

ISOLASI DAN KARAKTERISASI *Rhizobium* DARI *Glycine max* L. DAN *Mimosa pudica* Linn.

Eka Sari^{1*}, Anggi Nico Flatian², Zulvia Intan Sari³, Eman Sulaeman³

¹Program Studi Biologi, Universitas Bangka Belitung, Bangka, Indonesia

*Corresponding author: ekasari090@gmail.com

²Pusat Aplikasi Isotop dan Radiasi BATAN, Jakarta Selatan, Indonesia

³Departemen Ilmu Tanah dan Sumberdaya Lahan, Institut Pertanian Bogor, Bogor, Indonesia

ABSTRACT

N availability in Indonesia is still relatively low. Various types of fertilization techniques are developed in order to reduce N losses, but the efficiency of N fertilizer use is not optimal. Therefore, biological N-belay technology is needed through *Rhizobium* inoculation to improve N fertilization in legume plants. This study aims to isolate and characterize *Rhizobium* bacteria from nodules formed in the roots of legume plants. The collection of *Glycine max* L. and *Mimosa pudica* Linn. root nodules is ashamed to be chosen from the pink root nodules. *Rhizobium* isolation using selective media of Yeast Extract Manitol Agar + congo red using the spread plate method. Characterization carried out, in the form of macroscopic observations, Gram staining, biochemical physiological tests, manufacturing growth curves and pathogenicity tests. The results of isolation from both plants obtained five types of *Rhizobium* isolates. The results of the characterization of isolates in both plants also showed the same thing, namely: bacteria have Echinulate shape when grown on sloping media, and when grown in cup media (large size, milky white, opaque (not penetrated by light, circular shape, convex elevation (convex), the surface is smooth shiny, the entire margin), including Gram negative bacteria, rod shaped, facultative anaerobic, motile, can degrade hydrogen peroxide, show positive oxidase, can ferment glucose and sucrose, grow well at pH 5 - pH 7, and not pathogenic to plants.

Keywords: *Glycine max*, *Mimosa pudica*, *Rhizobium*, root nodules

PENDAHULUAN

Penggunaan pupuk kimia makin meningkat setiap tahunnya. Konsumsi pupuk meningkat, pada tahun 1975-1980 dengan diimbangi peningkatan produksi pertumbuhan rata-rata 15,6%. Laju pertumbuhan produksi menurun pada tahun 1980-1985 (10,2%), 1985-1990 (3,9%), dan 1990-1996 (1,5%) (Simanungkalit, 2001). Hal ini mengindikasikan terjadinya penurunan efisiensi pemupukan, pemakaian pupuk dan pestisida secara terus menerus dan dalam jumlah besar, sehingga banyak tanah yang rusak akibat pencemaran bahan kimia (Saraswati & Sumorno, 2008).

Berbagai macam teknik pemupukan dikembangkan dalam rangka mengurangi kehilangan N, tetapi efisiensi penggunaan pupuk N belum optimal. Ketersediaan N di Indonesia masih tergolong rendah. Pupuk N buatan menggunakan gas alam sebagai bahan dasar mempunyai keterbatasan karena gas alam tidak dapat diperbarui. Oleh karena itu, diperlukan teknologi penambatan N secara hayati melalui inokulasi *Rhizobium* untuk mengefisienkan pemupukan N pada tanaman legum, misalnya kedelai.

Novriani (2011), menyatakan bahwa *Rhizobium* merupakan kelompok bakteri yang bisa menyediakan hara bagi tanaman kedelai. Kelompok bakteri ini mampu menginfeksi akar tanaman dan

membentuk bintil akar jika bersimbiosis dengan tanaman legum. Bintil akar bisa memfiksasi N₂ di atmosfer dan menyalurkannya sebagai unsur hara pada tanaman inang. *Rhizobium* juga bisa menghasilkan zat pengatur tumbuh tanaman, seperti auksin dan sitokinin.

Kemampuan *Rhizobium* dalam menambat N₂ dengan pembentukan bintil akar pada tanaman legum menjadi hal yang menarik untuk dipelajari. Isolasi, karakterisasi dan identifikasi *rhizobium* pada tanaman legum, khususnya kedelai (*Glycine max* L.) dan putri malu (*Mimosa pudica* Linn.) perlu dilakukan untuk mendukung kegiatan pembuatan pupuk hayati yang ramah lingkungan. Tujuan dari penelitian ini adalah mengisolasi dan mengarakterisasi bakteri *Rhizobium* dari nodula yang terbentuk pada perakaran tanaman legum (kedelai dan putrimalu).

METODE PENELITIAN

Pengambilan sampel

Pengambilan sampel di lapangan dilakukan pada dua lokasi dan waktu yang berbeda, yaitu sampel putri malu di kebun kacang tanah petani, Dramaga, Cikarawang, Bogor, sementara sampel kedelai di Kampung Kukupu 2 Kel. Cibadak, Tanah Sareal, Bogor Penelitian laboratorium dilaksanakan

di Laboratorium Bioteknologi Tanah dan Lingkungan, Dramaga, Bogor.

Koleksi Bintil Akar

Koleksi bintil akar dilakukan dengan cara mencabut akar tanaman secara hati-hati. Buat lingkaran pada tanaman dengan radius 15 cm dengan menggunakan sendok tanah. Lalu cabut tanaman dengan memasukkan sendok tanah dengan kedalaman 20 cm. Perlahan-lahan angkat akar tanaman, bersihkan tanah dari akar dengan tangan. Lalu pindahkan bintil akar ke dalam plastik dan simpan dalam kotak es sebelum diisolasi. Bintil akar diletakkan di atas saringan lalu dicuci dengan cara mengalirinya dengan air. Bintil akar segar dapat disimpan dalam lemari es semalam. Untuk penyimpanan yang lama, disarankan disimpan dalam tabung gelas kering. Bintil akar yang aktif menambat N₂ mengandung protein yang disebut leghaemoglobin, berwarna merah muda-merah, atau kecoklatan. Bintil akar yang tidak efektif kurang leghaemoglobin, berwarna putih (Saraswati *et al.*, 2007).

Isolasi *Rhizobium*

Isolasi dari bintil akar, yaitu diambil 10 bintil akar, dimasukkan ke dalam erlenmeyer 125 ml, dicuci permukaan bintil akar dengan 95% etanol selama 1 menit, lalu dipindahkan ke dalam petridish steril dan sterilisasi dengan sodium hipoklorit 1,5% atau hidrogen peroksida (H₂O₂) 3% dan kocok selama 4-6 menit, kemudian dibilas lima kali dengan air steril. Bintil akar yang telah dikeringkan ditetesi dengan air steril, lalu dihancurkan dengan menggunakan batang gelas dalam tabung reaksi, lalu diambil dengan ose suspensi bintil lalu digoreskan ke medium seleksi YMA agar yang mengandung merah kongo, kemudian diinkubasi pada suhu 28°C. Koloni yang terbentuk dari pertumbuhan suspensi bintil akar diamati meliputi bentuk, warna dan tekstur. Koloni pada subkultur yang terpisah (isolat) dipindahkan ke media agar miring, setelah *Rhizobium* tumbuh disimpan dalam suhu -10°C (kulkas). Semua perlakuan di atas dilakukan pada ruang steril (Heliati, 2003).

Karakterisasi

Langkah-langkah identifikasi bakteri, sebagai berikut: Pengamatan ciri morfologi koloni (Cappuccino & Sherman, 1987 dalam Mulya, 2008). Koloni yang tumbuh pada media cawan diamati bentuk, warna, elevasi, tepian, serta jenis pertumbuhan bakteri pada NA miring dan NB. Selain itu dilakukan pewarnaan Gram (Pelczar & Chan, 2006). Satu ose isolat bakteri berumur 24 jam diambil dari biakan agar miring dan diletakkan pada kaca objek secara aseptik, lalu difiksasi dengan melewati kaca objek di atas api. Kaca objek yang berisi isolat kemudian ditetesi dengan kristal violet selama 30 detik, lalu kaca objek dibilas dengan akuades. Kaca objek kemudian ditetesi dengan gram's iodine, lalu didiamkan selama 1 menit dan dibilas kembali dengan akuades. Kaca objek

ditetesi alkohol 70% sampai apusan tampak bersih dari kristal violet dan dibilas dengan akuades. Lalu kaca objek ditetesi dengan safranin, didiamkan selama 45 detik, dibilas kembali dengan akuades dan dikeringkan. Kaca objek diamati di bawah mikroskop dengan bantuan minyak imersi. Pengamatan ciri fisiologis (Cappuccino & Sherman, 1983; Collins & Lyne, 1985 dalam Nofiani & Gusrizal, 2004; Sunatmo 2009), meliputi: uji motilitas, uji fermentasi gula (glukosa dan sukrosa), uji katalase, uji kebutuhan oksigen, uji oksidase, uji ketahanan terhadap pH. Di samping itu, juga dilakukan pembuatan kurva pertumbuhan bakteri, uji patogenitas dan uji kemampuan pembentukan bintil akar

Kurva Pertumbuhan Bakteri

Langkah-langkah persiapan pengukuran kurva pertumbuhan, yaitu: Isolat sebanyak ± 1 ose diinokulasi ke dalam media LB ± 100 mL, kemudian di shaker tertus menerus hingga pengukuran terkahir. Hasil isolat yang telah di shaker, diambil ± 5 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian diukur absorbansi dengan spektrofotometer pada waktu T₀. Ulangi prosedur 2 untuk pengukuran T₁, T₂, T₃, dan seterusnya. Pengukuran dilakukan selama 26 jam, dengan interval waktu ± 2 jam setiap pengukurannya, setelah itu baru dibuat kurva pertumbuhannya.

Uji Patogenitas

Isolat bakteri 1 ose diinokulasikan pada erlenmeyer ± 20 mL media LB, kemudian di shaker ± 1 hari, hingga bakteri tumbuh di dalam media. Tembakau yang sudah siap, kemudian disuntikkan di bawah daun tersebut ± 1 mL dengan suntikan steril, kemudian amati selama 24-48 jam. Daun tanaman yang mengalami bercak-bercak berwarna kuning hingga nekrosis mengindikasikan bahwa isolat bakteri mempunyai sifat patogen terhadap tanaman.

Uji Kemampuan Pembentukan Bintil Akar

Isolat bakteri 1 ose diinokulasikan pada erlenmeyer sebanyak ± 50 mL media YEM, kemudian di shaker hingga bakterinya tumbuh yang diindikasikan dengan keruhnya media. Biji kedelai diredam dengan aquades steril ± 2 jam, kemudian ditumbuhkan di dalam cawan petri tertutup dengan kapas basah hingga berkecambah. Benih kedelai yang sudah berkecambah diredam dengan isolat bakteri yang sudah ditumbuhkan di dalam media YEM ± 5 ml selama ± 3 menit, kemudian masukkan satu kecambah kedelai ke dalam tabung reaksi besar berisi YEMA padat ± 20 mL, kemudian ditutup dan diletakkan di tempat yang ada cahaya, lalu diamati pertumbuhannya setiap hari dengan dibandingkan dengan kontrol pada media YEM tanpa isolat bakteri.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

Jumlah isolat bakteri yang didapatkan dari kedelai dan putri malu, masing-masing berjumlah

lima isolat. Karakteristik isolat-isolat dari kedelai dan putri malu baik dari pengamatan morfologi, seperti pertumbuhan pada agar miring pertumbuhan pada media cawan, serta uji fisiologi dan biokimianya. Hasil pengamatan Gram pada isolat-isolat dari dua tanaman adalah gram negatif dan berbentuk batang. Pertumbuhan bakteri pada agar miring pada semua isolat dari dua tanaman tersebut, adalah sama, yaitu echinulate. Semua isolat dari kedelai dan putri malu pada media cawan, yaitu ukuran besar, pigmentasi putih susu, karakteristik optik yaitu opaque, bentuknya adalah sirkular, elevasinya adalah convex, permukaannya adalah halus mengkilat, marginnya adalah entire. Hasil motilitas pada semua isolat dari kedelai dan putri malu yaitu positif. Uji katalase, uji oksidase dan fermentasi glukosa dan sukrosa pada

semua isolat di kedua tanaman adalah positif. Pada uji kebutuhan oksigen, semua isolat pada kedua tanaman termasuk jenis fakultatif anaerob. Rerata semua isolat dari kedua tanaman tersebut banyak tumbuh pada pH 5- pH 7 ((Tabel 1, Tabel 2). Pola kurva pertumbuhan pada isolat bakteri dari kedelai dan putri malu adalah sama, yaitu fase lag terjadi pada 2 jam pertama, fase eksponensial terjadi pada jam >2-20, fase stasioner pada jam >20-23 dan fase kematian pada jam >23-26 (Gambar 1 dan Gambar 2). Hasil uji patogenitas terhadap tanaman tembakau menunjukkan tidak adanya bercak-bercak nekrosis pada tanaman tersebut, dan hal ini berarti isolat-isolat bakteri tersebut tidak menyebabkan patogen terhadap tanaman tembakau (Gambar 3).

Tabel 1. Hasil isolasi dan karakterisasi isolat bakteri dari sampel tanaman kedelai (*Glycine max* L.)

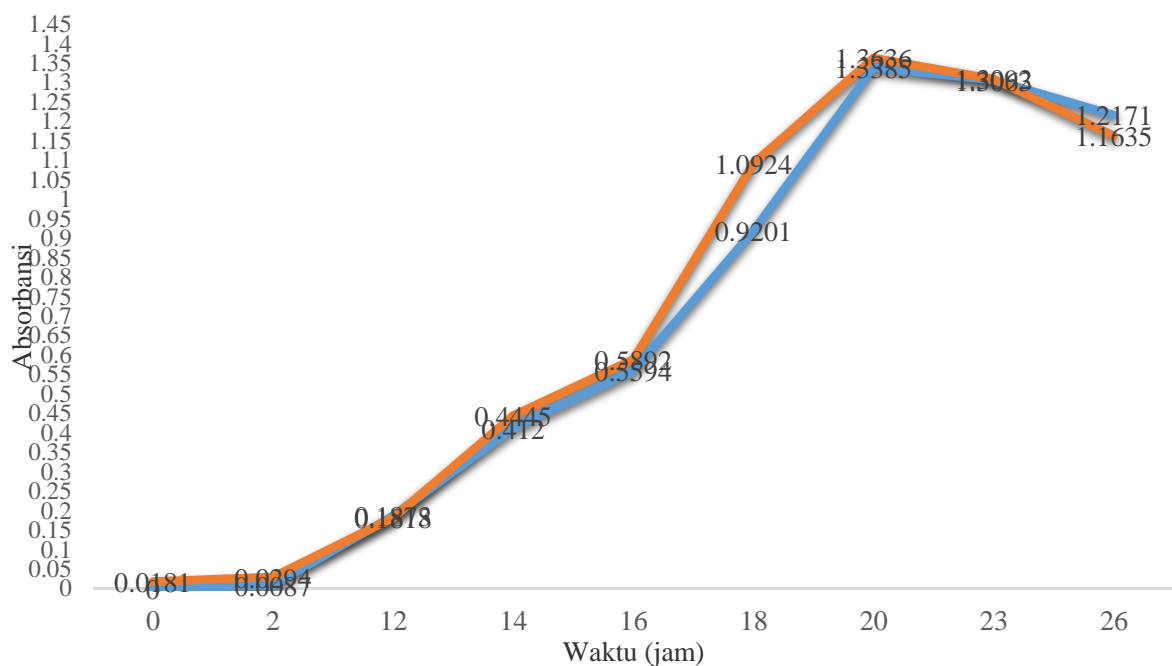
Karakteristik	Isolat Bakteri				
	KD 1	KD 2	KD 3	KD 4	KD 5
Pertumbuhan pada agar miring	Echinulate	Echinulate	Echinulate	Echinulate	Echinulate
Pertumbuhan pada media cawan					
a. Ukuran	Besar	Besar	Besar	Besar	Besar
b. Pigmentasi	Putih susu	Putih susu	Putih susu	Putih susu	Putih susu
c. Karakteristik optik	Opaque	Opaque	Opaque	Opaque	Opaque
d. Bentuk	Sirkular	Sirkular	Sirkular	Sirkular	Sirkular
e. Elevasi	Convex	Convex	Convex	Convex	Convex
f. Permukaan	HM	HM	HM	HM	HM
g. Margin	Entire	Entire	Entire	Entire	Entire
Kebutuhan oksigen	Fak. Anaerob	Fak. Anaerob	Fak. Anaerob	Fak. anaerob	Fak. Anaerob
Sifat Gram	Gram negatif	Gram negatif	Gram negatif	Gram negatif	Gram negatif
Bentuk sel	Batang	Batang	Batang	Batang	Batang
Uji Biokimia					
a. Motilitas	+	+	+	+	+
b. Katalase	+	+	+	+	+
c. Oksidase	+	+	+	+	+
d. Glukosa	+	+	+	+	+
e. Sukrosa	+	+	+	+	+
Ketahanan terhadap pH					
a. pH 3	+	+	+	+	+
b. pH 5	+	+	+	+	+
c. pH 6	+	+	+	+	+
d. pH 7	+	+	+	+	+
e. pH 9	+	+	+	+	+
Kelompok bakteri	<i>Rhizobium</i> sp.	<i>Rhizobium</i> sp.	<i>Rhizobium</i> sp.	<i>Rhizobium</i> sp.	<i>Rhizobium</i> sp.

Keterangan: KD= kedelai; HM= halus mengkilap Fak. Anaerob= fakultatif anaerob

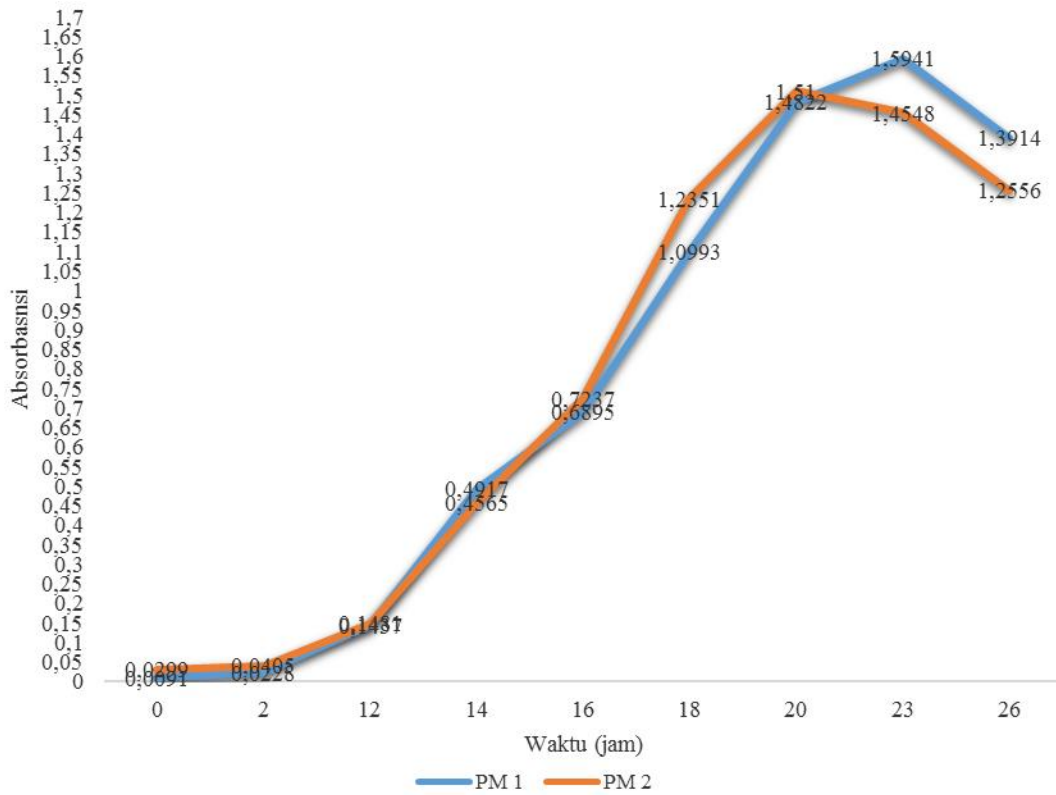
Tabel 2. Hasil Hasil isolasi dan karakterisasi isolat bakteri dari sampel tanaman putri malu (*Mimosa pudica* Linn.)

Karakteristik	Isoalat Bakteri				
	PM 1	PM 2	PM 3	PM 4	PM 5
Pertumbuhan pada agar miring	Echinulate	Echinulate	Echinulate	Echinulate	Echinulate
Pertumbuhan pada media cawan					
a. Ukuran	Kecil	Kecil	Kecil	Kecil	Kecil
b. Pigmentasi	Putih susu	Putih susu	Putih susu	Putih susu	Putih susu
c. Karakteristik optik	Opaque	Opaque	Opaque	Opaque	Opaque
d. Bentuk	Sirkular	Sirkular	Sirkular	Sirkular	Sirkular
e. Elevasi	Convex	Convex	Convex	Convex	Convex
f. Permukaan	HM	HM	HM	HM	HM
g. Margin	Entire	Entire	Entire	Entire	Entire
Kebutuhan oksigen	Fak. Anaerob	Fak. anaerob	Anaerob	Fak. anaerob	Fak. anaerob
Sifat Gram	Gram negatif	Gram negatif	Gram negatif	Gram negatif	Gram negatif
Bentuk sel	Batang	Batang	Batang	Batang	Batang
Uji Biokimia					
a. Motilitas	+	+	+	+	+
b. Katalase	+	+	+	+	+
c. Oksidase	+	+	+	+	+
d. Glukosa	+	+	+	+	+
e. Sukrosa	+	+	+	+	+
Ketahanan terhadap Ph					
f. pH 3	+	+	+	+	+
g. pH 5	+	+	+	+	+
h. pH 6	+	+	+	+	+
i. pH 7	+	+	+	+	+
j. pH 9	+	+	+	+	+
Kelompok bakteri	<i>Rhizobium</i> sp.	<i>Rhizobium</i> sp.	<i>Rhizobium</i> sp.	<i>Rhizobium</i> sp.	<i>Rhizobium</i> sp.

Keterangan: PM= putri malu; HM= halus mengkilap; Fak. Anaerob= fakultatif anaerob



Gambar 1. Kurva pertumbuhan isolat bakteri dari tanaman kedelai dengan dua ulangan selama 26 jam.



Gambar 2. Kurva pertumbuhan isolat bakteri dari tanaman putri malu dengan dua ulangan selama 26 jam.



Gambar 3. Hasil pengamatan uji patogenitas terhadap tanaman tembakau. A).tanaman tembakau secara keseluruhan; B). Bagian bawah daun tembakau yang telah disuntikkan dengan isolat *rhizobium*; C). hasil penyuntikan dengan isolat kedelai; D). hasil penyuntikan dengan isolat putri malu

Pembahasan

Isolasi *Rhizobium*

Isolasi *Rhizobium* dari kedelai dan putri malu menghasilkan masing-masing 5 isolat. Tanaman-tanaman tersebut dipilih karena termasuk ke dalam tanaman *Leguminosae*, yang mempunyai bintil akar, dikarenakan *Rhizobium* hidup di dalam bintil akar tanaman leguminosa, selain itu juga tanaman tersebut mudah di dapatkan di wilayah Bogor. Pada irisan melintang, bintil akar dari kedua jenis legum tersebut terlihat warna merah muda. Hal ini menunjukkan bahwa bintil akar dalam keadaan efektif. Sesuai dengan pendapat Buchanan dan Gibbans (1974, dalam Fuskhah *et al.* 2007), yang menyatakan bahwa bintil akar yang efektif berwarna merah muda, karena mengandung leghaemoglobin. Bintil akar yang efektif yaitu yang segar, tidak keriput dan tidak kering diambil untuk selanjutnya dilakukan sterilisasi dan isolasi. Bintil akar kedua tanaman tersebut disterilisasi dengan NaOCl 1,5%, alkohol, dan akuades adalah untuk membunuh kuman-kuman yang menempel pada bintil.

Karakterisasi *Rhizobium*

Berdasarkan pengamatan morfologi koloni pada permukaan agar miring dan media cawan, hasil isolat *Rhizobium* dari kedua tanaman tersebut menunjukkan hasil yang sama, yaitu: bakteri mempunyai bentuk echinulate ketika ditumbuhkan di media miring, dan ketika ditumbuhkan di media cawan (ukuran besar, berwarna putih susu, opaque (tidak bisa ditembus cahaya, bentuknya sirkular, elevasinya convex (cembung), permukaannya halus mengkilap, marginnya entire). Hal yang hampir serupa dilaporkan oleh Soekartadiredja (1992, dalam Purwaningsih, 2004), bahwa ciri-ciri bakteri *Rhizobium* adalah bulat dengan permukaan seperti kubah atau kerucut, dan berwarna putih seperti susu atau jernih seperti air, serta tidak menyerap warna merah. Pada media YEMA + *congo red* ada beberapa isolat berwarna merah muda, dan untuk yang berwarna merah kemungkinan bukan bakteri *Rhizobium*, karena bakteri tersebut menyerap warna merah dari media yang mengandung *congo red*, seperti telah disebutkan di atas bahwa ciri-ciri bakteri *Rhizobium* tidak menyerap warna merah pada media YEMA + *congo red*.

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa *Rhizobium* termasuk bakteri Gram negatif, karena ketika dilihat dibawah mikroskop dengan perbesaran 1000 kali selnya berwarna merah karena menyerap safranin dan selnya berbentuk batang. Hal yang serupa diungkapkan oleh Purwaningsih (2004) bahwa *Rhizobium* merupakan bakteri Gram negatif dan selnya berbentuk batang.

Semua isolat *Rhizobium* menunjukkan bakteri tersebut adalah motil. Hal ini senada dengan yang diungkapkan oleh Arsyad (2007), bahwa *Rhizobium* bersifat motil. Hal ini diperkirakan bahwa ada hubungannya dengan ketersediaan oksigen di dalam

media, karena berdasarkan pengamatan bakteri ini bisa tumbuh dengan baik jika tidak ada oksigen, tetapi juga dapat tumbuh secara aerob, dan diduga juga karena faktor ketersediaan hara di dalam media yang menyebar ke segala arah di dalam media, sehingga membuat bakteri mencari sumber karbon dan sumber energinya.

Berdasarkan data hasil pengamatan didapati bahwa isolat *Rhizobium* baik dari tanaman kedelai maupun putri malu ketika direaksikan dengan hidrogen peroksida sama-sama menghasilkan gelembung gas. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri tersebut memiliki enzim katalase. Hasil pengamatan juga menunjukkan bahwa *Rhizobium* tergolong fakultatif anaerob (tumbuh dengan baik jika tidak ada oksigen, tetapi juga dapat tumbuh secara aerob). Bakteri aerob dan fakultatif akan mengubah hidrogen peroksida menjadi oksigen dalam proses metabolismenya. Hal ini disebabkan oleh enzim katalase yang ada pada bakteri. Enzim katalase dapat menguraikan hidrogen peroksida yang bersifat racun bagi sel dan menghasilkan gas oksigen dan air sesuai reaksi (Pelczar & Chan, 2006). Selama respirasi aerobik (proses fosforilasi oksidatif), mikroorganisme menghasilkan hidrogen peroksida, bahkan ada yang menghasilkan superoksida yang sangat beracun. Senyawa ini dihasilkan oleh mikroorganisme aerobik, fakultatif aerob maupun mikroaerofilik yang menggunakan jalur respirasi aerobik. Hasil pengamatan uji oksidase yang dilakukan pada semua isolat *Rhizobium* menunjukkan hasil yang positif, yaitu terbentuknya warna biru kehitaman. Hal ini berarti *Rhizobium* memiliki enzim oksidase, karena berdasarkan pengamatan bakteri ini termasuk fakultatif anaerob, dan berdasarkan literatur di atas bahwa enzim oksidase juga dihasilkan oleh bakteri fakultatif anaerob.

Pada fermentasi, substrat seperti karbohidrat (glukosa dan sukrosa) dan alkohol akan mengalami disimilasi anaerobik dengan menghasilkan asam organik (asam laktat, format, asetat) yang diikuti gas hidrogen atau CO₂. Mikrob anaerob fakultatif biasanya pelaku fermentasi karbohidrat. Degradasi fermentasi dalam lingkungan anaerobik berlangsung dalam tabung reaksi berisi kaldu dan tabung Durham dengan posisi terbalik untuk menyimpan gas (Sunatmo, 2009). Hal ini sesuai dengan hasil pengamatan bahwa *Rhizobium* termasuk fakultatif anerob, sehingga bisa melakukan fermentasi terhadap glukosa maupun sukrosa. Hal ini terbukti dengan adanya gelembung gas pada semua tabung Durham.

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa *Rhizobium* dapat tumbuh dengan baik pada pH 5-7, namun suhu optimum pertumbuhannya yaitu pada pH 7 dan pertumbuhan paling rendah pada pH 3. Pada banyak spesies legume, proses nodulasinya terhambat pada tanah asam. Menurut Novriani (2011), pada kondisi demikian dapat dikatakan ketersediaan kalsium bertanggung jawab pada fenomena demikian ini. Dikatakan bahwa pada awal infeksi sangat

sensitif terhadap ketersediaan kalsium, sedang setelah mulai pertumbuhan nodule tidak dipengaruhi oleh menurunnya konsentrasi kalsium. pH tanah sangat berpengaruh terhadap pertumbuhan tanaman dan pemfiksasian N₂, dan pH tanah yang baik berkisar antara 6-7. Sunatmo (2009), juga menyatakan bahwa pH netral (pH 7) lebih baik bagi pertumbuhan bakteri). Tiap organisme mempunyai kemampuan tumbuh dalam kisaran pH yang spesifik dan kebutuhan pH yang spesifik ini menggambarkan kemampuan organisme beradaptasi pada lingkungan tersebut.

Kurva Pertumbuhan Bakteri

Purwoko (2009), menyatakan bahwa kurva pertumbuhan akan meliputi fase yang diawali dengan fase lag. Pada fase ini bakteri melakukan adaptasi terhadap lingkungan. Metabolisme seluler akan meningkat menghasilkan biosintesis makromolekul, enzim primer dan persiapan menuju fase berikutnya, meskipun dijumpai perbesaran sel, namun pembelahan sel belum berlangsung karena itu jumlah sel belum meningkat dengan nyata. Fase lag pada kurva pertumbuhan *Rhizobium* asal kedelai dan putri malu yaitu dari 0 – 2 jam.

Fase berikutnya adalah fase log atau eksponensial. Pada kondisi optimum. Nutrisi dan faktor fisik atau konstan serta cepat. Pertambahan jumlah terjadi secara eksponensial, yang berarti penggandaan jumlah mencapai maksimum untuk selang waktu tertentu. Panjangnya fase log tergantung jenis bakteri dan komposisi media. Umumnya dapat dicapai sekitar 6- 12 jam (Sunatmo, 2009). Fase eksponensial pada pengamatan sekitar 18 jam, yaitu >2-20. Hal ini diperkirakan karena *Rhizobium* tergolong bakteri yang lambat dalam pertumbuhannya, dan diduga juga karena media yang digunakan pada saat pengukuran ini menggunakan media LB bukan media YEM, sehingga pertumbuhannya lambat.

Fase stationer menggambarkan peningkatan jumlah sel sesuai dengan pengurangan jumlah sel atau sel mati. Tidak ada peningkatan jumlah sel bahkan jumlah sel mencapai maksimum untuk suatu periode waktu. Faktor penyebabnya adalah berkurangnya nutrisi untuk melangsungkan metabolisme esensial, akumulasi produk metabolisme yang mungkin bersifat asam atau basa yang toksik (Purwoko 2009; Sunatmo 2009). Hasil pengamatan menunjukkan bahwa fase stationer baik ada kurva pertumbuhan isolat *Rhizobium* asal kedelai maupun putri malu adalah sama, yakni terjadi selama 3 jam (>20 – 23 jam).

Menurut Purwoko (2009), fase berikutnya adalah fase kematian atau fase penurunan. Pada fase ini, sel bakteri yang resisten terhadap lingkungan dapat dijumpai dalam jumlah yang kecil. Fase kematian dari jam >23-26 menurut hasil pengamatan yang dilakukan.

Uji Patogenitas

Berdasarkan Permentan (2009), salah satu uji yang dapat dilakukan untuk mengetahui kualitas pupuk hayati, yaitu dengan uji patogenitas. Uji patogenitas pupuk hayati dilakukan terhadap tanaman tembakau yang dikenal sangat sensitif terhadap penyakit tanaman. Biakan bakteri 10⁷ disuntikkan ke bagian bawah daun tembakau (stomata) dengan menggunakan syringe tanpa jarum. Jika setelah 24 jam terjadi nekrosis, artinya patogenitas positif. Hasil uji patogenitas menunjukkan bahwa semua isolat yang diuji tidak mampu menimbulkan bercak nekrosis pada daun tembakau. Hal ini berarti bahwa isolat-isolat tersebut bukan merupakan patogen tumbuhan.

KESIMPULAN

1. Isolasi *Rhizobium* dengan memilih bintil akar dari tanaman kedelai dan putri malu (yaitu dengan bintil akar yang berwarna merah muda di dalamnya) didapatkan masing-masing lima isolat bakteri.
2. Hasil isolat *Rhizobium* dari tanaman kedelai dan putri malu menunjukkan karakteristik morfologi, fisiologi dan biokimia yang sama, yaitu: bakteri mempunyai bentuk echinulate ketika ditumbuhkan di media miring, dan ketika ditumbuhkan di media cawan (ukuran besar, berwarna putih susu, opaque (tidak bisa ditembus cahaya, bentuknya sirkular, elevasinya convex (cembung), permukaannya halus mengkilap, marginnya entire), termasuk bakteri gram negatif, berbentuk batang, fakultatif anaerob, motil, bisa mendegradasi hidrogen peroksida, menunjukkan oksidase positif, bisa melakukan fermentasi glukosa dan sukrosa, tumbuh baik pada pH 5 - pH 7, dan tidak patogen terhadap tanaman

DAFTAR PUSTAKA

- Fuskhah, E., Anwar, S., Purbajanti, E.D., Soetrisno, R.D., Budhi, S.P.S. dan Maas, A. 2007. Eksplorasi dan Seleksi Ketahanan *Rhizobium* Terhadap Salinitas Dan Kemampuan Berasosiasi dengan Leguminosa Pakan. *J.Indon.Trop.Anim.Agric.* 32 (3): 179-185.
- Nofiani R, Gusrizal. 2004. Bakteri Resistensi Merkuri Spectrum Sempit dari Daerah Eks Penambangan Emas Tanpa Izin (Peti) Mandor, Kalimantan Barat. *Jurnal Natur Indonesia* 6(2):67-74.
- Novriani. 2011. Peranan *Rhizobium* dalam Meningkatkan Ketersediaan Nitrogen bagi Tanaman Kedelai. *Agronobis.* 3 (5): 35 - 42
- Pelczar MJ, Chan ECS. 2006. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Jakarta : UI – Press.
- Permentan. 2009. *Peraturan Menteri Pertanian Republik Indonesia Nomor 28/Permentan/SR.130/5/2009 tentang Pupuk Organik, Pupuk Hayati dan Pembenh Tanah*

- Purwaningsih S. 2004. Isolasi, Enumerasi, dan Karakterisasi Bakteri *Rhizobium* dari Tanah Kebun Biologi Wamena, Papua. *Biodiversitas* 6(2): 82-84
- Purwoko TP. 2009. *Fisiologi Mikroba*. Jakarta: Bumi Aksara
- Saraswati R, Sumarsono. 2008. Pemanfaatan Mikroba Penyubur Tanah sebagai Komponen Teknologi Pertanian. *Iptek Tanaman Pangan*. 3(1): 41-58
- Simanungkalit. 2001. Aplikasi Pupuk Hayati dan Pupuk Kimia: Suatu Pendekatan Terpadu. *Buletin AgroBio*. 4(2): 56-61
- Sunatmo TJ. 2009. *Eksperimen Mikrobiologi dalam Laboratorium*. Bogor: Institut Pertanian Bogor
- Tim Lab Mikrob. 2008. *Panduan Praktikum Mikrobiologi Dasar*. Purwokerto: Universitas Jenderal Soedirman.