

Isolasi, Enumerasi, dan Karakterisasi Bakteri *Rhizobium* dari Tanah Kebun Biologi Wamena, Papua

The isolation, enumeration, and characterization of *Rhizobium* bacteria of the soil in Wamena Biological Garden

SRI PURWANINGSIH*

Bidang Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Bogor 16002

Diterima: 4 Juni 2004. Disetujui: 18 Agustus 2004.

ABSTRACT

The eleven soil samples have been isolated and characterized. The aims of the study were to get the pure culture and some data which described about enumeration and especially their characters in relation to the acids and bases reaction in their growth. The isolation of the bacteria use Yeast Extract Mannitol Agar medium (YEMA) while the characterization by using YEMA medium mixed with Brom Thymol Blue and Congo Red indicators respectively. The results showed that eighteen isolates have been isolated which consisted of three low growing and fifteen fast growing bacteria. Two isolates were not indicated *Rhizobium* and sixteen were *Rhizobium*. Density of *Rhizobium* enumeration was varied which related to soil organic matter content. The enumeration bacteria in YEMA medium were in the range of 0.6×10^5 and 11.6×10^5 CFU /g soil. The highest population was found in soil sample of Wieb vegetation.

© 2005 Jurusan Biologi FMIPA UNS Surakarta

Keywords: *Rhizobium*, Wamena Biological Garden, isolation, enumeration, characterization.

PENDAHULUAN

Papua merupakan salah satu propinsi di Indonesia yang sebagian besar wilayahnya berupa hutan. Hutan ini memiliki keanekaragaman hayati sangat tinggi dengan tingkat endemik yang tinggi pula, sehingga merupakan aset negara yang bermanfaat pada masa sekarang maupun mendatang. Kondisi hutan Papua pada tahun-tahun terakhir ini bervariasi dari hutan primer yang masih utuh hingga yang sudah terganggu akibat berbagai aktivitas manusia. Tindakan penghutan kembali menggunakan jenis-jenis tumbuhan yang dapat tumbuh dengan cepat merupakan satu pilihan tepat, misalnya weki (*Paraserianthes falcataria*) anggota suku Leguminosae. Pengembangan tumbuhan legum tumbuh cepat ini akan berdampak pada perbaikan tingkat kesuburan tanah secara cepat pula. Selain itu tanaman ini mampu beradaptasi pada tanah yang miskin hara, tahan terhadap kekeringan, dan merupakan tanaman penghasil kayu yang mempunyai kualitas cukup baik.

Tingkat kesuburan tanah dipengaruhi beberapa faktor antara lain keanekaragaman mikroba tanah; faktor iklim seperti suhu, curah hujan, kelembaban; faktor nutrisi dan lingkungan, serta populasi mikroba yang merupakan indikator tingkat kesuburan tanah (Allen dan Allen, 1981). Banyak jenis mikroba tanah mampu meningkatkan kesuburan tanah, misalnya *Rhizobium*. Bakteri ini mampu menambat nitrogen udara menjadi unsur hara nitrogen yang diperlukan tumbuhan untuk tumbuh dan berkembang. Di samping itu bakteri tersebut mempunyai dampak positif, baik secara langsung maupun tidak langsung terhadap sifat

fisik dan kimia tanah, sehingga mampu meningkatkan kesuburan tanah (Alexander, 1977), namun kehidupan dan populasi bakteri ini sangat dipengaruhi beberapa faktor seperti pH, kelembaban, iklim, kondisi fisik, dan kimia tanah (Sprent, 1976).

Dalam simbiosisnya dengan tanaman legum, *Rhizobium* diperkirakan mampu menambat nitrogen sebanyak hampir 2 juta ton per tahun di Amerika Serikat. Di Selandia Baru kemampuan penambatannya dapat mencapai 800 kg per hektar dalam setahun (Foth dan Turk, 1972). Peoples *et al.*, (1997 dalam Prayitno dkk., 2000) menyatakan bahwa penambatan secara biologis diperkirakan mampu menyumbang lebih dari 170 juta ton nitrogen ke biosfer per tahun, 80% di antaranya merupakan hasil simbiosis antara bakteri *Rhizobium* dengan tanaman legum. Suatu jumlah yang pantas dipertimbangkan dalam upaya pengembangan kesuburan tanah.

Proses pembangunan tapak konservasi *ex-situ* biota pegunungan, Kebun Biologi Wamena, Papua masih berlangsung. Dilihat secara kasat mata terdapat berbagai variasi tanah berdasarkan warnanya. Juga terdapat bagian lahan yang didominasi alang-alang atau siluk (*Imperata cylindrica*). Lahan ini perlu ditanami aneka tumbuhan koleksi dari hutan di sekitar Wamena. Berkaitan dengan ini, perlu dicari informasi ilmiah tentang kandungan bakteri *Rhizobium* serta enumasinya, sehingga dapat menunjang keberhasilan pengembangan tumbuhan koleksi nantinya.

Sehubungan dengan hal tersebut maka perlu dilakukan penelitian tentang koleksi, isolasi dan karakterisasi bakteri *Rhizobium* dari Kebun Biologi Wamena dengan vegetasi yang berbeda-beda. Hasil isolasi diharap mendapatkan isolat murni, yang dapat digunakan kembali di kawasan tersebut. Mikroba ini berperan penting dalam penyediaan unsur hara nitrogen bagi tanaman, sehingga diharapkan mampu meningkatkan kesuburan tanah dan meningkatkan pertumbuhan tanaman.

* Alamat korespondensi:

Jl. Ir. H. Juanda 18, Bogor 16002.
Tel.: +62-251-324006. Faks.: +62-251-325854
e-mail: atitkanti@yahoo.com

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan data enumerasi dan isolat yang murni, dan selanjutnya dilakukan karakterisasi untuk mengetahui isolat yang berpotensi untuk digunakan sebagai pupuk hayati guna meningkatkan kesuburan tanah.

BAHAN DAN METODE

Pengambilan tanah

Sebanyak 1 kg tanah diambil dari kedalaman 0-25 cm secara acak pada daerah perakaran, kemudian dimasukkan dalam polibag, dibawa ke laboratorium dan disimpan dalam almari es. Sebanyak 11 contoh tanah yang diambil dari Kebun Biologi Wamena yang terdiri dari (i) Tanah yang didominasi pohon *munika* (*Pittosporum ramiflorum*), (ii) Tanah didominasi pohon *wieb* (*Grevillea papuana*), (iii) Tanah didominasi pohon *seno* (*Castanopsis acuminatissima*), (iv) Tanah didominasi perdu *duaga* (*Vaccinium varingaefolium*), (v) Tanah coklat kemerahan, didominasi alang-alang (*Imperata cylindrica*), (vi) Tanah merah, didominasi alang-alang, (vii) Tanah kuning, didominasi alang-alang, (viii) Tanah abu-abu, didominasi alang-alang, (ix) Tanah hitam, bervegetasi pohon campuran, (x) Tanah coklat, bervegetasi pohon campuran, (xi) Tanah dengan partikel kapur, didominasi alang-alang. Tanah ini dianalisis kandungan C dan unsur makro N, P dan K, serta dilakukan isolasi dan enumerasi bakteri *Rhizobium* lebih lanjut.

Isolasi bakteri

Isolasi bakteri *Rhizobium* yang berasal dari tanah dilakukan dengan metoda cawan hitung (plate count), yaitu 1 gram tanah dari masing-masing contoh tanah dimasukkan dalam 9 ml larutan NaCl 0,85% dalam tabung reaksi, kemudian digojog dengan menggunakan vortex, diperoleh seri pengenceran 10^{-1} . Pengenceran dilanjutkan hingga diperoleh seri pengenceran 10^{-1} sampai 10^{-5} , kemudian dipipet 0,1 ml suspensi dari pengenceran 10^{-1} hingga 10^{-5} , dimasukkan dalam cawan petridish 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 Ekstrak, 20 g agar, aquadest 1 liter, pH 6,8, kemudian diratakan dengan spatula. Inkubasi dilakukan pada temperatur kamar (27^0 sampai 28^0 C). Setiap hari diamati pertumbuhannya dan dihitung jumlah koloninya. Pengamatan dilakukan sampai umur 7 hari.

Pemurnian dan karakterisasi

Bakteri yang telah didapat dimurnikan dengan cara koloni diambil dengan Ose dimasukkan ke dalam aquadest steril (5 ml), kemudian digojog dengan menggunakan vortex, dipipet 0,1 ml dimasukkan dalam petridish yang berisi media *YEMA*, dan 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 pengujian karakterisasi isolat tersebut ditumbuhkan pada media selektif yang dibuat dengan cara memodifikasi media dasar dengan penambahan beberapa jenis pewarna sebagai indikator yaitu *Brom Thymol Blue* (*BTB*) dan *Congo Red* (Somasegaran dan Hoben, 1984), kemudian diamati pertumbuhan dan perubahan warnanya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dengan menggunakan metode pengenceran, bakteri *Rhizobium* telah berhasil diisolasi dari 11 contoh tanah. Semua isolat menunjukkan pertumbuhan yang subur dan sangat subur pada media *YEMA*, *YEMA + Brom Thymol Blue*, *YEMA + Congo Red*. Bakteri pada tiga macam media tersebut merupakan bakteri *Rhizobium* yaitu berwarna putih keruh seperti susu atau jernih seperti air, dan bentuk koloninya bulat, dalam media *Congo Red* berwarna merah muda yang berarti tidak menyerap warna merah. Seperti dilaporkan oleh Soekartadiredja (1992), 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.

Jumlah/populasi bakteri *Rhizobium* dari 11 contoh tanah sangat bervariasi (Tabel 1.), baik dari contoh tanah yang didominasi tanaman maupun yang tidak ada tanaman. Dari 11 contoh tanah yang diisolasi didapatkan 18 isolat yang murni, isolat tersebut disimpan dalam media *YEMA* miring dalam tabung reaksi sebagai kultur murni.

Pada tanah yang didominasi oleh sejumlah tumbuhan antara lain *munika* (*Pittosporum ramiflorum*), *wieb* (*Grevillea papuana*), *seno* (*Castanopsis acuminatissima*) dan *duaga* (*Vaccinium varingaefolium*), ternyata populasi bakteri *Rhizobium* lebih tinggi dibandingkan dengan tanah yang tidak ada tumbuhan. Alexander (1977) mengemukakan bahwa jumlah bakteri di daerah perakaran tanaman berlimpah hingga 10^9 sel per gram tanah daerah perakaran. Kenyataan ini menunjukkan bahwa tanah yang ditumbuhi aneka tumbuhan tentunya mengandung bahan-bahan organik dalam jumlah memadai. Aneka macam bahan organik tersebut sangat dibutuhkan untuk kelangsungan hidup bakteri, seperti halnya penambat nitrogen. Makin banyak bahan organik yang tersedia, ternyata populasi bakteri makin tinggi. Pendapat ini ditunjang hasil penelitian Hoffman (1914 dalam Waksman, 1952) bahwa 27 dari 30 tanah permukaan dan sekitar perakaran mempunyai populasi bakteri lebih banyak dibandingkan dengan tanah di luar perakaran. Selain itu, faktor kesuburan tanah seperti pH, kandungan O_2 , unsur hara, serta faktor-faktor fisik dan biologi tanah juga mempengaruhi populasi bakteri penambat nitrogen.

Jumlah bakteri *Rhizobium* tertinggi ditemukan pada contoh tanah yang didominasi oleh pohon *wieb* (Tabel 1.) yaitu sebesar $11,6 \times 10^5$ CFU/g tanah, diikuti tanah yang didominasi oleh perdu *duaga*, pohon *seno*, pohon *munika*, tanah merah, tanah coklat kemerahan, tanah kuning, tanah

Tabel 1. Kepadatan enumerasi dan jumlah isolat bakteri *Rhizobium* yang didapat dari contoh tanah Kebun Biologi Wamena, Papua serta kandungan hara utama.

Jenis sampel	Populasi <i>Rhizobium</i> (CFU/g tanah x 10^5)	Jumlah isolat	N (%)	P ppm	K Me/100 g	C (%)
1. Tanah <i>munika</i>	6,3	1	0,21	4,8	0,53	2,54
2. Tanah <i>wieb</i>	11,6	2	0,30	3,9	0,36	3,05
3. Tanah <i>seno</i>	7,3	1	0,22	1,6	0,15	3,12
4. Tanah <i>duaga</i>	9,3	1	0,23	3,3	0,26	3,85
5. Tanah coklat kemerahan	3,6	2	0,06	0,2	0,07	0,69
6. Tanah merah	4,3	2	0,06	0,3	0,07	0,62
7. Tanah kuning	3,3	1	0,05	0,4	0,05	0,51
8. Tanah abu-abu	1,0	2	0,04	1,6	0,13	0,36
9. Tanah hitam	3,3	2	0,25	2,1	0,06	2,76
10. Tanah coklat	1,6	3	0,23	2,7	0,07	2,47
11. Partikel kapur	0,6	1	0,03	0,1	0,05	0,36

hitam, tanah coklat, tanah abu-abu dan yang paling rendah pada tanah partikel kapur yaitu sebesar $0,6 \times 10^5$ CFU/g tanah. Gray dan Williams (1971) mengemukakan bahwa bakteri *Rhizobium* dalam tanah dapat berkembang apabila ada tumbuhan legum, dan populasinya akan menurun apabila tidak ada tumbuhan legum sehingga dapat mati dalam waktu sekitar 10 tahun. Juga dikemukakan bahwa adanya perakaran legum dapat merangsang pertumbuhan dan populasi bakteri *Rhizobium* mencapai 10^5 - 10^7 sel per gram tanah. Dengan demikian kandungan bakteri *Rhizobium* di sejumlah contoh tanah dari Kebun Biologi Wamena umumnya cukup tinggi.

Kesuburan tanah dapat diprediksi dari jumlah populasi mikroba yang hidup di dalamnya. Tingginya jumlah mikroba merupakan pertanda tingginya tingkat kesuburan tanah, karena mikroba berfungsi sebagai perombak senyawa organik menjadi nutrisi yang tersedia bagi tanaman dan di dalam tanah terkandung cukup bahan organik dan senyawa lainnya untuk pertumbuhan mikroba. Gray dan Williams (1971) mengemukakan bahwa kelembaban tanah berpengaruh pada aerasi, suhu dan reaksi di dalam tanah, namun masih sedikit peneliti yang mempertimbangkan secara akurat perilaku mikroba tanah terhadap setiap faktor lingkungan tanah. Organisme lain turut berpengaruh pada populasi bakteri *Rhizobium* seperti dikemukakan oleh Holland dan Parker dalam Gray dan William (1971) bahwa terjadi gagal perbintilan di tanah bukaan baru di Australia Barat karena pertumbuhan bakteri *Rhizobium* dihambat oleh zat penghambat yang dihasilkan jamur yang tumbuh berlimpah di tumpukan bahan organik.

Tanah yang dirajai tumbuhan memiliki kandungan bahan organik dan unsur hara makro lebih tinggi dibandingkan tanah tanpa tumbuhan. Tanah yang ada tumbuhan pohon mengandung bahan organik atau unsur C yang umumnya di atas 2,5% sedangkan C pada tanah tidak ada tumbuhan pohon, tetapi didominasi alang-alang adalah di bawah 0,7% (Tabel 1.). Hal ini disebabkan antara lain bahan organik yang dihasilkan pohon lebih mudah mengalami perombakan, bahan organik ini dihasilkan dalam jumlah banyak, sehingga cukup tersedia untuk pertumbuhan dan perkembangan mikroba tanah.

Hasil pertumbuhan bakteri *Rhizobium* pada media selektif, dapat dilihat pada Tabel 2. Delapan belas isolat

Tabel 2. Pertumbuhan bakteri *Rhizobium* pada media YEMA, YEMA + CR dan YEMA + BTB.

Kode isolat	YEMA	YEMA + CR	YEMA+ BTB
1 wy (1)	++	Merah muda	Kuning
2 wy (1)	++	Merah muda	Kuning
2 wy (2)	++	Merah muda	Kuning
3 wy (1)	++	Merah muda	Kuning
4 wy (1)	++	Merah muda	Kuning
5 wy(1)	++	Merah muda	Kuning
5 wy (2)	++	Merah muda	Kuning
6 wy (1)	+	Merah muda	Biru
6 wy (2)	++	Merah muda	Kuning
7 wy (1)	++	Merah muda	Kuning
8 wy (1)	++	Merah muda	Kuning
8 wy (2)	+	Merah	Biru
9 wy (1)	++	Merah muda	Kuning
9 wy (2)	++	Merah muda	Kuning
10 wy (1)	++	Merah muda	Kuning
10 wy (2)	++	Merah muda	Kuning
10 wy (3)	+	Merah	Biru
11 wy(1)	+	Merah muda	Kuning

Keterangan: + = tumbuh subur, ++ = tumbuh sangat subur; BTB = *Brom Thymol Blue*, CR = *Congo Red*; biru = reaksi basa, kuning = reaksi asam; YEMA = *Yeast Ekstrakt Manitol Agar*.

murni dikarakterisasi menggunakan media YEMA, YEMA + *Brom Thymol Blue*, YEMA + *Congo red*. Pertumbuhan bakteri dalam media YEMA menunjukkan bahwa empat isolat termasuk tumbuh subur (ditandai +), dan empat belas termasuk tumbuh sangat subur (ditandai ++). Pada media YEMA + *Congo Red* dua isolat berwarna merah dan enam belas isolat berwarna merah muda, 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*. Sedangkan pada media YEMA + *Brom Thymol Blue* tiga isoalat termasuk dalam kelompok tumbuh lambat yang ditandai dengan reaksi basa yang berwarna biru, dan lima belas isolat termasuk dalam kelompok tumbuh cepat dengan ditandai reaksi asam yang berwarna kuning.

Hasil ini menunjukkan bahwa contoh tanah dari Kebun Biologi Wamena mengandung sejumlah bakteri *Rhizobium* yang perlu diuji lebih lanjut responnya terhadap sejumlah faktor lingkungan agar dapat diaplikasikan dalam peningkatan kesuburan tanah. Alexander (1977) mengemukakan bahwa faktor lingkungan tersebut adalah tipe legum, biak yang efektif, kandungan nitrogen anorganik dalam tanah, ketersediaan fosfor dan kalium, serta pH dan ketersediaan nutrisi sekunder yang dapat diserap oleh tanaman. Dengan demikian akan diketahui isolat-isolat yang sesuai dengan tanaman legum yang akan dikembangkan di Kebun Biologi Wamena maupun di kawasan penyangga Kebun Biologi Wamena tersebut.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa contoh tanah yang berasal dari Kebun Biologi Wamena, Papua mengandung bakteri *Rhizobium* dengan kepadatan populasi yang bervariasi. Populasi terpadat pada contoh tanah yang didominasi oleh tumbuhan wieb (*Grevillea papuana*), diikuti oleh duaga (*Vaccinium varingiaefolium*). Kandungan bahan organik merupakan salah satu faktor yang turut berperan pada kepadatan atau jumlah bakteri *Rhizobium* dalam tanah. Bakteri *Rhizobium* dalam jumlah banyak dijumpai pada tanah yang mengandung bahan organik tinggi.

DAFTAR PUSTAKA

- Alexander, M. 1977. *Introduction to Soil Microbiology*. New York: John Wiley and Sons.
- Allen, O.N. and E.K. Allen. 1981. *The Leguminosae. A source book of characteristics. Uses and Nodulation*. Winconsin: The University of Winconsin Press.
- Foth, H.D. and L.M. Turk. 1972. *Fundamentals of Soil Science*. New York: John Wiley and Sons.
- Gray, T.R.G. and S.T. Williams. 1971. *Soil Microorganisms*. London: Longman Group Limited.
- Prayitno, J., J.J. Weinman, M.A. Djordjevic, dan B.G. Rofle. 2000. Pemanfaatan protein pendar hijau (*green fluorescent protein*) untuk mempelajari kolonisasi bakteri *Rhizobium*. *Prosiding Seminar Nasional Biologi XVI*: 372-377.
- Soekartadiredja, E.M. 1992. *Perubahan Inefektivitas dan Efektivitas Penambatan Nitrogen pada Galur Rhizobium setelah Perlakuan Pasasi in Vivo*. [Tesis]. Bandung: Universitas Pajajaran.
- Somasegaran, P. and H.J. Hoben. 1984. *Methods in Legume Rhizobium Tehnology*. Hawaii: University of Hawaii. NIFTAL. Project and Mircen.
- Sprent, J.L. 1976. *Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants*. In: Nutman, P.S. (ed). London: Cambridge University Press.
- Vincent, J.M. 1970. *A manual for the Practical Study of the Root Nodule Bacteria*. London: International Biological Programme Handbook. No 15
- Waksman, S.A. 1952. *Soil Microbiology*. New York.: John Willey and Sons Inc.