. Hal ini diduga karena galur yang berasal dari jagung lebih cocok bila dibandingkan dengan isolat yang berasal dari tebu, sehingga karena kecocokannya tersebut *Azospirillum* sp. dapat tumbuh lebih baik.

Untuk lebih mengetahui sifat fisiologi isolat *Azospirillum* sp. asal Indonesia disarankan untuk menelaah kemampuan menghasilkan hormon pertumbuhan dan menguji pengaruhnya terhadap pertumbuhan tanaman yang pada gilirannya dapat dimanfaatkan sebagai pupuk hayati.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Pimpinan Proyek Peningkatan Penelitian dan Pengabdian pada Masyarakat, Direktorat Pembinaan Penelitian dan Pengabdian pada Masyarakat, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Republik Indonesia yang telah memberikan dana penelitian ini. Ucapan terima kasih disampaikan pula kepada Ketua Lembaga Penelitian, Dekan FMIPA, dan Ketua Jurusan Biologi, Institut Pertanian Bogor yang telah memberi kepercayaan untuk pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

Barber, L.E., J.D. Tjepkema, S.A. Russel, and H.J. Evans. 1976. Acetylene Reduction (Nitrogen Fixation) Associated with Corn Inoculated with *Spirillum. Appl. Environ. Microbiol.* 32(1):108-113.

Barbieri, P. and E. Galli. 1993. Effect on Wheat Root Development of Inoculation with an *Azospirillum* brasilense Mutant with Altered Indole-3-Acetic Acid Production. *Res. Microbiol.* 144:69-75.

Bednarski, M.A. and M. Reporter. 1978. Expression of Rhizobial Nitrogenase: Influence of Plant Cell Conditioned Medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 36(1):115-120.

Berg, R.H., M.E. Tyler, N.J. Novick, V. Vasil, and I.K. Vasil. 1980. Biology of *Azospirillum*-Sugarcane Association: Enhancement of Nitrogenase Activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 39(3):642-649.

Dobereiner, J., I.E. Marriel, and M. Nery. 1976. Ecological Distribution of Spirillum lipoferum Beijerinck. *Can. J. Microbiol.* 22:1464-1473.

Gafni, R., Y. Okon, and Y. Kapulnik. 1986. Adsorption of *Azospirillum* brasilense to Corn Roots. *Soil. Biol. Biochem.* 8(1):69-75.

Gamo, T. 1991. *Azospirillum* spp. from Crop Roots: A Promoter of Plant Growth. *Jarq* 24(4):253-259.

Gamo, T. and S.B. Ahn. 1991. Growth-Promoting *Azospirillum* spp. Isolated from the Roots of Several Non-Gramineous Crops in Japan. *Soil Sci. Plant Nutr.* 37(3):455-461.

Kipe-Nolt, J.A., U.K. Avalaki, and P.J. Dart. 1985. Root Exudation of Sorghum and Utilization of Exudates by Nitrogen-Fixing Bacteria. *Soil Biol. Biochem.* 17(6):859-863.

Konde, B.K. and R.K. Mahendale. 1984. Utilization of Carbon and Nitrogenous Compounds by Diazotroph Fixing *Azospirillum* Strains. *Indian J. Microbiol.* 24(1):44-46.

Lin, W., Y. Okon, and R.W.F. Hardy. 1983. Enhanced Mineral Uptake by *Zea mays* and *Sorghum bicolor* Roots Inoculated with *Azospirillum brasilense. Appl. Environ. Microbiol.* 45(6):1775-1779.

Myers, M.L. and D.H. Hubbell. 1987. Plant Cell Wall Carbohydrates as Substrates for *Azospirillum* brasiliense. *Appl. Environ. Microbiol.* 53(12):2747-2748.

Okon, Y., S.L. Albrecht, and R.H. Burris. 1976. Factors Affecting Growth and Nitrogen Fixation of Spirillum lipoferum. *J. Bacteriol.* 127(3):1248-1254.

Okon, Y., S.L. Albrecht, and R.H. Burris. 1977. Methods for Growing *Spirillum lipoferum* and for Counting It in Pure Culture and in Association with Plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 33(1):85-88.

Rao, N.S.B. 1982. *Biofertilizers in Agriculture.* New Delhi: Mohan Primlani, Oxford and IBH Publishing Co.

Reinhold, B., T. Hurek, E.G. Niemann, and I. Fendrik. 1986. Close Association of *Azospirillum* and Diazotrophic Rods with Different Root Zones of Kallar Grass. *Appl. Environ. Microbiol.* 52(3):520-526.

Venkateswarlu, K and A.V. Rao. 1983. Response of Pearl millet to Inoculation with Different Straints of *Azospirillum* brasilense. *Plant Soil.* 74:379-387.