

KOMUNIKASI PENDEK

ISOLASI POPULASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI *Rhizobium* PADA TANAH ASAL TAMAN NASIONAL GUNUNG HALIMUN

[Isolation of population and characterization of *Rhizobium* bacteria in soil
from Gunung Halimun National Park, West Java]

Sri Purwaningsih

Balit Mikrobiologi, Puslit Biologi-LIPI

ABSTRACT

The studies on the **isolation of population** and characterization of *Rhizobium* bacteria have been carried out in soil samples from Gunung Halimun **National Park**, West Java. Soil samples taken from rhizospheres of rasamala (*Altingia exselsa*), pupsa (*Schima wallichii*) and kianak (*Castanopsis aciauhaassima*). Isolation was done in YEMA (Yeast Extract Mannitol Agar) medium, and the population done with MPN (Most **Probable Number**) method. The growth characteristic was observed by using YEMA medium mixed respectively with Brom Thymol Blue and Congo Red as indicators. The population of *Rhizobium* bacteria in YEMA medium was in the range of 0.28-35 CFU/g " soil x 10⁵. The **highest population** of *Rhizobium* bacteria was found from the samples collected from soil with rasamala (*Altingia excelsa*) as the host **plant** **Twent> four** isolates were isolated, including nine isolates may be grouped as slow growing, while fifteen isolates as fast growing.

Key words: *Rhizobium*, **isolafion, population**, characterization, YEMA medium, soil, Gunung Halimun National Park.

PENDAHULUAN

Taman Nasional Gunung Halimun (Gunung Halimun National Park) telah ditetapkan sebagai kawasan konservasi. Kawasan ini terletak pada ketinggian 500-1929 dpi. Lebarnya rentang ketinggian ini menyebabkan adanya keanekaragaman habitat dan vegetasi yang tinggi, termasuk populasi mikrobanya. Sejalan dengan tingginya keanekaragaman hayati tersebut, maka hal ini cukup menarik untuk diteliti dan diungkapkan, terutama keberadaan mikroba tanahnya.

Banyak faktor yang mempengaruhi tingkat kesuburan tanah, salah satunya adalah keanekaragaman mikroba tanah; semakin tinggi populasi mikroba tanah, menandakan semakin subur kondisi tanahnya. Allen dan Allen (1981) berpendapat bahwa disamping itu faktor iklim, suhu, nutrisi lingkungan dan faktor populasi ternyata juga menentukan tingkat kesuburan tanah.

Dari sekumpulan mikroba tanah yang ada didalam tanah yang mampu meningkatkan kesuburan tanah, salah satunya adalah bakteri *Rhizobium*.

Rhizobium merupakan bakteri yang mampu menambat nitrogen udara menjadi amonia (NH₃) yang akan diubah menjadi asam amino menjadi senyawa N yang akan digunakan oleh tanaman untuk tumbuh dan berkembang (Alexander, 1977). Selain itu bakteri tersebut mempunyai dampak positif baik langsung maupun tidak langsung terhadap sifat fisik dan kimia tanah, sehingga mampu meningkatkan kesuburan tanah (Sprent, 1976). Namun dalam kehidupannya bakteri tersebut sangat dipengaruhi oleh banyak faktor, yaitu faktor fisik, biologi dan kimia tanah, selain itu faktor kemasaman tanah dan lingkungan, seperti suhu, iklim juga sangat berpengaruh (Cadwell dan Weber, 1970).

Untuk mengetahui keberadaan dan manfaat bakteri *Rhizobium* maka perlu dilakukan inventarisasi keberadaan bakteri tersebut yang berpotensi sebagai pupuk hayati dari kawasan Taman Nasional Gunung Halimun dengan vegetasi yang berbeda.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keberadaan bakteri *Rhizobium*, mendapatkan isolat

murni, kemudian dikarakterisasi untuk diketahui sifat pertumbuhan dan potensinya.

BAHAN DAN CARA KERJA.

Pengambilan tanah

Sebanyak 0,5-1 kg tanah diambil pada kedalaman 0-15 cm secara random pada daerah perakaran tanaman, kemudian dimasukkan dalam polibag, dibawa ke Laboratorium. Sebanyak 20 sampel tanah diambil dari Taman Nasional Gunung Halimun, pada ketinggian 1100 dari permukaan laut, pada plot Suzuki I. Tanah diambil dari daerah perakaran tanaman rasamala (*Altingia exselsa*), puspa (*Schima wallichii*), dan kianak (*Castanopsis acuminatissima*), serta tanah yang tanpa tanaman sebagai pembanding.

Isolasi bakteri

Untuk mengisolasi bakteri *Rhizobium* yang berasal dari tanah dan ekosistem di sekitarnya dilakukan dengan metode pengenceran. Sebanyak 1 gram tanah dari masing-masing sampel tanah dimasukkan dalam 9 ml larutan garam fisiologis (NaCl 0,85%) dalam tabung reaksi, kemudian divortex, diperoleh seri pengenceran 10^* . Pengenceran dilanjutkan hingga diperoleh seri pengenceran 10^{10} - 10^{15} , kemudian dipipet 0,1 ml suspensi dari pengenceran 10^{10} - 10^{15} , dimasukkan dalam cawan petri yang telah berisi media YEMA (Yeast Extract Mannitol Agar) sebagai media dasar (Vincent, 1970). Komposisi media sebagai berikut: 0,5 g K_2HPO_4 , 0,2 g $MgSO_4$, 0,1 g NaCl, 3 g $CaCO_3$, 10 g Manitol, 3 g Yeast Extract, 20 g agar, aquadest 1 liter, pH 6,8, kemudian diratakan dengan spatula. Inkubasi dilakukan pada temperate kamar (27-28° C). Setiap hari diamati pertumbuhannya dan dihitung jumlah koloninya. Penghitungan jumlah koloni dilakukan dengan metode MPN (Most Probable Number). Pengamatan dilakukan sampai pada umur 12 hari.

Pemurnian dan karakterisasi

Bakteri yang telah didapat dimurnikan dengan cara koloni diambil dengan ose, dimasuk-

kan kedalam aquadest steril (5 ml) dalam tabung reaksi, kemudian divortex, dipipet 0,1 ml dimasukkan dalam petridish yang berisi media YEMA, diratakan dengan spatula, kemudian diinkubasikan pada suhu kamar; koloni yang tumbuh terpisah dengan baik dipilih dan ditanam pada media YEMA miring dalam tabung reaksi (sebagai kultur murni). Untuk karakterisasi isolat, yang sudah murni ditumbuhkan pada media selektif yang dibuat dengan cara memodifikasi media dasar (YEMA) dengan penambahan beberapa jenis pewarna sebagai indikator yaitu Brom Thymol Blue (BTB) untuk melihat kecepatan pertumbuhan dan Congo Red untuk menguji kemurnian isolat bakteri *Rhizobium* (Somasegaran, 1984), kemudian diamati pertumbuhan dan perubahan warnanya.

HASIL

Dengan metode pengenceran, berhasil diisolasi bakteri *Rhizobium* dari 20 sampel tanah dari bagian perakaran tanaman (rasamala, puspa dan kianak), dan tanah yang jauh dari daerah perakaran sebagai pembanding. Dari semua sampel tanah tersebut diperoleh isolat murni sebanyak 24 (Tabel 1). Dilihat dari masing-masing sampel yang diamati menunjukkan bahwa populasi tertinggi pada sampel tanah pada tanaman inang rasamala yaitu sebesar 35×10^5 CFU/gram tanah, kemudian diikuti oleh sampel pada tanaman inang kianak (19×10^5 CFU/gram tanah) dan tanaman inang puspa (19×10^8 CFU/gram tanah). Populasi yang paling rendah terdapat pada sampel yang tanpa tanaman inang (Tabel 1).

Tabel 2 menunjukkan bahwa 24 isolat yang didapat, setelah dilakukan karakterisasi dengan menggunakan media YEMA, menunjukkan bahwa 9 isolat pertumbuhannya kurang subur (ditandai +) dan 15 isolat pertumbuhannya subur (ditandai ++). Setelah diuji pada media YEMA+ Brom Thymol Blue menunjukkan bahwa 9 isolat termasuk tumbuh lambat (memberikan warna biru) dan 15 isolat lainnya termasuk tumbuh cepat (memberikan warna kuning).

PEMBAHASAN

Beberapa bakteri yang diisolasi dari tanah dengan menggunakan media YEMA diperoleh koloni yang berwarna putih, bulat dan cembung. Hal ini menunjukkan bahwa di daerah perakaran tanah tersebut ditemukan bakteri *Rhizobium*, yang ditandai dengan bentuk koloni yang bulat, cembung dan berwarna putih susu. Apabila diisolasi dengan menggunakan media YEMA yang ditambah Congo Red, koloni bakteri akan berwarna pink yang berarti tidak menyerap warna merah. Soekartadireja (1992) menyatakan bahwa ciri-ciri bakteri *Rhizobium* adalah bulat dengan permukaan seperti kubah atau kerucut, dan berwarna putih seperti susu atau jernih seperti air.

Dari semua sampel tanah yang telah dilakukan isolasi, sebagian besar (79%) diperoleh isolat *Rhizobium*. Selain itu, diperoleh hasil penghitungan populasi bakteri yang tinggi dari sampel tanah di perakaran tanaman (Tabel 1). Hal ini disebabkan karena tanaman melakukan metabolisme dan senyawa metabolit yang dilepaskan tanaman kedalam tanah melalui akar yang disebut eksudat. Eksudat tersebut akan dimanfaatkan oleh bakteri untuk kelangsungan hidupnya. Seperti yang dikatakan oleh Gibson (1981) bahwa aktivitas metabolisme dan senyawa metabolit yang dilepaskan oleh tanaman kedalam tanah melalui akar merupakan faktor yang sangat menentukan keadaan mikrobiologi tanah pada daerah sekitar perakaran tanaman. Sedangkan Waksman (1932) menambahkan bahwa eksudat terdiri dari senyawa-senyawa gula, asam amino, asam organik, glikosida, senyawa nukleotida dan basanya, enzim, vitamin dan senyawa indole yang merupakan hasil metabolisme yang dikeluarkan tanaman melalui akar sangat menentukan populasi jasad renik didalam tanah. Selain itu faktor kesuburan tanah, reaksi tanah (pH), ketersediaan energi dan sumber hara, serta kondisi fisik, kimia dan biologi lingkungan juga mempengaruhi populasi jasad renik tanah (Hoffman, 1914 dalam Waksman, 1932).

Tabel 2 menunjukkan bahwa isolat yang didapatkan dari 20 sampel tanah tersebut setelah dilakukan proses pemurnian hanya didapatkan 24 isolat murni. Hal ini disebabkan selain terjadi kontaminasi juga sedikit koloni yang tumbuh terpisah, sehingga diperlukan pemurnian berkali-kali. Dari uji karakterisasi dengan menggunakan media YEMA+Brom Thymol Blue (BTB) diperoleh 9 isolat dengan pertumbuhan yang kurang subur (ditandai +) dan 15 isolat menunjukkan pertumbuhan yang subur (ditandai ++). Karakterisasi dengan media YEMA+BTB menunjukkan pula bahwa 9 isolat memberikan reaksi berwarna biru yang berarti memberikan reaksi basa dan dikelompokkan dalam group tumbuh lambat (slow growing); dan 15 isolat lainnya berwarna kuning, yang berarti memberikan reaksi asam yang dapat dikelompokkan dalam group tumbuh cepat (fast growing). Pada media YEMA+Congo red menunjukkan bahwa 5 isolat berwarna merah yang diduga bukan *Rhizobium*, karena *Rhizobium* dalam media yang mengandung Congo Red tidak menyerap warna merah. Sembilan belas isolat lainnya berwarna pink yang menunjukkan *Rhizobium*, karena ciri-ciri *Rhizobium* tidak menyerap warna apabila tumbuh pada media YEMA yang mengandung Congo Red.

KESIMPULAN

Isolasi *Rhizobium* dapat dilakukan dengan menggunakan media YEMA yang ditambahkan pewarna indikator yaitu Brom Thymol Blue atau Congo Red. Populasi *Rhizobium* dipengaruhi pula oleh inangnya. Populasi tertinggi diperoleh dari sampel tanah dengan tanaman inang *Rasamala* (*Altingia exselsa*), kemudian diikuti *Puspa* (*Schima wallichii*) dan *Kiana* (*Castanopsis acuminatissima*).

Didapatkan 24 isolat *Rhizobium* murni, 9 isolat termasuk dalam kelompok tumbuh lambat dan 15 isolat lainnya termasuk dalam kelompok tumbuh cepat.

DAFTAR PUSTAKA

- Allen ON and EK Allen. 1981. The leguminosae. A source book of characteristics, uses and Modulation. The University of Wisconsin. Press. 812 p.
- Alexander M. 1977. Introduction to Soil Microbiology. John Wiley and Sons. New York. 467 p.
- Cadwell BE and DF Weber. 1970. Distribution of *Rhizobium japonicum*. Sero groups in Soybean *Rhizobium* Nodules as affected by planting bates. *Agron.J.* 62: 12-14.
- Soekartadiredja EM. 1992. Perubahan inefektivitas dan efektivitas penambatan nitrogen pada galur *Rhizobium* setelah perlakuan pasasi in vivo. Thesis. Univ. Padjadjaran. 321 h.
- Somasegaran. P and HJ. Hoben. 1984.** Methods in legume *Rhizobium* technology. University of Hawaii. NIFTAL. Project and Mircen. 387 P-
- Sprent. JL. 1976.** Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants. P.S.Nutman (Ed). Combridge. Univ. Press. 584 p
- Vincent. JM. 1970.** A manual for the practical study of the root nodule bacteria. International Biological Programme. London. Handbook. No 15. 164 p.
- Waeksman. SA. 1952.** Soil Microbiology. John Willey and Sons Inc. New York. London. 345 P-