



IDENTIFIKASI BAKTERI PADA BINTIL AKAR AKTIF DAN TIDAK AKTIF SERTA RHIZOSFER KACANG TANAH

Arifah Nuha Imtiyaz¹, Bernadetta Octavia^{1*}

¹Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Yogyakarta

*corresponding author: b_octavia@uny.ac.id

Abstrak. Kemiskinan unsur hara N dalam tanah dapat diatasi dengan memanfaatkan kelompok mikroba tanah yang dapat berguna sebagai penyedia unsur hara pada tanah yang nantinya tersedia untuk tanaman. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui hasil isolasi bakteri, karakteristik fenotipik bakteri, serta perbedaan keanekaragaman bakteri dari bintil akar aktif dan tidak aktif serta rhizosfer tanaman kacang tanah (*Arachis hypogaea* L.). Penelitian ini di Laboratorium Mikrobiologi FMIPA UNY. Sampel bintil akar dan rhizosfer diambil di sawah, di Kabupaten Magelang, Jawa Tengah. Pengujian Karakteristik fenotipik meliputi karakterisasi morfologi koloni, morfologi sel, dan uji fisiologis (biokimia). Identifikasi bakteri dilakukan dengan metode *profile matching*, untuk mengetahui indeks similaritasnya dengan genera bakteri acuan. Diperoleh total 15 isolat yang merupakan bakteri gram positif dan negatif, berbetuk *coccus* maupun *bacil*, dengan konfigurasi *round*, margin *smooth*, elevasi *raised*, berwarna putih hingga putih kekuningan, dengan hasil uji fisiologis (biokimia) yang beragam. Setelah dilakukan proses identifikasi, diperoleh 2 genera bakteri yang ada pada bintil akar aktif yaitu *Azomonas* dan *Staphylococcus*, 3 genera bakteri yang ada pada bintil akar tidak aktif yaitu *Mesorhizobium*, *Azomonas*, dan *Bacillus*, serta 3 genera bakteri yang ada pada rhizosfer tanaman kacang tanah yaitu *Rhizobium*, *Pseudomonas*, dan *Neisseria*.

Kata Kunci: *Bintil akar, Rhizosfer, Kacang Tanah*

IDENTIFICATION OF BACTERIA IN ACTIVE AND INACTIVE ROOT NODULES AND RHIZOSPHERE OF PEANUT

Abstract. Deficiency of N nutrients in the soil can be covered by utilization of soil microbial groups which can be useful as a provider of nutrients in the soil which will later be available for plants. The purpose of this study was to determine the results of bacterial isolation, phenotypic characteristics of bacteria, and differences in bacterial diversity from active and inactive root nodules and peanut (*Arachis hypogaea* L.) rhizosphere. This research was conducted at the Microbiology Laboratory, FMIPA UNY. Root nodule and rhizosphere samples were taken from rice fields in Magelang Regency, Central Java. Phenotypic characteristics includes colony morphology and cell morphology characteristics, and physiological (biochemical) tests were observed. The identification of bacteria was carried out by using the profile matching method, to determine the index of similarity with the reference bacterial strain. Total 15 isolates were

obtained which were gram-positive and gram-negative bacteria in the form of coccus or bacilli, with round configurations, smooth margins, raised elevations, white to yellowish in color, with various physiological (biochemical) test results. 2 bacterial strains were obtained in active nodules identified as Azomonas and Staphylococcus, 3 bacterial strains present in inactive root nodules identified as Mesorhizobium, Azomonas, and Bacillus, and 3 bacterial strains present in the peanut rhizosphere identified as Rhizobium, Pseudomonas, and Neisseria.

Keywords: *Root nodules, Rhizosphere, Peanut*

PENDAHULUAN

Ketersediaan unsur hara dalam tanah merupakan faktor penting yang dapat mempengaruhi pertumbuhan tanaman. Unsur Nitrogen (N) termasuk dalam kelompok unsur hara makro yang dibutuhkan tanaman dalam jumlah banyak (Sugito, 2012 dalam Tando, 2018). Unsur hara N merupakan unsur hara utama penyusun klorofil. Tanaman yang kekurangan unsur hara N, daunnya akan menguning sehingga proses fotosintesis tidak maksimal (Nugroho, 2015). Kandungan N₂ pada atmosfer jumlahnya sekitar 79% dari total gas penyusun atmosfer (Khan et al., 2008). Namun bentuk N yang tersedia dalam tanah yang dapat dimanfaatkan langsung oleh tanaman yaitu dalam bentuk ion amonia (NH₄⁺) dan nitrat (NO₃⁻) (Simon *et al.*, 2014).

Salah satu upaya untuk menangani permasalahan tersebut dengan memanfaatkan kelompok mikroba tanah yang dapat berguna sebagai penyedia unsur hara dalam tanah sehingga nantinya tersedia untuk tanaman (Simanungkalit dkk, 2006 dalam Permatasari & Nurhidayati, 2014). Rhizobakteri adalah kelompok bakteri yang hidup di daerah perakaran (rhizosfer) (Rachmawati & Retnaningrum, 2013) dan merupakan bakteri penambat nitrogen yang memiliki kemampuan dalam meningkatkan ketersediaan N dalam tanah bagi tanaman. Rhizobakteri dapat hidup dengan bersimbiosis dengan akar tanaman (rhizobia) dan membentuk bintil akar, ataupun hidup mandiri dalam tanah (non simbiotik) (Aditya, 2009; Hema henpagam, 2011).

Kacang tanah (*Arachis hypogaea* L.) sebagai anggota famili Leguminosae memiliki kemampuan membentuk bintil akar dan menambat nitrogen udara melalui hubungan simbiosis dengan bakteri rhizobia. Kacang tanah dilaporkan memiliki kapasitas penambatan nitrogen tinggi (Suryantini, 2015). Menurut Boogerd dan van Rossum (2006) jumlah nitrogen yang diakumulasi oleh kacang tanah lebih tinggi dibanding legum tropis lainnya, yaitu potensi penambatan nitrogen pada kacang tanah sekitar 21–206 kg N/ha/tahun, tergantung pada varietas, efisiensi rhizobia, kondisi tanah dan iklim (Giller, 2001).

Penambatan nitrogen pada tanaman legum tergantung pada pembentukan bintil oleh rhizobia yang bersifat spesifik (Suryantini, 2015). Kecocokan antara bakteri dengan inang menghasilkan bintil yang efektif, ditandai dengan bagian dalam bintil berwarna pink atau merah (mengandung leghemoglobin). Inokulasi yang tidak cocok antara rhizobia dengan inang akan menghasilkan bintil yang tidak efektif, ditandai dengan bagian dalamnya terlihat berwarna hijau atau putih (tidak mengandung leghemoglobin) (Simon *et al.*, 2014) (Sari & Prayudyaningsih, 2017). Tanpa adanya massa bintil yang berisi genera rhizobia yang efektif menambat nitrogen, maka penambatan nitrogen tidak akan terjadi (Suryantini, 2015).

Melihat belum adanya penelitian mengenai perbedaan keanekaragaman bakteri yang ada pada bintil akar aktif dan tidak aktif serta rhizosfer tanaman kacang tanah (*Arachis hypogaea* L.) yang ditumbuhkan di Indonesia, sehingga informasi tersebut masih belum tersedia, maka hal ini yang menjadi dasar untuk perlunya dilakukan penelitian tersebut.

METODE

Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah kualitatif dengan metode deskriptif eksploratif.

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam UNY pada bulan Januari – Juni 2022.

Sampel Penelitian

Bintil akar dan tanah disekitar akar (rhizosfer) tanaman kacang tanah (*Arachis hypogaea* L.) diambil di sawah yang berlokasi di sebuah desa di Kabupaten Magelang, Jawa Tengah.

Alat dan Bahan Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *autoclave* (All American no. 25X), botol jam, erlenmeyer (Pyrex), gelas beker (Pyrex), gelas objek, inkubator (EYELA SU-600N), jarum ose dan ose kolong, *drigalsky*, kamera Hp (Samsung M21), *Show Case*, *Laminar Air Flow* (SHIMADZU), lampu spiritus, *magnetic stirrer* dan *hot plate*, mikropipet (SOCOREX), mikroskop, oven (UCHIDA IST-150D), cawan petri (Pyrex), pipet ukur, thermometer, *vortex*, tabung reaksi (Pyrex), *forcep*, timbangan analitik (AND HF-300), kertas payung, tisu gulung, kapas, kain kassa, kertas label, rak tabung reaksi, korek api, aluminium foil, pH stick, plastik, plastic wrap, dan optic lab.

Bahan-bahan yang dibutuhkan yaitu bintil akar aktif maupun tidak aktif dari tanaman kacang tanah (*Arachis hypogaea* L.), rhizosfer dari tanaman kacang tanah (*Arachis hypogaea* L.), media *Congo red-Yeast Extract mannitol Agar*, media *Nutrient Agar* (Merck), media *Nutrient Broth* (Merck), akuades, media *Sulfate Indol Motility* (Oxoid), media *Simmon's Citrate Agar* (Oxoid), media *Nutrient Gelatin* (Oxoid), *Malachite Green*, Gram A (Kristal Violet), Gram B (lugol), Gram C (Aseton alkohol 95%), Gram D (Safranin 2,5%), glukosa cair, sukrosa cair, laktosa cair, maltosa cair, 4% Sodium Hipoklorit, 3% Hidrogen Peroksida, HCl, NaOH, dan alkohol 70%.

Teknik Pengambilan Data

Uji Sterilisasi Permukaan Bintil Akar

Metode sterilisasi ini merupakan modifikasi metode sterilisasi Heliati (2003). Sterilisasi permukaan bintil akar diawali dengan mencuci bintil akar dengan air mengalir. Bintil akar kemudian direndam dalam sodium hipoklorit 4% kemudian direndam dalam alkohol 70% masing-masing selama 5 menit. Selanjutnya direndam dengan akuades steril masing-masing satu menit dengan akuades sebanyak 15 botol jam (akuades steril ke-15 tidak dibuang). Kemudian bintil akar ditiriskan dalam cawan petri steril. Uji efektivitas sterilisasi permukaan bintil akar dilakukan dengan menanam bintil akar pada media NB serta menanam air cucian ke-15 bekas sterilisasi permukaan bintil akar pada media CR-YEMA *plate* sebanyak 1000 µl dengan metode *spread plate*. Kemudian diinkubasi pada ruang gelap dengan suhu ruang (27°C) selama 24-48 jam. Jika permukaan bintil akar sudah steril maka tidak akan ada bakteri atau kapang yang tumbuh pada media.

Isolasi dan Purifikasi Bakteri Bintil Akar dan Rhizosfer

Isolasi bakteri bintil akar diawali dengan menyeleksi bintil akar aktif dan tidak aktif. Bintil akar yang aktif mengandung protein berpigmen leghemoglobin sehingga bagian dalam bintil menjadi berwarna merah. Bintil yang tidak aktif biasanya dalamnya berwarna hijau keabu-abuan atau coklat (Virtanen, 1947). Isolasi bakteri dilakukan dengan metode *streak plate* pada media CR-

YEMA *plate*. Bintil akar dipencet menggunakan pinset steril dalam cawan petri steril kemudian cairan bintil akar diinokulasikan pada media CR-YEMA *plate* dengan ose. Kemudian diinkubasi pada ruang gelap dengan suhu ruang (27°C) selama 4-5 hari. Bakteri yang tumbuh dan memiliki bentuk koloni yang berbeda kemudian dimurnikan pada NA miring. Kemudian diinkubasi pada ruang gelap dengan suhu ruang (27°C).

Isolasi bakteri rhizosfer tanaman kacang tanah dilakukan dengan metode *spread plate* pada media CR-YEMA *plate*. Sampel tanah sebanyak 1gram ditimbang menggunakan timbangan analitik kemudian dimasukkan ke dalam 9 ml akuades steril lalu kemudian divortex hingga homogen. Kemudian sebanyak 1000µl dari suspensi tersebut dimasukkan dalam akuades steril selanjutnya hingga mendapat pengenceran 10^{-7} . Pengenceran 10^{-3} - 10^{-7} diambil sebanyak 1000µl lalu diratakan pada media CR-YEMA *plate* menggunakan *drigalsky*. Kemudian diinkubasi pada ruang gelap dengan suhu ruang (27°C) selama 4-5 hari dan dilakukan pengecekan pertumbuhannya setiap satu hari sekali. Bakteri yang tumbuh dan memiliki bentuk koloni yang berbeda kemudian dimurnikan pada NA miring. Kemudian diinkubasi pada ruang gelap dengan suhu ruang (27°C).

Pengamatan Karakteristik Bakteri

Pengamatan morfologi koloni meliputi warna permukaan, konfigurasi/bentuk, margin/tepi, elevasi, dan ukuran koloni. Karakterisasi morfologi sel pada bakteri dilakukan melalui pewarnaan gram dan pewarnaan endospora. Pengecatan gram dilakukan dengan cara Hucker dan pengecatan endospora dengan metode Schaeffer-Fulton. Identifikasi fisiologi bakteri dilakukan dengan pengujian biokimiawi meliputi uji kebutuhan oksigen, hidrolisa gelatin, fermentasi karbohidrat, hidrolisa pati, katalase, penggunaan sitrat sebagai sumber karbon, produksi H₂S, produksi indol, motilitas, dan pengaruh suhu.

Teknik Pengumpulan Data

Data primer berupa data hasil karakteristik isolat bakteri bintil akar aktif dan tidak aktif serta rhizosfer tanaman kacang tanah (*Arachis hypogaea* L.). Data sekunder berupa informasi dari berbagai sumber yang relevan seperti buku, jurnal serta skripsi sebelumnya.

Teknik Analisis Data

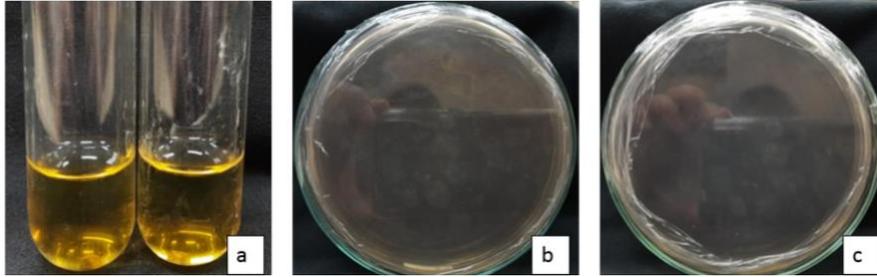
Identifikasi bakteri dilakukan dengan metode *profile matching* berdasar *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Data berupa hasil uji karakterisasi isolat bakteri serta data karakterisasi genera spesies acuan yang diperoleh dianalisis dan dibuat dendogramnya menggunakan aplikasi *Multi-Variate Statistical Package (MVSP)* 3.1. dengan uji *Cluster Analysis*. Indeks similaritas masing-masing isolat bakteri, digunakan koefisien *Simple Matching Coefficient (SSM)*. Pengelompokan ini dilakukan dengan algoritma *Unwight Pair Group Method (UPGMA)*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

Sterilisasi Permukaan Bintil Akar

Setelah diinkubasi selama 24-48 jam, media *Congo Red - Yeast Extract Mannitol Agar (CR-YEMA)* *plate* tidak ditumbuhi bakteri, begitu pula dengan media *Nutrient Broth (NB)* yang berisi bintil akar tetap jernih. Hal itu menandakan bahwa proses sterilisasi permukaan berhasil karena tidak adanya bakteri yang tumbuh. Hasil uji efektivitas sterilisasi bisa dilihat pada Gambar 1. a) merupakan hasil inokulasi bintil akar pada media NB, b) dan c) merupakan hasil inokulasi air cucian ke-15 pada media CR-YEMA.



Gambar 1. Hasil Uji Sterilisasi

Isolasi dan Purifikasi Bakteri Bintil Akar dan Rhizosfer

Media yang digunakan untuk proses isolasi adalah media *Yeast Extract Mannitol Agar* (YEMA) merupakan media selektif untuk mengisolasi bakteri penambat N (Becking, 1959 dalam Rao, 2007). Koloni rhizobia tidak akan menyerap warna merah jambu dari media *Congo Red - Yeast Extract Mannitol Agar* (CR-YEMA) dan akan berwarna putih sedangkan non rhizobia akan menyerap warna merah jambu pada media *Congo Red - Yeast Extract Mannitol Agar* (CR-YEMA) (Vincent, 1970).

Tabel 1. Sumber Isolat dan Kode Isolatnya

Sumber Isolat	Jumlah	Kode Isolat
Bintil Akar Aktif	4	A1, A2, A3, A4
Bintil Akar Tidak Aktif	4	N1, N2, N3, N4
Rhizofer	7	R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7

Tabel 1 memperlihatkan hasil isoasi iperoleh 4 isolat murni bakteri berasal dari bintil akar aktif, 4 isolat murni bakteri dari bintil akar tidak aktif, serta 7 isolat murni bakteri dari rhizosfer.

Karakterisasi Morfologi Koloni dan Sel Bakteri Bintil Akar dan Rhizosfer

Tabel 2. Data karakteristik Morfologi Sel

Kode isolat	Sifat Gram	Bentuk Sel	Susunan Sel	Endospora
A1	Positif	<i>Coccus</i>	<i>Staphylo</i>	-
A2	Positif	<i>Coccus</i>	<i>Staphylo</i>	-
A3	Negatif	<i>Coccus</i>	<i>Strepto</i>	-
A4	Negatif	<i>Coccus</i>	<i>Strepto</i>	-
N1	Positif	<i>Bacil</i>	<i>Strepto</i>	+
N2	Negatif	<i>Bacil</i>	<i>Mono</i>	-
N3	Positif	<i>Bacil</i>	<i>Strepto</i>	+
N4	Negatif	<i>Bacil</i>	<i>Strepto</i>	-
R1	Negatif	<i>coccus</i>	<i>Strepto</i>	-
R2	Negatif	<i>Coccus</i>	<i>Strepto</i>	-
R3	Negatif	<i>Coccus</i>	<i>Strepto</i>	-
R4	Negatif	<i>Bacil</i>	<i>Mono</i>	-
R5	Negatif	<i>Coccus</i>	<i>Strepto</i>	-
R6	Negatif	<i>Bacil</i>	<i>Strepto</i>	-
R7	Negatif	<i>Coccus</i>	<i>Strepto</i>	-

Keterangan : (-) Tidak Terdapat Endospora

Data karakteristik morfologi koloni bakteri engan konfigurasi *round* dan *Irregular*, margin *smooth*, *Irregular*, dan *wavy*, elevasi *flat*, *raised*, dan *covex*, serta berwarna putih, putih kekuningan, krem, hingga kuning. Hasil pengecatan gram pada sel bakteri gram positif akan berwarna ungu dan berwarna merah untuk bakteri gram negatif (Pratita, 2012 dalam Chasanah, 2018). Lapisan peptidoglikan pada bakteri gram positif mengikat zat warna kristal violet sehingga menyebabkan sel bakteri menjadi berwarna ungu. Sedangkan pada bakteri gram negatif, lapisan peptidoglikan yang tipis serta kadar lipid yang tinggi sekitar 20%, sehingga zat warna yang terikat adalah safranin yang menyebabkan sel bakteri menjadi berwarna merah (Chasanah, 2018).

Hasil positif dari pengecatan endospora ditandai dengan endospora akan berwarna hijau akibat mengikat warna malachite green (Fitrah, dkk., 2013 dalam Chasanah, 2018). Sedangkan pada bakteri yang tidak menghasilkan endospora akan menunjukkan warna merah akibat pewarnaan oleh safranin. Data karakteristik morfologi sel isolat bakteri dapat dilihat pada Tabel 2.

Karakterisasi Fisiologi (Biokimia) Bakteri Bintil Akar dan Rhizosfer

Karakterisasi fisiologi (biokimia) bertujuan untuk mengetahui aktivitas sel dan interaksi biokimia yang terjadi. Uji biokimia bakteri merupakan suatu upaya yang dilakukan untuk mengidentifikasi dan mendeterminasi suatu biakan murni bakteri hasil isolasi melalui sifat-sifat fisiologinya (Petczar *et al.*, 2010).

Tabel 3. Hasil Uji Kebutuhan Oksigen

Kode Isolat	Karakteristik Pertumbuhan	
	Tipe Pertumbuhan	Kebutuhan Oksigen
A1	<i>Uniform Fine Turbidity</i>	Fakultatif Anaerob
A2	<i>Uniform Fine Turbidity</i>	Fakultatif Anaerob
A3	<i>Uniform Fine Turbidity</i>	Fakultatif Anaerob
A4	<i>Uniform Fine Turbidity</i>	Fakultatif Anaerob
N1	<i>Sediment</i>	Anaerob
N2	<i>Uniform Fine Turbidity</i>	Fakultatif Anaerob
N3	<i>Sediment</i>	Anaerob
N4	<i>Uniform Fine Turbidity</i>	Fakultatif Anaerob
R1	<i>Uniform Fine Turbidity</i>	Fakultatif Anaerob
R2	<i>Uniform Fine Turbidity</i>	Fakultatif Anaerob
R3	<i>Uniform Fine Turbidity</i>	Fakultatif Anaerob
R4	<i>Uniform Fine Turbidity</i>	Fakultatif Anaerob
R5	<i>Uniform Fine Turbidity</i>	Fakultatif Anaerob
R6	<i>Uniform Fine Turbidity</i>	Fakultatif Anaerob
R7	<i>Uniform Fine Turbidity</i>	Fakultatif Anaerob

Suatu bakteri tidak dapat diidentifikasi hanya berdasarkan sifat-sifat morfologinya saja, karena bakteri yang berbeda dapat tampak serupa, tanpa hasil pegamatan fisiologis (Lehninger, 1992). Data karakteristik fisiologi (biokimia) bakteri uji kebutuhan oksigen dapat dilihat pada Tabel 3.

Data karakteristik fisiologi (biokimia) bakteri uji motilitas, katalase, produksi H₂S, produksi indol, penggunaan sitrat sebagai sumber karbon, hidrolisa gelatin, dan hidrolisa pati dapat dilihat

pada Tabel 4.

Data karakteristik fisiologi (biokimia) bakteri uji fermentasi karbohidrat (glukosa, sukrosa, maltose, laktosa) dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 4. Hasil Uji Fisiologi (Biokimia)

Kode Isolat	Jenis Uji									
	motilitas	katalase	produksi H ₂ S	produksi indol	sitrat	hidrolisa gelatin	hidrolisa pati	suhu 16°C	suhu 27°C	suhu 37°C
R1	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+
R2	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
R3	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+
R4	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+
R5	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+
R6	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
R7	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
A1	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
A2	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
A3	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
A4	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
N1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
N2	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
N3	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
N4	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-

Keterangan :(+): Hasil Positif; (-): Hasil Negatif

Identifikasi Bakteri Bintil Akar dan Rhizosfer

Genera acuan yang diperoleh yaitu *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Azomonas*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, dan *Neisseria*. Data berupa hasil uji karakterisasi isolat bakteri serta data karakteristik genera bakteri acuan yang diperoleh kemudian dianalisis dan dibuat dendogramnya menggunakan aplikasi *Multi-Variate Statistical Package (MVSP)* 3.1. dengan uji *Cluster Analysis*. Untuk memperoleh indeks similaritas masing-masing isolat bakteri, digunakan koefisien *Simple Matching Coefficient (SSM)*. Pengelompokan ini dilakukan dengan algoritma *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA)*.

Tabel 5. Hasil Uji Fermentasi Karbohidrat

Kode Isolat	Jenis Uji			
	fermentasi glukosa	fermentasi sukrosa	fermentasi maltosa	fermentasi laktosa
R1	+a/-g	+a/-g	+a/-g	+a/-g
R2	+a/-g	+a/-g	+a/-g	+a/-g
R3	+a/+g	+a/+g	+a/+g	+a/+g

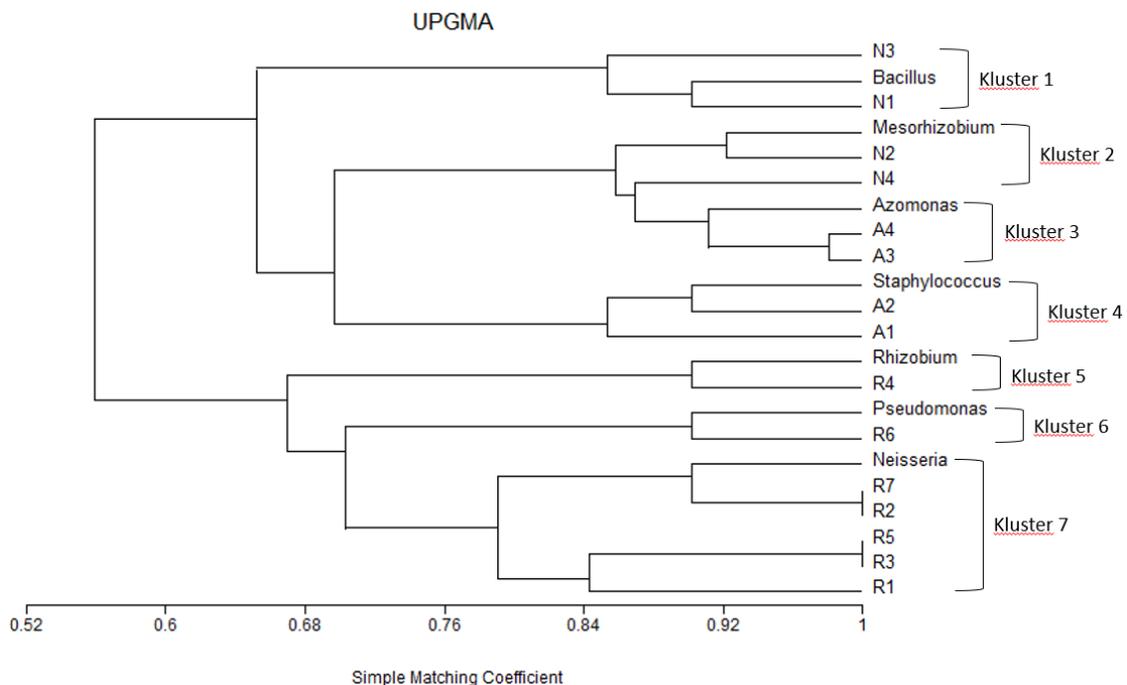
Kode Isolat	Jenis Uji			
	fermentasi glukosa	fermentasi sukrosa	fermentasi maltosa	fermentasi laktosa
R4	+a/+g	+a/+g	+a/+g	+a/+g
R5	+a/+g	+a/+g	+a/+g	+a/+g
R6	+a/-g	+a/-g	+a/-g	+a/-g
R7	+a/-g	+a/-g	+a/-g	+a/-g
A1	-a/-g	-a/-g	-a/-g	-a/-g
A2	+a/-g	+a/-g	+a/-g	+a/-g
A3	-a/-g	-a/-g	-a/-g	-a/-g
A4	-a/-g	-a/-g	-a/-g	-a/-g
N1	-a/-g	-a/-g	-a/-g	-a/-g
N2	-a/-g	-a/-g	-a/-g	-a/-g
N3	-a/-g	+a/-g	+a/-g	+a/-g
N4	-a/-g	-a/-g	-a/-g	-a/-g

Keterangan :

+a/+g : Positif asam dan menghasilkan gas

-a/-g : Negatif Asam tidak menghasilkan gas

+a/-g : Positif asam dan tidak menghasilkan gas



Gambar 2. Hasil konstruksi dendrogram bakteri isolat dan genera bakteri acuan

Hasil konstruksi dendrogram menunjukkan hubungan kekerabatan antar isolat bakteri yang diperoleh dengan genera acuan terduga. Semakin besar similaritas yang dimiliki suatu isolat maka semakin dekat hubungan kekerabatannya. Hasil konstruksi dendrogram dapat dilihat pada Gambar 2.

Hasil identifikasi bakteri bintil akar aktif dan tidak aktif serta rhizosfer tanaman kacang tanah dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6. Hasil Identifikasi Bakteri

Genera Bakteri	Sumber Isolat		
	Bintil Aktif	Bintil Tidak Aktif	Rhizosfer
<i>Azomonas</i>	v	v	
<i>Bacillus</i>		v	
<i>Mesorhizobium</i>		v	
<i>Neisseria</i>			v
<i>Pseudomonas</i>			v
<i>Rhizobium</i>			v
<i>Staphylococcus</i>	v		

Pembahasan

Pada penelitian ini *Azomonas* dan *Staphylococcus* ditemukan pada bintil akar aktif sedangkan belum pernah ada yang menyebutkan bahwa *Azomonas* dan *Staphylococcus* merupakan rhizobakteri yang dapat bersimbiosis dengan tanaman legum. *Azomonas* sendiri merupakan bakteri penambat nitrogen yang kerap ditemukan di rhizosfer (Singh *et al.*, 2020), sehingga ditemukannya *Azomonas* pada bintil akar aktif membuka kemungkinan bahwa *Azomonas* dapat bersimbiosis dengan tanaman legum khususnya kacang tanah. Namun *Staphylococcus* bukan merupakan rhizobakteri penambat nitrogen (Holguin *et al.*, 1992). Keberadaan *Staphylococcus* pada bintil akar aktif kemungkinan dikarenakan *Staphylococcus* merupakan bakteri endofit pada tanaman kacang tanah. Kemungkinan *Staphylococcus* masuk melalui akar atau udara lalu menginfeksi tanaman kacang tanah sebagai bakteri endofit. Bakteri endofit biasanya masuk ke dalam tanaman melalui zona akar, maupun dari udara, termasuk melalui batang, daun, bunga dan kotiledon (Zinniel *et al.*, 2002). Bakteri endofit dapat bermigrasi melalui berkas pengangkut *xylem* dengan bantuan flagela bakteri dan aliran transpirasi tanaman (Compant *et al.*, 2005; James *et al.*, 2002).

Bakteri yang ditemukan pada bintil akar aktif menandakan bahwa bakteri tersebut dapat bersimbiosis dengan akar tanaman kacang tanah sehingga membentuk bintil akar yang efektif menambat nitrogen. Bakteri yang dapat bersimbiosis membentuk bintil akar aktif tersebut seharusnya tidak ditemukan pada bintil akar tidak aktif. Hal tersebut berkaitan dengan kecocokan antara bakteri dengan tanaman legumnya. Apa bila tidak terjadi kecocokan, maka protein leghemoglobin yang melindungi enzim nitrogenase yang labil terhadap oksigen tidak akan terbentuk, sehingga enzim nitrogenase tidak akan bisa melakukan perannya dalam menambat nitrogen (Willey *et al.*, 2009). Itulah mengapa bintil yang tidak aktif menambat nitrogen ditandai dengan bagian dalamnya yang tidak berwarna kemerahan (tidak terdapat leghemoglobin). Namun pada penelitian ini *Azomonas* juga ditemukan pada bintil akar tidak aktif. Hal tersebut kemungkinan dapat disebabkan oleh perkembangan bintil yang belum maksimal sehingga bintil belum menjadi aktif, atau bintil sudah terlalu tua sehingga bintil yang semulanya aktif sudah menjadi tidak aktif. Kemampuan memfiksasi Nitrogen akan menurun bersama dengan semakin banyaknya bintil akar yang tua dan mulai luruh (Adisarwanto, 2009). Genera bakteri lain yang ditemukan pada bintil akar tidak aktif ialah *Bacillus* dan *Mesorhizobium*. Penemuan ini sekaligus membenarkan penemuan-penemuan sebelumnya yaitu *Bacillus* dan *Mesorhizobium* belum pernah disebutkan dapat membentuk bintil akar aktif pada tanaman kacang tanah. Menurut Singh *et al.*

(2020), *Bacillus* merupakan bakteri yang mampu menambat nitrogen tanpa harus bersimbiosis dengan tanaman legum dan kerap dijumpai pada rhizosfer. Sedangkan *Mesorhizobium* memiliki kemampuan menambat nitrogen bebas ketika bersimbiosis dengan tanaman legum (Young & Haukka, 1996 dan De Lajudie *et al.*, 1998 dalam Simanungkalit *et al.*, 2006). Besar kemungkinan *Mesorhizobium* memang bukan mikrosimbion yang cocok untuk tanaman kacang tanah, sehingga infeksi menghasilkan bintil yang tidak aktif.

Terdapat 3 genera bakteri yang ditemukan pada rhizosfer yaitu *Neisseria*, *Pseudomonas*, dan *Rhizobium*. *Neisseria* merupakan genera bakteri yang kerap ditemukan di tanah, namun bukan termasuk bakteri penambat nitrogen. *Pseudomonas* merupakan bakteri penambat nitrogen yang kerap dijumpai pada rhizosfer (Singh *et al.*, 2020). *Rhizobium* biasanya mampu bersimbiosis dengan akar tanaman kacang tanah dan menghasilkan bintil akar yang aktif (Jaiswal *et al.*, 2017), namun pada penelitian ini tidak bisa dipastikan apakah *Rhizobium* dapat bersimbiosis dengan akar tanaman kacang tanah atau tidak karena *Rhizobium* justru ditemukan pada rhizosfer. Walaupun begitu, terdapat kemungkinan bahwa *Rhizobium* tersebut mampu bersimbiosis, hanya saja *Rhizobium* masih berada di tanah dan belum menginfeksi akar kacang tanah. Bakteri yang ada pada bintil akar aktif maupun tidak aktif seharusnya merupakan bakteri yang berasal dari rhizosfer. Namun bakteri yang ditemukan pada bintil akar aktif maupun tidak aktif justru tidak ditemukan pada rhizosfer. Hal tersebut kemungkinan dikarenakan bakteri-bakteri tersebut memiliki kemampuan untuk membunuh atau menghambat pertumbuhan genera bakteri lain, sehingga genera bakteri yang tumbuh pada medium kultur tidak beragam. Bakteriosin merupakan sejenis peptida antimikroba atau protein hasil sintesis ribosom yang diproduksi oleh bakteri, yang dapat membunuh atau menghambat pertumbuhan genera bakteri lain baik yang sejenis maupun yang tidak sejenis, tetapi tidak akan membahayakan bakteri itu sendiri karena adanya protein kekebalan yang spesifik (Cotter *et al.*, 2005). Sedikitnya nutrisi di medium kultur memicu produksi bakteriosin untuk berkompetisi dalam ruang dan nutrisi. Lebih dari 99% bakteri dapat menghasilkan setidaknya satu bakteriosin, yang sebagian besar belum teridentifikasi (Riley dan Wertz, 2002). Kemampuan bakteriosin dalam membunuh atau menghambat pertumbuhan genera bakteri lain bertujuan untuk mempertahankan populasi dan mengurangi jumlah pesaing untuk mendapatkan lebih banyak nutrisi dan ruang hidup di lingkungan (Yang *et al.*, 2014).

Hasil penelitian ini menunjukkan terdapat beberapa genera bakteri baru yang ditemukan pada masing-masing sumber isolat yang sebelumnya belum pernah ditemukan pada penelitian sebelumnya. Namun hal tersebut bisa juga kemungkinan dikarenakan penelitian ini memiliki beberapa keterbatasan, yaitu tanaman kacang tanah yang digunakan sebagai sumber isolat tidak ditanam sendiri oleh peneliti, sehingga tidak diketahui segala perlakuan semasa pertumbuhannya, termasuk pemberian pupuk, serta kemungkinan tanaman terkena penyakit yang tidak nampak gejalanya. Karena nampaknya rhizobakteri yang merugikan tanaman atau *Deleterious Rhizobacteria* (DRB) yang menghuni tanaman secara endofit dapat ditemukan secara interseluler di bawah sel epidermis dan di ruang intraseluler sel korteks akar, tanpa menimbulkan gejala penyakit (Schippers *et al.*, 1987; Hallman, 2001). Maka dari itu masih perlu dilakukan beberapa uji lanjutan serta modifikasi metode isolasi.

SIMPULAN

Jumlah total isolat yang diperoleh sebanyak 15 isolat yang merupakan bakteri gram positif dan negatif, berbetuk *coccus* maupun *bacil*, dengan konfigurasi *round*, margin *smooth*, elevasi *raised*, berwarna putih hingga putih kekuningan, dengan hasil uji fisiologis (biokimia) yang beragam. Jumlah genera yang teridentifikasi sebanyak 7 genera: *Azomonas* terdapat pada sampel

bintil akar aktif (A3 dan A4) dan bintil akar tidak aktif (N4), *Bacillus* terdapat pada bintil akar tidak aktif (N1, N3), *Mesorhizobium* terdapat pada bintil akar tidak aktif (N2), *Neisseria* terdapat pada rhizosfer (R1, R2, R3, R5, R7), *Pseudomonas* terdapat pada rhizosfer (R6), *Rhizobium* terdapat pada rhizosfer (R4), *Staphylococcus* terdapat pada sampel bintil akar aktif (A1 dan A2).

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih penulis ucapkan kepada Oktavia Dwi Hartanti selaku rekan penelitian yang selalu membantu dan mendukung penulis dalam menyelesaikan penelitian dan penulisan artikel ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Aditya, B., Ghosh, A., Cattopadhyay, D. (2009). Co-Inoculation Effects on Nitrogen Fixing and Phosphate Solubilising Microorganism on Teak (*Tectona grandis*) and Indian Redwood (*Chukrasia tubularis*). *E-journal of Biology Sciecn.* Retrived from www.indianforester.co.in/index.php/indianforester/.../92290.
- Booger, F.C., & van Rossum, D. (2006). Nodulation of groundnut by Bradyrhizobium: a simple infection process by crack entry. *FEMS Microbiology Reviews*. 21 (1):5–27.
- Chasanah, E. (2018). Identifikasi Fenotip Bakteri Amilolitik Dan Selulolitik Dari Isolat Bekatul Dengan Metode Profile Matching Verdasarkan Bergey's Manual Of Determiantive Bacteriology. *Skripsi*. Jurusan Kimia Fakultas Sains Dan Teknologi. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim. Malang. Hal 27,28, 29.
- Compant, S., Reiter, B., Sessitsch, A., Nowak, J., Clément, C., Barka, E.A., (2005). Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp. strain *PsJN*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 1685–1693.
- Fitrah, I. D., Darmawi, & Rasmaidar. (2013). Isolasi *Pasteurella multocida* pada kuda dan sensitivitasnya terhadap antibiotik. *Jurnal Medika Veterinaria*, 7: 121–125.
- Giller, K. E. (2001), Nitrogen Fixations in Tropical Cropping Systems 2nd ed. Willingford, Oxen, UK: CAB International.
- Heliati, I. (2003). Teknik isolasi rhizobiumalam dari tanah. *Prosiding Temu Teknis Fungsional Non Peneliti*, 62–65. American Society for Microbiology. 66(12): 5437–5447.
- Holguin, G., Guzman, M. A., & Bashan, Y. (1992). Two new nitrogen-fixing bacteria from the rhizosphere of mangrove trees: Their isolation, identification and in vitro interaction with rhizosphere *Staphylococcus* sp. *FEMS Microbiology Ecology*, 101, 207–216.
- Jaiswal, S. K., Msimbira, L. A., & Dakora, F. D. (2017). Phylogenetically diverse group of native bacterial symbionts isolated from root nodules of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) in South Africa. *Systematic and Applied Microbiology*, 40(4), 215–226. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2017.02.002>
- James, E.K., Gyaneshwar, P., Mathan, N., Barraquio, W.L., Reddy, P.M., Iannetta, P.P., Olivares, F.L., Ladha, J.K., (2002). Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. *Mol. Plant Microbe Interact.* 15, 894–906.
- Khan, M. H. R., Mohiuddin, M., and M Rahman. (2008). Enumeration, isolation and identification

of nitrogen-fixing bacterial strains at seedling stage in rhizosphere of rice grown in non-calcareous grey flood plain soil of Bangladesh. *Journal of the Faculty of Environmental Science and Technology*, 13 (1) : 97 - 101.

Lehninger (1992). *Dasar-dasar Biokimia* Jilid 1. Jakarta: Erlangga.

Petzar, Michael J. & Chan, E.C.S (2010). *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Jakarta: UI press.

Pratita, M. Y., & Putra, S. R. (2012). Isolasi dan identifikasi bakteri termofilik dari sumber mata air panas di songgoriti setelah dua hari inkubasi. *Jurnal Teknik Pomits*, 1: 1–5.

Rachmawati, D., & Retnaningrum, E. (2013). Pengaruh Tinggi Dan Lama Penggenangan Terhadap Pertumbuhan Padi Kultivar Sintanur Dan Dinamika Populasi Rhizobakteri Pemfiksasi Nitrogen Non Simbiosis. *Bionatura-Jurnal Ilmu-Ilmu Hayati Dan Fisik*, 15(2), 117–125.

Rao, N.S. Subba. (2007). Mikroorganisme Tanah dan Pertumbuhan Tanaman. Terjemahan Soil Organisms and Growth, oleh : Herawati Susilo. Jakarta. UI-PRESS.

Sari, R., & Prayudyaningsih, R. (2017). Peran Extracellular Polysaccharides (Eps) Dalam Simbiosis Legum-Rhizobia. *Info Teknis EBONI*, 14(2), 77–88.

Nugroho, W.S. (2015). Penetapan Standar Warna Daun Sebagai Upaya Identifikasi Status Hara (N) Tanaman Jagung (*Zea mays* L.) pada Tanah Regosol. *Planta Tropika: Journal of Agro Science*, 3(1), 8–15. <https://doi.org/10.18196/pt.2015.034.8-15>

Singh, R. K., Singh, P., Li, H. B., Song, Q. Q., Guo, D. J., Solanki, M. K., Verma, K. K., Malviya, M. K., Song, X. P., Lakshmanan, P., Yang, L. T., & Li, Y. R. (2020). Diversity of nitrogen-fixing rhizobacteria associated with sugarcane: A comprehensive study of plant-microbe interactions for growth enhancement in *Saccharum* spp. *BMC Plant Biology*, 20(1), 1–21. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02400-9>

Simanungkalit, R. D. M. (2006). *Pupuk Organik dan Pupuk Hayati*. Bogor: Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Sumberdaya Lahan Pertanian.

Simon, Z., Mtei, K. Gessesse, A. & Ndakidemi, P. A. (2014). Isolation and characterization of nitrogen fixing bacteria from cultivated and uncultivated soils of Northern Tanzania. *American Journal of Plant Sciences*, 5 (26) : 4050 - 4067.

Sugito, Y. (2012). *Ekologi Tanaman; Pengaruh Faktor Lingkungan Terhadap Pertumbuhan Tanaman dan Beberapa Aspeknya*. Cetakan Kedua. Malang: Universitas Brawijaya Press (UB Press).

Suryantini. (2015). Pembintilan Dan Penambatan Nitrogen Pada Tanaman Kacang Tanah. *Monograf Balitkabi*, 13, 234–250.

Willey, J. M., Sherwood, L. M., dan Woolverton, C. J. (2009). *Prescott's Principles of Microbiology*. United States: Mc Graw Hill.

Zinniel, D.K., Lambrecht, P., Harris, N.B., Feng, Z., Kuczmarski, D., Higley, P., Ishimaru, C.A., Arunakumari, A., Barletta, R.G., Vidaver, A.K., (2002). Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 2198–2208.