

Isolasi dan Karakterisasi Bakteri *Rhizobium* asal Bintil Akar Tanaman Kacang Tanah (*Arachis hypogaea*) dan Koro Rawe (*Mucuna bracteata*)

Isolation and Characterization of Rhizobium Bacteria from Root Nodules of Peanut Plants (*Arachis hypogaea*) and Koro Rawe (*Mucuna bracteata*)

ERMA SURYANTI^{1*}, ALNOVARA YUAN NABILLA¹, MUHAMMAD EKA PRASTYA², DIAN ANGGRIA SARI¹

¹Prodi Biologi, Fakultas Sains, Institut Teknologi Sumatera, Jl. Terusan Ryacudu, Way Huwi, Lampung Selatan 35365, Indonesia

²Pusat Riset Bahan Baku Obat dan Obat Tradisional, BRIN, Kawasan Puspiptek, Serpong, Tangerang Selatan, Indonesia

Diterima 12 Juli 2024/Diterima dalam Bentuk Revisi 9 Oktober 2024/Disetujui 21 Oktober 2024

Nitrogen (N) is naturally available in the form of N₂. Nitrogen fixation can be facilitated by microbes such as *Rhizobium* bacteria, which can establish symbiosis with the roots of legume plants to form root nodules that perform nitrogen fixation. This study aims to determine the characteristics of *Rhizobium* bacteria in the root nodules of peanuts (*Arachis hypogaea*) and koro rawe (*Mucuna bracteata*). The methods used in this research include collecting root nodules, isolating *Rhizobium* bacteria, and identifying and characterizing these bacteria for their nitrogen fixation and phosphate solubilization capabilities. Characterization results on YEMA + Congo red media indicated that 10 out of 16 isolates from peanut root nodules and 30 out of 55 isolates from koro rawe root nodules were positive for *Rhizobium* bacteria. The nitrogen fixation activity test revealed that only 4 isolates from peanut root nodules and 6 from koro rawe root nodules exhibited nitrogen fixation ability in Jensen's medium. The highest phosphate solubilization index was obtained from isolate KK.5.1.1 (0.5±0.08), while the lowest was from isolate KK.5.2.2 (0.09±0.06). This research underscores the significance of *Rhizobium* in enhancing nitrogen availability and phosphate solubilization for legume plants.

Key words: *Rhizobium*, *Arachis hypogaea*, *Mucuna bracteata*, Nitrogen, Phosphate solubilization

PENDAHULUAN

Mikroba memiliki banyak manfaat bagi manusia, salah satunya dalam bidang pertanian. Beberapa mikroba seperti jamur, bakteri, dan alga memiliki kemampuan untuk menambat unsur hara nitrogen, fosfat, belerang, dan unsur hara lainnya untuk membantu meningkatkan kesuburan tanah dan memenuhi kebutuhan tanaman. Nitrogen merupakan unsur makro yang dibutuhkan oleh tanaman dan berperan penting dalam penyusunan protoplasma, molekul klorofil, asam nukleat, dan asam amino penyusun protein. Keberadaan nitrogen sangat melimpah di alam dalam bentuk N₂, akan tetapi tumbuhan tidak bisa memanfaatkan nitrogen dalam bentuk N₂ secara langsung, sehingga perlu dilakukan konversi terlebih dahulu supaya dapat digunakan oleh

tumbuhan (Sari dan Prayudyaningsih 2015). Fiksasi unsur nitrogen (N₂) menjadi bentuk ammonium (NH₄⁺) dan nitrat (NO₃⁻) dibantu oleh bakteri *Rhizobium* sp. (Widyastuti *et al.* 2010).

Bakteri *Rhizobium* sp. hidup di daerah perakaran tanaman. Pada saat kondisi nitrogen terbatas, bakteri *Rhizobium* akan membentuk simbiosis dengan tanaman Legum dengan membentuk nodul akar untuk memfiksasi nitrogen yang dibantu oleh enzim nitrogenase yang dapat mengubah nitrogen atmosfer menjadi amonia sehingga dapat dimanfaatkan oleh tumbuhan. Simbiosis yang terjadi antara bakteri dan tanaman Legum bersifat saling menuntungkan, bakteri membantu menyediakan nitrogen sedangkan tumbuhan akan menyediakan senyawa organik yang didapatkan dari hasil fotosintesis sebagai nutrisi bagi bakteri tersebut. Selain itu, simbiosis yang terjadi antara Legum dan *Rhizobium* bersifat selektif, satu strain *Rhizobium* hanya dapat menginfeksi spesies legum tertentu, contohnya *Rhizobium leguminosarum*

*Corresponding author:

E-mail: erma.suryanti@bi.itera.ac.id

membentuk nodul pada kacang polong (Sugiyarto 2011) dan *Rhizobium japonicum* yang bersimbiosis dengan kedelai (Hidayat 2010).

Selain memiliki kemampuan memfiksasi nitrogen, bakteri *Rhizobium* juga memiliki kemampuan melarutkan fosfat yang tidak larut sehingga dapat dimanfaatkan dalam bidang pertanian (Widawati 2015). Penggunaan bakteri *Rhizobium* dalam bidang pertanian memiliki beberapa keuntungan yakni dapat meningkatkan ketersediaan unsur hara nitrogen, tidak memiliki efek samping, harganya relatif lebih murah, teknologi penerapannya relatif lebih mudah dan lebih sederhana serta dapat mengurangi penggunaan pupuk sintesis sehingga dapat mengurangi pencemaran lingkungan dan mengurangi biaya produksi. Aplikasi bakteri *Rhizobium* juga dapat meningkatkan pertumbuhan dan produktivitas tanaman secara signifikan (Riziqiani *et al.* 2007). Seperti yang telah dijelaskan sebelumnya, bakteri *Rhizobium* memiliki peran dan manfaat yang sangat penting bagi tanaman serta dapat dimanfaatkan dalam bidang pertanian, maka diperlukan eksplorasi dan isolasi bakteri *Rhizobium* dari bintil akar tanaman Legum yakni kacang tanah (*Arachis hypogaea*) dan koro rawe (*Mucuna bracteata*) untuk mendapatkan isolat bakteri potensial dalam memfiksasi N_2 dan melarutkan fosfat.

BAHAN DAN METODE

Pengambilan Sampel Bintil Akar. Sampel bintil akar tanaman kacang tanah (*Arachis hypogaea*) diambil dari kebun yang ada di Jl. Pramuka Gg. Vanili, Bandar Lampung, sedangkan sampel bintil akar tanaman koro rawe (*Mucuna bracteata*) diambil dari Kebun Raya Institut Teknologi Sumatera, Lampung Selatan. Pada masing-masing tanaman dibuat lingkaran dengan radius 15 cm menggunakan sendok tanah hingga kedalaman 20 cm. Perlahan-lahan angkat akar tanaman, dibersihkan tanah yang menempel pada akar. Nodul dicuci dengan air mengalir hingga permukaan bintil akar bersih dari tanah yang masih menempel (Sari *et al.* 2018).

Isolasi Bakteri *Rhizobium*. Permukaan nodul yang telah dicuci disterilisasi menggunakan etanol 95% selama 1 menit, natrium hipoklorit 1,5% selama 4-6 menit, kemudian dibilas dengan air steril sebanyak 5 kali. Setelah disterilisasi, bintil akar dipotong menggunakan pisau. Nodul yang diambil untuk isolasi hanya bintil akar yang berwarna merah dibagian dalamnya. Menurut Sari *et al.* (2018), bintil yang aktif mengikat N_2 adalah bintil yang mengandung protein leghemoglobin berwarna merah muda sampai merah kecoklatan, sedangkan bintil yang tidak aktif memiliki ciri berwarna putih. Bintil akar yang telah dipilih ditetaskan dengan air steril kemudian

dihaluskan dengan mortar. Isolasi bakteri dilakukan dengan dua metode yakni isolat yang diperkaya dan isolat tanpa diperkaya. Metode pengayaan dilakukan pada media *Yeast Manitol Broth* (YMB). Sedangkan, metode tanpa pengayaan dilakukan pada media *Yeast Manitol Agar* (YEMA) (Prihastuti & Harsono 2012). Masing-masing sampel dilakukan pengenceran bertingkat dari 10^{-1} hingga 10^{-6} kemudian diambil 0,1 ml dari pengenceran 10^{-5} dan 10^{-6} untuk disebar ke dalam media YEMA dengan teknik spread plate kemudian diinkubasi pada suhu 35°C selama 48 jam (Sari *et al.* 2018).

Karakterisasi Bakteri. Karakterisasi bakteri dilakukan secara morfo-fisiologis. Pengamatan ciri morfologi seperti bentuk koloni, warna warna, elevasi, dan tepian. Sementara pengamatan ciri fisiologis melalui pewarnaan gram dan pertumbuhannya pada media YEMA + *Congo red* (CR). Isolat yang telah dikarakterisasi secara makroskopis dilakukan karakterisasi kembali menggunakan media YEMA + *Congo red* (CR). Bakteri diinokulasikan pada media YEMA + CR lalu diinkubasi pada suhu 35°C selama 3-7 hari. Pada media YEMA + CR jika terbentuk koloni berwarna merah jambu maka termasuk koloni *Rhizobium* (Dini *et al.* 2020).

Uji Kemampuan Fiksasi Nitrogen. Uji kemampuan fiksasi nitrogen dilakukan menggunakan media Jensen. Komposisi media Jensen terdiri dari sukrosa 20 g; dipotassium fosfat (K_2HPO_4) 1 g; magnesium sulfat ($MgSO_4$) 0,5 g; natrium klorida (NaCl) 0,5; besi sulfat ($FeSO_4$) 0,1 g; dan kalsium karbonat ($CaCO_3$) 2 g; agar 20 g dalam *aquades* 1 L (Shomi *et al.* 2021). Sebanyak 1 ose isolat bakteri diinokulasi ke dalam media Jensen, kemudian diinkubasi pada suhu 35°C selama 7-14 hari. Isolat bakteri yang tumbuh pada media Jensen menunjukkan bahwa bakteri tersebut memiliki aktivitas fiksasi nitrogen (N_2) di alam (Huslina dan Harahap 2019).

Uji Kemampuan Pelarut Fosfat. Uji Kemampuan pelarut fosfat dilakukan pada media Phikovskaya. Komposisi media Phikovskaya terdiri dari glukosa 10 g; $Ca(PO_4)_2$ 5 g; $(NH_4)_2SO_4$ 0,5 g; NaCl 0,2 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,002 g; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,002 g; agar 15 g dalam 1 L *aquades* (Rani *et al.* 2017). Sebanyak satu ose bakteri diambil dan diinokulasikan pada media Phikosvskaya kemudian diinkubasi pada suhu 25°C selama 7 hari dan diamati zona bening yang terbentuk pada cawan. Kemudian, diameter koloni dan diameter zona bening diukur untuk mengetahui indeks kelarutan fosfat oleh koloni mikroba. Indeks Pelarutan Fosfat (IPF) dihitung menggunakan persamaan berikut:

$$IPF = \frac{D. \text{Zona Bening} - D. \text{Koloni}}{D. \text{Koloni}}$$

Keterangan:

IPF : indeks pelarutan fosfat

D.Zona Bening : diameter zona bening yang terbentuk setelah inkubasi

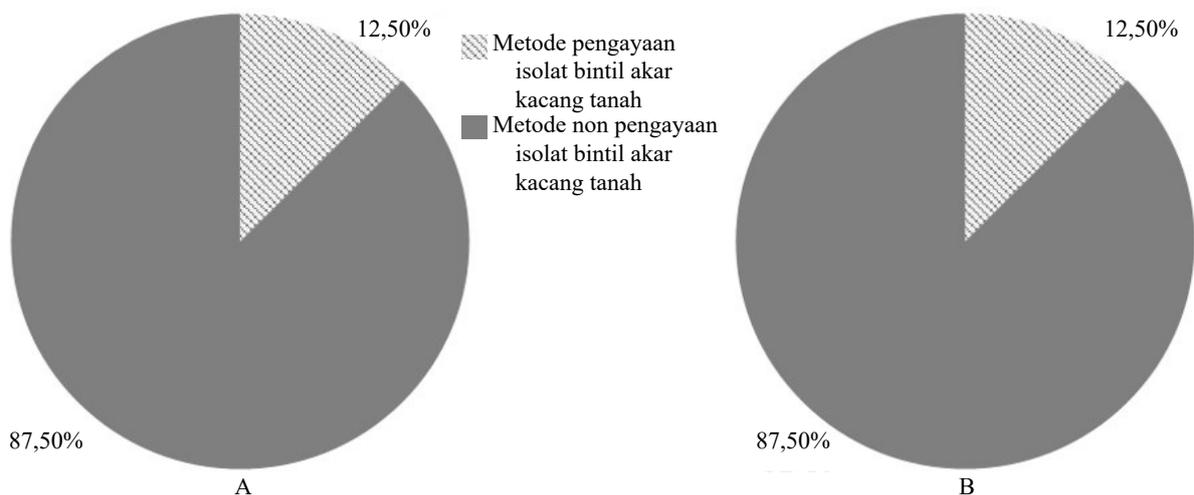
D.Koloni : diameter koloni yang terbentuk setelah inkubasi (Adriantama *et al.* 2021).

HASIL

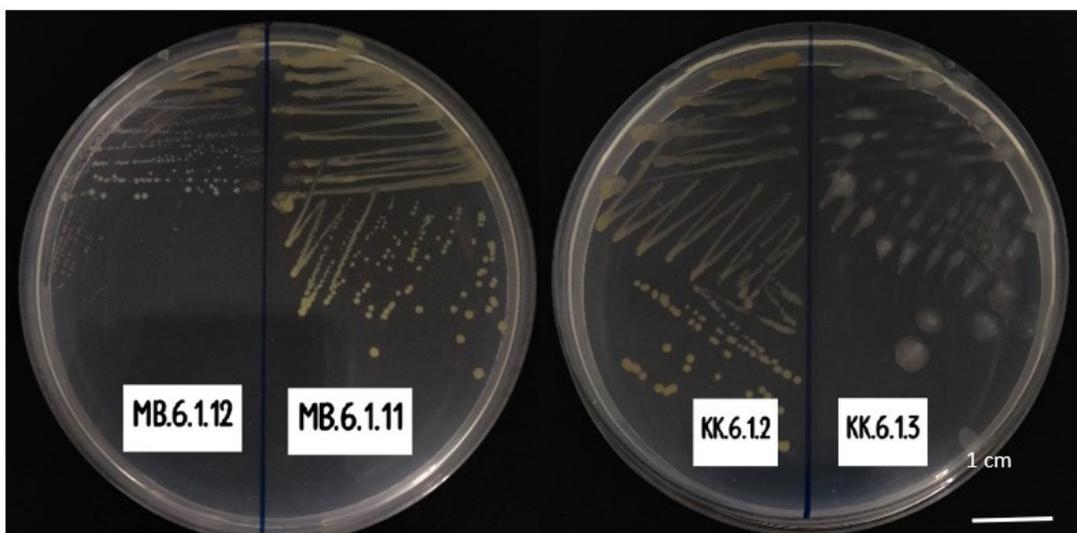
Isolasi dan Karakterisasi Morfologi. Isolasi bakteri endofit yang berasal dari bintil akar kacang tanah dan koro rawe dilakukan menggunakan media YEMA (*Yeast Extract Mannitol Agar*) sebagai media selektif pertumbuhan bakteri *Rhizobium*. Isolasi dilakukan dengan 2 media yaitu metode pengkayaan dengan media YMB terlebih dahulu dan non pengkayaan dengan media YEMA saja. Pengkayaan dengan media YMB bertujuan untuk

meningkatkan pertumbuhan bakteri pada bintil akar yang diisolasi. Hasil isolasi menunjukkan terjadi isolat bakteri endofit bintil akar yang ditargetkan *Rhizobium* sp.pada media pengayaan 12,50% pada kacang tanah dan 34,5% pada Koro rawe. Hal tersebut menunjukkan hasil isola yang non pengayaan pada bintil akar kacang tanah dan koro rawe. (Gambar 1).

Keseluruhan isolat yang telah diperoleh memiliki beberapa karakteristik seperti bentuk koloni, tepi koloni, elevasi koloni dan warna koloni yang beraneka ragam. Hasil isolasi bakteri pada penelitian ini menunjukkan bentuk koloni yang dimiliki isolat terdiri dari *circular*, *irregular*, *biconvex* dan *rhizoid*. Tepi koloni yang dimiliki isolat terdiri dari *entire*, *undulate*, *lobate*, serta *filamentous*. Elevasi koloni yang dimiliki isolat terdiri dari *raised* dan *flat*. Warna koloni yang dimiliki isolat terdiri dari warna putih bening, putih susu, putih kekuningan, merah muda, orange dan kuning (Gambar 2).



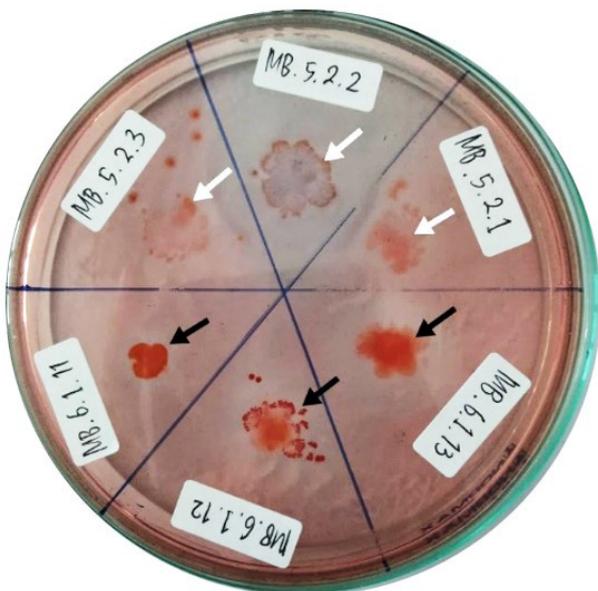
Gambar 1. Persentase jumlah bakteri endofit yang diperoleh dari bintil akar menggunakan metode pengayaan dan metode non pengayaan. Diagram A merupakan jumlah isolat yang diperoleh dari bintil akar kacang tanah (*A. hyogaea*) sedangkan diagram B merupakan jumlah isolat yang diperoleh dari bintil akar koro rawe (*M. bracteata*)



Gambar 2. Koloni bakteri *Rhizobium* pada media YEMA

Berdasarkan ciri morfologi koloni yang telah diperoleh, 71 isolat hasil isolasi belum bisa dipastikan apakah bakteri tersebut termasuk kelompok bakteri *Rhizobium* atau bukan, sehingga perlu dilakukan seleksi kembali menggunakan media YEMA + *congo red*. Koloni bakteri yang positif *Rhizobium* akan berwarna merah muda setelah ditetesi *congo red* (Gambar 3).

Kemampuan Fiksasi *Rhizobium* Asal Bintil Akar Kacang Tanah (*A. hypogaea*) dan Koro Rawe (*M. bracteata*). Sebanyak 40 isolat bakteri dari 71 isolat yang menunjukkan reaksi positif bakteri *Rhizobium* pada media YEMA + *congo red* dikarakterisasi kemampuannya dalam memfiksasi nitrogen pada media Jensen. Media Jensen merupakan



Gambar 3. Hasil seleksi isolat bakteri menggunakan media YEMA + *congo red* setelah 5 hari inkubasi. Tanda panah putih menunjukkan hasil positif *Rhizobium* sedangkan tanda panah hitam menunjukkan hasil negatif *Rhizobium*

media selektif untuk pertumbuhan bakteri pengikat nitrogen. Hasil uji fiksasi nitrogen menunjukkan beberapa isolat bakteri mampu tumbuh dengan membentuk koloni warna putih pada media Jensen, artinya isolat tersebut memiliki kemampuan untuk memfiksasi N₂ (Gambar 4).

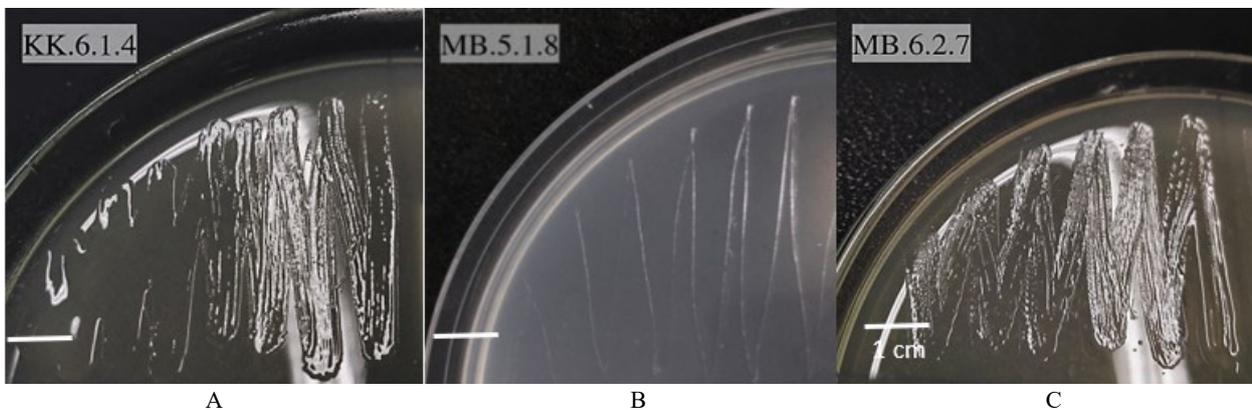
Hasil uji fiksasi N₂ menunjukkan sebanyak 4 isolat dari bintil akar kacang tanah dan 6 isolat dari koro rawe dapat tumbuh pada media Jensen yang menandakan bahwa 10 isolat tersebut memiliki kemampuan dalam fiksasi N₂ bebas (Tabel 1).

Kemampuan Bakteri *Rhizobium* dari Bintil Akar Kacang Tanah (*A. hypogaea*) dan Koro Rawe (*M. bracteata*) dalam Melarutkan Fosfat.

Secara kualitatif, aktivitas pelarut fosfat dapat diukur berdasarkan zona bening yang terbentuk pada media menggunakan rumus Indeks Pelarut Fosfat (IPF). Hasil uji pelarut fosfat menunjukkan sebanyak 7 dari 10 isolat yang terdiri dari 4 isolat bintil akar kacang tanah dan 3 isolat bintil akar koro rawe memiliki kemampuan melarutkan fosfat pada media Pikovskaya (Tabel 2). Isolat yang memiliki aktivitas pelarut fosfat ditandai dengan terbentuknya

Tabel 1. Hasil uji kemampuan isolat bakteri *Rhizobium* dari bintil akar kacang tanah (*A. hypogaea*) dan koro rawe (*M. bracteata*) dalam memfiksasi N₂ pada media Jensen

Kode isolat	Indikasi aktivitas fiksasi N ₂ secara kualitatif
KK.5.1.1	+
KK.5.1.2	+
KK.6.1.4	+
KK.5.2.2	+
MB.5.1.2	+
MB.5.1.11	+
MB.5.1.12	+
MB.6.2.5	+
MB.6.2.7	+
MBP.6.2.12	+



Gambar 4. Pertumbuhan isolat bakteri pada media Jensen pada hari ke-14 inkubasi. Isolat yang memiliki aktivitas N₂ ditandai dengan tanda panah warna putih. A dan C adalah isolat yang memiliki aktivitas N₂ sedangkan B adalah isolat yang tidak memiliki aktivitas N₂

zona bening disekitar koloni bakteri uji pada media (Gambar 5).

Sebanyak 7 isolat yang memiliki kemampuan melarutkan fosfat memiliki Indeks Pelarut Fosfat (IPF) yang berbeda-beda, semakin tinggi IPF maka semakin tinggi juga aktivitas pelarut fosfat yang dimiliki isolat bakteri. Isolat yang memiliki aktivitas tertinggi dalam melarutkan fosfat adalah isolat KK.5.1.1 sedangkan isolat yang memiliki aktivitas terendah dalam melarutkan fosfat adalah isolat KK.5.2.2, kedua isolat tersebut berasal dari bintil akar kacang tanah (Tabel 2).

Isolat potensial yang memiliki kemampuan fiksasi N_2 dan kemampuan pelarut fosfat dikarakterisasi secara makroskopis melalui pewarnaan Gram. Hasil

pengamatan secara mikroskopis menunjukkan bahwa 7 isolat potensial tergolong ke dalam bakteri Gram negatif dengan bentuk sel *streptococci*, *coccus* dan *basil* serta memiliki warna koloni putih susu dan putih bening (Tabel 3). Hal ini sesuai dengan (2005) yang melaporkan bahwa bakteri *Rhizobium* merupakan bakteri Gram negatif yang berbentuk batang (*basil*) dan bulat (*coccus*) dengan ciri koloni berwarna putih susu atau putih jernih.

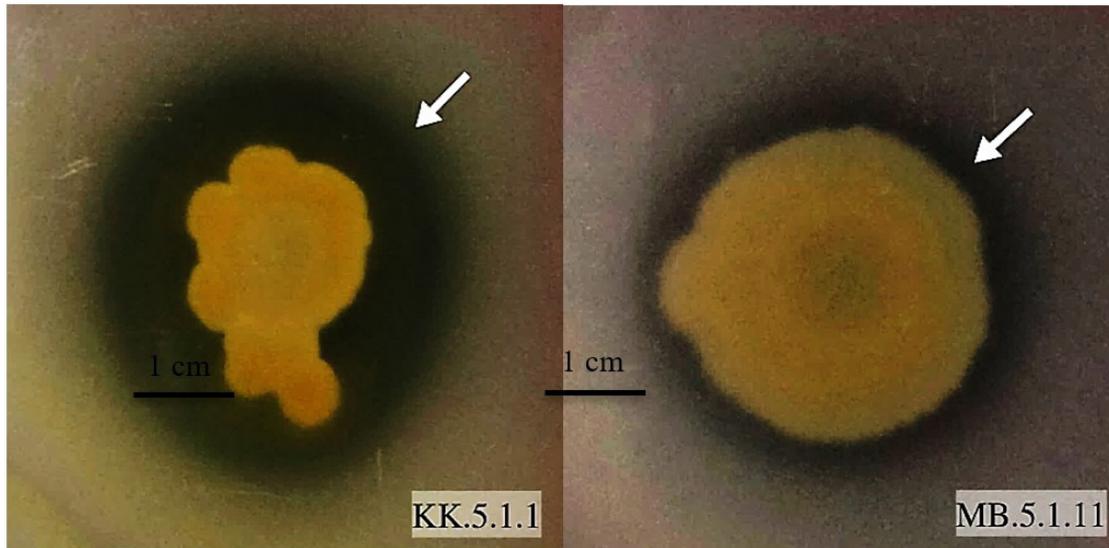
PEMBAHASAN

Bakteri *Rhizobium* merupakan bakteri yang hidup secara endofit di daerah perakaran tanaman kelompok Legum seperti alfafa (*Medicago sativa*), kelapa sawit

Tabel 2. Indeks pelarut fosfat bakteri *Rhizobium* dari bintil akar kacang tanah (*A. hypogaea*) dan koro rawe (*M. bracteata*) pada hari ke-7 inkubasi

Kode isolat	Diameter koloni (cm)	Diameter zona bening (cm)	Indeks pelarut fosfat	Aktivitas pelarut fosfat
KK.5.1.1	1,35	2,04	0,5±0,08	+
KK.5.1.2	1,59	1,88	0,18±0,09	+
KK.6.1.4	0,78	0,93	0,18±0,03	+
KK.5.2.2	2,09	2,23	0,09±0,06	+
MB.5.1.2	1,39	1,64	0,16±0,04	+
MB.5.1.11	1,66	1,86	0,12±0,03	+
MB.6.2.7	1,06	1,33	0,24±0,03	+

KK: isolat bintil akar kacang tanah, MB: isolat bintil akar *M. bracteata*, +: aktivitas pelarutan fosfat rendah (IP<2)



Gambar 5. Aktivitas pelarutan fosfat pada isolat bakteri yang ditandai dengan zona bening yang terbentuk pada media Phikovskaya setelah inkubasi hari ke-7

Tabel 3. Hasil uji pewarnaan gram pada isolat bakteri *Rhizobium* dari bintil akar kacang tanah (*A. hypogaea*) dan koro rawe (*M. bracteata*) yang memiliki kemampuan fiksasi N_2 dan aktivitas pelarutan fosfat

Kode isolat	Warna sel	Bentuk sel	Gram	Warna koloni
KK.5.1.1	Merah	<i>Streptococci</i>	Negatif	Putih susu
KK.5.1.2	Merah	<i>Coccus</i>	Negatif	Putih susu
KK.6.1.4	Merah	<i>Basil</i>	Negatif	Putih susu
KK.5.2.2	Merah	<i>Coccus</i>	Negatif	Putih bening
MB.5.1.2	Merah	<i>Coccobasil</i>	Negatif	Putih susu
MB.5.1.11	Merah	<i>Coccobasil</i>	Negatif	Putih susu
MB.6.2.7	Merah	<i>Coccobasil</i>	Negatif	Putih susu

(*Elaeis guineensis*), akasia (*Acacia crassicarpa*), putri malu (*Mimosa pudica*) dan kedelai (*Glycine max*) (Sari *et al.* 2018; Dini *et al.* 2020). Bakteri *Rhizobium* adalah bakteri yang hidup berdampingan dengan kacang-kacangan dengan membentuk binti akar di daerah perakaran. Simbiosis yang terjadi antara bakteri *Rhizobium* dan tanaman Legum termasuk ke dalam simbiosis mutualisme, bakteri memperoleh nutrisi berupa karbohidrat, air dan mineral dari hasil fotosintesis sedangkan tanaman akan mendapatkan hasil dari fiksasi N_2 dari bakteri *Rhizobium* (Marwan & Handayani 2019). Fiksasi N_2 yang dilakukan oleh bakteri *Rhizobium* terjadi akibat enzim nitrogenase yang mengkatalisis reduksi N_2 . Enzim ini tersusun atas dua komponen protein, yaitu protein Fe-Mo dan protein Fe-S. Enzim nitrogenase akan memutus ikatan rangkap tiga pada N_2 menjadi amonia (NH_3) yang dapat digunakan oleh tanaman (Adnyana 2012).

Penggunaan media YEMA sebagai media selektif dilakukan untuk mendapatkan bakteri *Rhizobium*. Media YEMA sebagai media isolasi bersifat selektif karena mengandung mannitol ($C_6H_{12}O_6$) sebagai sumber karbon dan yeast extract sebagai sumber nitrogen yang digunakan oleh bakteri penambat N_2 untuk pertumbuhannya, sehingga bakteri yang mampu tumbuh pada media YEMA menandakan bahwa bakteri tersebut merupakan kelompok bakteri pemfiksasi N_2 (Rohyani *et al.* 2014). Selain itu, isolasi bakteri dilakukan menggunakan dua metode yaitu metode tanpa pengkayaan menggunakan media YEMA dan metode pengkayaan menggunakan media cair YMB yang di shaker selama 24 jam sebelum dilakukan pengenceran. Metode pengkayaan bertujuan untuk mengisolasi mikroorganisme target yang ada di alam dan dirancang untuk membantu meningkatkan jumlah pertumbuhan mikroorganisme (Ainiyah 2014).

Berdasarkan hasil yang telah diperoleh, dapat diketahui bahwa isolat dengan metode pengkayaan menghasilkan lebih sedikit isolat dibandingkan dengan metode tanpa pengkayaan. Hal ini disebabkan karena metode pengkayaan akan menyeleksi bakteri golongan tertentu yang mampu tumbuh dengan cepat dan dapat memanfaatkan sumber nutrisi pada media dengan baik. Komposisi media pengayaan mengandung kalsium karbonat ($CaCO_3$) yang berperan untuk menstabilkan pH pada media (Pramudyanti *et al.* 2004), sehingga bakteri yang tumbuh ketika pengkayaan hanya bakteri yang mampu menyesuaikan kondisi pH dan sumber nutrisi yang terkandung dalam media. Bakteri yang mampu beradaptasi pada media pengkayaan akan tumbuh dominan dalam media, sedangkan bakteri yang tidak muncul ketika pengkayaan populasinya kalah dari bakteri yang dominan karena tidak mampu memanfaatkan nutrisi dan kondisi pertumbuhan yang ada dalam media. Hal ini diduga karena perbedaan

fisiologis tanaman serta senyawa organik yang disekresikan oleh masing-masing tanaman. Setiap tanaman memiliki kolonisasi bakteri yang berbeda di daerah perakarannya. Kolonisasi bakteri di daerah perakaran dipengaruhi oleh spesies tanaman, jumlah dan tipe perakaran, serta jumlah dan jenis senyawa organik (eksudat akar) yang dikeluarkan oleh tanaman, sehingga setiap tanaman akan memiliki kelimpahan bakteri yang berbeda-beda (Niswati *et al.* 2008).

Seluruh isolat yang diperoleh dari isolasi diseleksi pada media YEMA + *congo red* untuk memastikan apakah isolat bakteri yang didapatkan merupakan bakteri *Rhizobium* atau bakteri jenis lainnya. Penambahan *congo red* berfungsi sebagai indikator warna pada media). Hal ini juga didukung oleh penelitian yang dilakukan oleh Shetta *et al.* (2011) yang menyatakan bahwa semua isolat bakteri *Rhizobium* yang ditumbuhkan pada media yang mengandung *congo red* tidak mampu menyerap *congo red* sehingga koloni bakteri akan berwarna merah muda. Bakteri *Rhizobium* tidak mampu mengabsorpsi warna merah dari *congo red* pada media YEMA sehingga koloni yang termasuk kelompok bakteri *Rhizobium* akan berwarna merah jambu pada media tersebut (Prihastuti & Harsono 2012). Bakteri *Rhizobium* tergolong ke dalam bakteri Gram negatif. Bakteri Gram negatif memiliki tiga lapisan dinding sel yang terdiri dari lipopolisakarida, lipoprotein dan peptidoglikan sehingga ketika bakteri *Rhizobium* ditumbuhkan pada media YEMA + *congo red* bakteri tersebut sulit untuk menyerap zat *congo red* pada media (Putri & Kusdiyantini 2018).

Sebanyak 10 dari 40 isolat terduga *Rhizobium* sp. terkarakterisasi mampu mengikat N_2 bebas melalui seleksi pada media Jensen. Media Jensen tidak mengandung unsur nitrogen sehingga bakteri yang tumbuh pada media ini mengindikasikan bahwa bakteri tersebut mampu memfiksasi N_2 dari udara (Shomi *et al.* 2021). Media Jensen mengandung nutrisi seperti sukrosa, dipotassium fosfat (K_2HPO_4), magnesium sulfat ($MgSO_4$), sodium klorida ($NaCl$), ferrous sulfat ($FeSO_4$), sodium molibdat (Na_2MoO_4), dan kalsium karbonat ($CaCO_3$) yang dibutuhkan oleh bakteri pengikat nitrogen. Kandungan sukrosa pada media Jensen digunakan sebagai sumber energi, sodium molibdat berperan dalam meningkatkan aktivitas peningkatan nitrogen, dan sodium klorida yang berfungsi untuk mempertahankan keseimbangan tekanan osmotik media (Huslina & Harahap 2019).

Selain memiliki aktivitas fiksasi N_2 , bakteri *Rhizobium* memiliki kemampuan melarutkan fosfat (Silitonga *et al.* 2013). Seleksi bakteri pelarut fosfat menggunakan media Phikovskaya. Media Phikovskaya mengandung trikalsium fosfat ($Ca_3(PO_4)_2$) sebagai sumber fosfat yang tidak larut sehingga media menjadi

keruh dan memiliki partikel fosfat berwarna putih pada media (Octaviani 2011). Apabila bakteri mampu melarutkan fosfat maka akan terbentuk zona bening disekitar koloni bakteri tersebut. Zona bening yang terbentuk pada media disebabkan oleh kemampuan bakteri dalam melarutkan fosfat yang terikat pada unsur kalsium (Ginting *et al.* 2006). Selain itu, pelarutan fosfat terjadi akibat adanya enzim fosfatase yang dihasilkan oleh bakteri. Enzim fosfatase akan dihasilkan bakteri jika ketersediaan fosfat dalam media rendah. Enzim fosfatase tersebut berperan dalam menguraikan fosfat yang terikat pada senyawa organik menjadi bentuk anorganik yang dapat dikonsumsi oleh tanaman (Ginting *et al.* 2006).

Sebanyak 7 bakteri *Rhizobium* sp. yang memiliki aktivitas fiksasi nitrogen juga memiliki aktivitas pelarutan fosfat. Secara keseluruhan, indeks pelarut fosfat dari bakteri yang di uji tergolong rendah. Menurut Sudarmini *et al.* (2018) aktivitas pelarutan fosfat dapat diklasifikasikan menjadi tiga yakni aktivitas pelarutan rendah (*low solubilization*) ($IP < 2$), aktivitas pelarutan sedang (*average solubilization*) ($2 < IP < 3$) dan aktivitas pelarutan tinggi (*high solubilization*) ($IPF > 3$). Hal ini berbeda dari penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Novensah *et al.* (2015) yang melaporkan bahwa bakteri *Rhizobium* yang diisolasi dari kacang tanah memiliki indeks pelarutan fosfat sedang sebesar 2,4 dengan diameter koloni sebesar 5,0 dalam media. Menurut Octaviani (2011), adanya perbedaan indeks zona bening bakteri pada media Phikovskaya disebabkan oleh perbedaan kuantitas dan kualitas komponen asam organik yang disekresikan oleh masing-masing spesies bakteri. Selama pertumbuhan dalam media, setiap spesies bakteri memiliki perbedaan kemampuan genetik untuk menghasilkan jumlah dan variasi asam organik yang berperan dalam membentuk zona bening di sekitar koloni bakteri yang larut fosfat. Selain itu, satu spesies bakteri pelarut fosfat dapat menghasilkan beberapa jenis asam organik yang berbeda sehingga setiap bakteri memiliki kemampuan melarutkan fosfat yang berbeda-beda (Santosa 2007).

Sebanyak 40 isolat dari 71 isolat terkonfirmasi merupakan kelompok bakteri *Rhizobium* karena mampu tumbuh di media YEMA + *congo red* dan tergolong bakteri Gram negatif. Secara kualitatif, 7 dari 40 dinyatakan isolat potensial bakteri *Rhizobium* karena memiliki kemampuan fiksasi N_2 dan memiliki kemampuan melarutkan fosfat. Isolat yang memiliki aktivitas pelarutan fosfat tertinggi diperoleh dari KK.5.1.1 sedangkan isolat yang memiliki aktivitas pelarutan fosfat terendah diperoleh dari KK.5.2.2, kedua isolat tersebut berasal dari bintil akar kacang tanah. Isolat potensial tersebut dapat dimanfaatkan dan diaplikasikan pada bidang pertanian sebagai

alternatif pengganti pupuk anorganik. Penelitian mengenai pemanfaatan bakteri *Rhizobium* sebagai biofertilizer bagi tanaman telah banyak dilaporkan, seperti penelitian yang telah dilakukan oleh Suharjo (2001) yang melaporkan bahwa penggunaan bakteri *R. japonicum* ke dalam tanah mampu meningkatkan berat biji kedelai, berat kering tanaman kedelai dan membantu pembentukan bintil akar efektif sehingga tanaman memperoleh hasil fiksasi N_2 dari bakteri *Rhizobium*. Selain itu, pemberian biofertilizer bakteri *Rhizobium* spesies campuran (*R. japonicum*, *R. phaseoli* dan *R. leguminosarum*) dapat meningkatkan biomassa tanaman, meningkatkan pembentukan bintil akar, dan meningkatkan produksi berat kering tanaman kedelai (Surtiningsih *et al.* 2009).

DAFTAR PUSTAKA

- Adnyana GM. 2012. Mekanisme penambatan nitrogen udara oleh bakteri *Rhizobium* menginspirasi perkembangan teknologi pemupukan organik yang ramah lingkungan. *Argotop* 2:145-149.
- Adriantama, Suriyanti, Nontji M. 2021. Isolasi dan identifikasi morfologi serta uji pelarutan fosfat terhadap bakteri *Rhizosfer* tanaman kedelai (*Glycine max* L.). *Jurnal AgrotekMas* 2:24-32. <https://doi.org/10.33096/agrotekmas.v2i1.140>
- Ainiyah DN. 2014. Bakteri tanah sampah pendegradasi plastik dalam kolom winogradsky [Skripsi]. Surabaya: Institut Teknologi Sepuluh Nopember.
- Dini IR, Wawan, Hapsah, Devi R. 2020. Eksplorasi dan karakterisasi bakteri *Rhizobium* asal tanaman *Mucuna bracteata* di tanah gambut. *J Agrotek* 12:1-12. <https://doi.org/10.33512/jur.agrotek.v12i1.8765>
- Ginting RCB, Saraswati R, Husen E. 2006. Mikroorganisme pelarut fosfat, pupuk organik dan pupuk hayati. Bogor: Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian Bogor.
- devHidayat M. 2010. Efektifitas pemupukan nitrogen dan multi isolat *Rhizobium* ILeTRYsoy 4 dalam berbagai formula terhadap pertumbuhan dan hasil kedelai di tanah masam ultisol [Skripsi]. Malang: Universitas Negeri Maulana Malik
- Huslina F, Harahap DA. 2019. Isolasi bakteri pengikat nitrogen dengan menggunakan media jensen. *Jurnal Agrotek* 6:91-97. <https://doi.org/10.31764/agrotek.v6i2.1238>
- Marwan P, Handayani EFB. 2019. Biological seed treatment dengan bakteri *Rhizobium* sp. untuk meningkatkan pertumbuhan dan hasil kacang tanah (*Arachis hypogaeae* L.). *Agrofood* 1:6-9.
- Niswati A, Yusnaini, Arif MAS. 2008. Populasi mikroba pelarut fosfat dan p-tersedia pada rhizosfer beberapa umur dan jarak dari pusat perakaran Jagung (*Zea mays* L.). *Jurnal Tanah Tropis* 13:123-130.
- Novensah A, Setyawati TC, Mudjiharti A. 2015. Uji kemampuan pelarutan p dari beberapa isolat *Rhizobium* sp serta uji kesesuaian media. *Berkala Ilmiah Pertanian* 4:12-16.
- Octaviani ND. 2011. Eksplorasi Bakteri Pelarut Fosfat pada Tanah di Kawasan Mangrove Wonorejo, Surabaya [Skripsi]. Surabaya, Indonesia: Universitas Airlangga.
- Putri ALO, Kusdiyantini E. 2018. Isolasi dan identifikasi bakteri asam laktat dari pangan fermentasi berbasis ikan (inasua) yang diperjualbelikan di Maluku-Indonesia. *Jurnal Biologi Tropika* 1:6-12. <https://doi.org/10.14710/jbt.1.2.6-12>
- Pramudyanti IR, Purwoko T, Pangastuti, A. 2004. Pengaruh pengaturan pH dengan *caco3* terhadap produksi asam laktat dari glukosa oleh *Rhizopus oryzae*. *Bioteknologi* 1:9-24. <https://doi.org/10.13057/biotek/c010104>
- Prihastuti, Harsono A. 2012. Kemunduran kualitas pupuk hayati *Rhizobium*. *Jurnal Sains & Matematika* 1:1-5.
- Rani IM, Lestari RL, Rahmayani DE, Asan M, Astriani M. 2017. Uji bakteri pelarut fosfat dan penghasil iaa pada mol buah Bintaro (*Cerbera manghas* L.). *Jurnal Florea* 4:11-17. <https://doi.org/10.25273/florea.v4i2.1752>

- Rizqiani NF, Amvarwati E, Yuwono, NW. 2007. Pengaruh dosis dan frekuensi pemberian pupuk organik cair terhadap pertumbuhan dan hasil Buncis (*Phaseolus vulgaris*) dataran rendah. *Jurnal Ilmu Tanah dan Lingkungan* 7:11-23.
- Rohyani, Zul D, Fibrianti BL. 2014. Isolasi bakteri indigenus yang potensial sebagai agen biofertilizer asal tanah gambut di kawasan zamrud dan tanaman nasional tesso nilo, Riau. *JOM FMIPA* 1:417-425.
- Santosa E. 2007. Mikroba Pelarut Fosfat (Metode Analisis Biologi Tanah). Balai Besar dan Pengembangan Sumberdaya Lahan. Bogor: Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Departemen Pertanian.
- Sari R, Prayudyaningsih R. 2015. *Rhizobium*: pemanfaatannya sebagai bakteri penambat nitrogen. *Jurnal Eboni* 12, 51-64.
- Sari E, Flation AN, Sari ZI, Sulaeman E. 2018. Isolasi dan karakterisasi *Rhizobium* dari *Glycine max* L. dan *Mimosa pudica* Linn. *Ekotonia* 3:55-62. <https://doi.org/10.33019/ekotonia.v3i2.760>
- Shetta ND, Al-Shaharani TS, Abdel-Aal M. 2011. Identification and characterization of *Rhizobium* associated with woody legume trees grown under saudi arabia condition. *AEJAES* 10:410-418.
- Shomi FY, Uddin MB, Zerine T. 2021. Isolation and characterization of nitrogen-fixing bacteria from soil sample in Dhaka, Bangladesh. *Stam. J. Microbiol* 11:11-13. <https://doi.org/10.3329/sjm.v11i1.57145>
- Silitonga DM, Priyani N, Nurwahyuni I. 2013. Isolasi dan uji potensi isolat bakteri pelarut fosfat dan bakteri penghasil hormon IAA (Indole Acetic Acid) terhadap pertumbuhan kedelai (*Glycine max* L.) pada tanah kuning. *Saintia Biologi* 1:35-41.
- Sugiyarto L. 2011. Faktor Nod Sebagai Sinyal Nodulasi Untuk Fiksasi N₂ Pada Tanaman Legum [Skripsi]. Yogyakarta, Indonesia: Universitas Negeri Yogyakarta.
- Surdarmini DP, Sudana IM, Sudiarta IP, Suastika G. 2018. Pemanfaatan bakteri pelarut fosfat penginduksi hormon IAA (Indole Acetic Acid) untuk peningkatan pertumbuhan kedelai (*Glycine max* L.). *J Agric Sci and Biotechnol* 7:1-5.
- Suharjo UKJ. 2001. Efektivitas nodulasi *Rhizobium japonicum* pada kedelai yang tumbuh di tanah sisa inokulasi dan tanah dengan inokulasi tambahan. *JIP* 3:21-28.
- Surtiningsih T, Farida, Nurhayati T. 2009. Biofertilisasi bakteri *Rhizobium* pada tanaman kedelai (*Glycine max* L. Merr). *Berkala Penelitian Hayati* 15:31-35. <https://doi.org/10.23869/bphjbr.15.1.20097>
- Widawati S. 2015. Isolasi dan aktivitas plant growth promoting Rhizobacteria (*Rhizobium*, *Azospitillum*, *Azotobacter*, *Pseudomonas*) dari tanah perkebunan karet, Lampung. *Berita Biologi* 14:77-88.
- Widyastuti H, Siswanto, Suharyanto. 2010. Karakterisasi dan isolasi beberapa isolat *Acetobacter* sp. untuk meningkatkan perkecambahan benih dan pertumbuhan tanaman. *Buletin Plasma Nutrafah* 16:160-67. <https://doi.org/10.21082/blpn.v16n2.2010.p160-167>