

Seleksi dan Karakterisasi Bakteri Penambat Nitrogen Non Simbiotik Pengekskresi Amonium Pada Tanah Pertanaman Jagung (*Zea mays* L.) dan Padi (*Oryza sativa* L.) Asal Kabupaten Barru, Sulawesi Selatan, Indonesia

Selection and Characterization of Non Symbiotic Nitrogen-Fixing Bacteria Excreting Ammonium On Corn Land (*Zea mays* L.) and Rice (*Oryza sativa* L.) Origin Barru, South Sulawesi, Indonesia

Hartono* dan Oslan Jumadi

Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Negeri Makassar. Jl. Dg Tata Raya, Makassar

Received 2nd June 2014 / Accepted 9th July 2014

ABSTRAK

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif yang bertujuan untuk menyeleksi (*screening*) bakteri penambat nitrogen non simbiotik yang diisolasi dari rhizosfer tanaman jagung (*Zea mays* L.) dan padi (*Oryza sativa* L.) yang memiliki kemampuan mengekskresikan amonium. Sampel diambil dari daerah Mangkoso, Kabupaten Barru, Provinsi Sulawesi Selatan pada daerah rhizosfer tanaman. Isolasi bakteri penambat nitrogen dilakukan dengan menggunakan medium pertumbuhan bebas nitrogen yaitu medium Burk's dan Ashby. Koloni bakteri yang tumbuh pada medium pertumbuhan selanjutnya dimurnikan dan diuji kemampuan ekskresi amoniumnya dengan menggunakan metode *spectrophotometry*. Isolat bakteri yang memiliki kemampuan mengekskresikan amonium dikarakterisasi secara morfologi dan fisiologis. Hasil penelitian menunjukkan terdapat 20 isolat bakteri yang mampu tumbuh pada medium bebas nitrogen, namun setelah dilakukan uji ekskresi amonium hanya diperoleh 9 isolat yang memiliki kemampuan mengekskresikan amonium dari masing-masing medium pertumbuhan. Isolat bakteri dan konsentrasi amonium yang diekskresikan masing-masing adalah ABJ211 (179 µg/L), ABP213 (269 µg/L), ABP211 (162 µg/L), ABP131 (254 µg/L), ABP242 (104 µg/L), BBJ221 (263 µg/L), BBJ222 (272 µg/L), BBP222 (269 µg/L) dan BBP214 (257 µg/L). Kesembilan isolat tersebut memiliki karakteristik morfologi dan fisiologis yang bervariasi terutama pada sifat struktur dinding sel (gram), kemampuan hidrolisis pati, gelatin dan kasein, sementara kemampuan dalam mereduksi nitrat dan H₂O₂ (reaksi katalase positif) serta fermentasi glukosa menunjukkan karakter yang seragam.

Kata kunci: Bakteri Penambat Nitrogen, Non Simbiotik, Ekskresi Amonium, Karakterisasi Morfologi dan Fisiologis

*Korespondensi:

email: hartono@unm.ac.id

ABSTRACT

This research is a descriptive study that aims for selecting (screening) non-symbiotic nitrogen-fixing bacteria isolated from rhizosphere maize (*Zea mays* L.) and rice (*Oryza sativa* L.) that has the ability to excrete ammonium. Samples were taken from the area Mangkoso, Barru, Provinsi South Sulawesi in the area of plant rhizosphere. Isolation of nitrogen-fixing bacteria is done by using nitrogen-free growth medium which medium Burk's and Ashby. Bacterial colonies growing in growth medium further refined and tested the ability of ammonium excretion by using spectrophotometry. Bacterial isolates that have the ability to excrete ammonium characterized morphologically and physiologically. The results showed that 20 isolates of bacteria that can grow in nitrogen-free medium, but after the test ammonium excretion obtained only 9 isolates that have the ability to excrete ammonium from each of the growth medium. Isolates and ammonium concentrations are excreted each is ABJ211 (179 g / L), ABP213 (269 g / L), ABP211 (162 g / L), ABP131 (254 g / L), ABP242 (104 ug / L) , BBJ221 (263 g / L), BBJ222 (272 g / L), BBP222 (269 g / L) and BBP214 (257 ug / L). The nine isolates have morphological and physiological characteristics that vary mainly on the nature of the structure of the cell wall (gram), the ability of the hydrolysis of starch, gelatin and casein, while the ability to reduce nitrate and H₂O₂ (positive catalase reaction) as well as the fermentation of glucose showed a uniform character.

Key words: Nitrogen-fixing Bacteria, Non-symbiotic, Ammonium Excretion, Morphological and Physiological Characterization

PENDAHULUAN

Nitrogen merupakan salah satu unsur yang melimpah di alam ini. Unsur ini dapat ditemukan di udara, tanah maupun didalam air. Keberadaan nitrogen di alam sangat dibutuhkan oleh organisme hidup untuk melangsungkan kehidupannya. Meskipun hampir 80% dari atmosfer terdiri dari molekul nitrogen, namun sangat sedikit makhluk hidup yang dapat menggunakannya dalam keadaan bebas. Sebagian besar organisme hanya dapat menggunakannya bila dikombinasikan dengan unsur-unsur lain seperti oksigen dan hidrogen (Benson, 2001).

Nitrogen dalam bentuk N₂ bebas di atmosfer tidak dapat langsung diserap oleh tanaman tingkat tinggi. Tumbuhan menyerap unsur nitrogen dari lingkungannya dalam bentuk senyawa

amonium (NH₄⁺). Unsur ini dapat diperoleh dari tanah dengan bantuan mikroorganisme tertentu yang dikenal sebagai bakteri penambat nitrogen. Setelah sel bakteri ini mati dan lisis, senyawa nitrogen organik dalam sel seperti protein dan asam nukleat akan dilepaskan ke lingkungan dan selanjutnya dapat dimanfaatkan oleh organisme lain seperti tanaman setelah melalui proses mineralisasi.

Bakteri yang hidup bebas pada perakaran dan dalam jaringan tanaman padi, seperti *Pseudomonas* spp., *Enterobacteriaceae*, *Bacillus*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, dan *Herbaspirillum* telah terbukti mampu melakukan fiksasi nitrogen (James dan Olivares, 1997). Bakteri penambat nitrogen pada rizosfer tanaman gramineae, seperti *Azotobacter paspali* dan *Beijerinckia* spp adalah salah satu dari kelompok bakteri aerobik yang

mengkolonisasi permukaan akar (Baldani dkk, 1997). Bakteri penambat nitrogen dapat menambat nitrogen dari atmosfer karena bakteri jenis ini memiliki enzim spesifik didalam sel yang dikenal sebagai Nitrogenase yang disusun oleh dua komponen yang saling menunjang yaitu protein Fe (komponen I) dan protein Mo-Fe (komponen II).

Walaupun terdapat banyak spesies bakteri yang memiliki kemampuan menambat nitrogen dari udara, tetapi sangat sedikit yang mampu mengekskresikan nitrogen yang ditambat dalam bentuk amonium ke lingkungan sehingga kontribusinya dalam menyediakan nitrogen tersedia bagi tanaman juga masih rendah (Dobbelaere dkk, 2003). Weniger dan Veen (1991) melaporkan bahwa kemampuan *Azospirillum brasilense* untuk mengekskresikan NH_4^+ hanya sekitar 1 sampai 2 % dari nitrogen yang difiksasi dari atmosfer.

Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa ada beberapa spesies bakteri penambat nitrogen strain *wild type* dapat mengekskresikan amonium yang ditambat dari atmosfer ke lingkungan dalam bentuk amonium, (Kleiner, 1982; Castorph dan Kleiner, 1984; Brewin dkk, 1999). Amonium yang diekskresikan keluar sel oleh bakteri dapat langsung dimanfaatkan oleh tanaman dan organisme lain. Kenyataannya, ini dapat meningkatkan kontribusi bakteri penambat nitrogen dalam menyediakan senyawa nitrogen bagi tanaman (Colnaghi dkk, 1997). Amonium yang diekskresikan keluar sel melalui mekanisme difusi sederhana (Kleiner, 1982; Castorph dan Kleiner, 1984), akan diserap oleh tumbuhan dan dikonversi menjadi nitrogen organik kompleks seperti

protein, asam amino dan asam nukleat (Reitzer, 1996).

Daerah perakaran tanaman (rhizosfer) merupakan bagian tanaman yang paling kaya akan mikroorganisme (Bruehl,1987). Tingginya populasi mikroorganisme yang ada di rhizosfer disebabkan karena pada daerah tersebut merupakan bagian yang sangat kaya akan nutrisi seperti asam amino sebagai sumber nitrogen dan gula sebagai sumber karbon yang dibutuhkan untuk pertumbuhan mikroorganisme.

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan isolat bakteri penambat nitrogen non simbiotik yang memiliki kemampuan mengekskresikan amonium dengan konsentrasi tinggi yang diisolasi dari dari rhizosfer tanaman budidaya. Isolat bakteri yang diperoleh akan digunakan sebagai inokulum untuk pupuk hayati yang diharapkan dapat berperan penting dalam menyediakan sumber nitrogen untuk meningkatkan kesuburan tanah.

METODE

1. Isolasi Bakteri Penambat Nitrogen

Sampel tanah diambil dari daerah Mangkoso, Kabupaten Barru, Sulawesi Selatan pada daerah rizosfer dua tanaman budidaya yaitu padi dan jagung. Sampel diambil pada rhizosfer tanaman pada kedalaman 30 cm dari permukaan tanah kemudian dimasukkan ke dalam kantong sampel steril dan dibawa ke Laboratorium Biologi FMIPA UNM. Sampel tanah kemudian disaring dengan ayakan berdiameter 2,00 mm mesh. Satu gram dari setiap sampel tanah dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer 250 ml yang berisi 100 ml medium bebas nitrogen yaitu medium

Burk's (Sukrosa, 20.0 g; K₂HPO₄, 0.64 g; KH₂PO₄, 0.16 g; MgSO₄.7H₂O, 0.20 g; NaCl, 0.20 g; CaSO₄.2H₂O, 0.05 ; Na₂MoO₄.2H₂O, (0.05%) 5.0 ml; FeSO₄.7H₂O, (0.3%) 5.0 ml; agar 15 g dan aquadest, 1000 ml) (Jack *dkk* 1953) dan medium Ashby's (mannitol, 20 g; K₂HPO₄, 0.2 g; MgSO₄.7H₂O, 0.2 g; NaCl, 0.2 g; K₂SO₄, 0.1 g and CaCO₃, 0.5 g. aquadest, 1000 ml (Subba Rao, 1984) kemudian diinkubasi selama 14 hari pada suhu 27°C. Satu mL medium cair diambil secara aseptis kemudian diencerkan sampai pengenceran 10⁻³ kemudian diinokulasi pada medium Burk's dan Ashby's padat dengan metode cawan sebar kemudian diinkubasi selama 7 hari pada suhu 27°C. Koloni terpisah dimurnikan sebanyak tiga kali dengan metode goresan. Koloni murni yang tumbuh dengan penampakan morfologi yang berbeda kemudian dikarakterisasi secara morfologi sesuai dengan prosedur yang dijelaskan oleh John *dkk* 1994. Isolat yang telah dikarakterisasi kemudian disimpan dalam agar miring untuk kebutuhan analisis lebih lanjut.

2. Pengukuran Konsentrasi Amonium

Uji ekskresi amonium dilakukan pada dua medium pertumbuhan yaitu medium *Burks* dan Ashby dengan cara isolat murni pada tabung reaksi disuspensi dengan 5 mL medium cair kemudian diambil sebanyak 1 mL kemudian diinokulasi ke dalam Erlenmeyer yang berisi medium cair 29 mL kemudian diinkubasi dengan cara di *shaker* selama 24 jam pada suhu 27°C. Waktu inkubasi ini adalah waktu dimana sel bakteri diprediksi berada pada fase pertumbuhan eksponensial memasuki fase stasioner. Setelah 24 jam inkubasi, sampel kemudian diambil dan disentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama 15 menit.

Tiga mL supernatan diambil dan diatur ke pH 11 dengan penambahan NaOH 1N kemudian ditambahkan 0,07 ml EDTA, 0,07 ml Sodium Potassium tartrat, dan 0,13 ml reagen *Nessler* (hartono *dkk*, 2009) lalu dihomogenkan dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu 25°C. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 435 nm dengan menggunakan spektrofotometer (Yuen dan Pollard, 1952; Leonard, 1961).

3. Karakterisasi Morfologi dan Fisiologis Isolat Bakteri

Sembilan isolat bakteri penambat nitrogen yang memiliki kemampuan mengekskresikan amonium dengan konsentrasi yang tinggi selanjutnya dikarakterisasi secara morfologi dan fisiologis sesuai dengan metode yang dijelaskan oleh Gothwal *dkk.* (2008). Karakterisasi ini meliputi pengecatan gram, uji katalase, uji hidrolisis pati dan sumber kasein, uji gelatinase, uji reduksi nitrat dan uji methyl-red dilakukan sesuai dengan prosedur standar.

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Isolasi Bakteri Penambat Nitrogen

Hasil isolasi bakteri pada sampel tanah dengan menggunakan dua medium bebas nitrogen diperoleh sebanyak 20 isolat yang memiliki karakteristik koloni yang berbeda. Karakteristik morfologi koloni isolat tersebut disajikan dalam tabel 1.

Isolat yang diperoleh pada penelitian ini adalah isolat bakteri penambat nitrogen karena telah melalui proses seleksi awal dengan menumbuhkannya pada medium bebas nitrogen yaitu Ashby dan Burk's. Medium ini bersifat selektif karena tidak mengandung unsur nitrogen sehingga hanya bakteri yang memiliki kemampuan

menambat nitrogen yang dapat tumbuh pada medium tersebut.

Tabel 1. Karakteristik morfologi koloni isolat bakteri penambat nitrogen.

Nama Isolat	Karakteristik Morfologi Koloni				
	Bentuk	Elevasi	Permukaan	Margin	Warna
ABJ111	Bulat	Cembung	Halus Mengkilap	Rata	Transparan
ABJ211	Tidak teratur	Cembung	Kering	Berombak	Transparan
ABP113	Tidak teratur	Tinggi	Halus Mengkilap	Rata	Putih transparan
ABP131	Tidak teratur	Tinggi	Halus Mengkilap	Berombak	Transparan
ABP143	Tidak teratur	Tinggi	Halus Mengkilap	Rata	Transparan
ABP153	Tidak teratur	Tinggi	Halus Mengkilap	Rata	Transparan
ABP211	Bulat	Tinggi	Halus Mengkilap	Rata	Putih
ABP213	Bulat	Cembung	Halus Mengkilap	Rata	Transparan
ABP242	Tidak teratur	Tinggi	Halus Mengkilap	Berombak	Transparan
ABP245	Bulat	Tinggi	Halus Mengkilap	Rata	Transparan
BBJ221	Bulat	Cembung	Halus Mengkilap	Berombak	Putih Keruh
BBJ222	Tidak teratur	Cembung	Halus Mengkilap	Berombak	Putih Keruh
BBP113	Bulat	Tinggi	Halus Mengkilap	Rata	Putih Keruh
BBP114	Tidak teratur	Tinggi	Halus Mengkilap	Berombak	Transparan
BBP147	Bulat	Tinggi	Halus Mengkilap	Rata	Transparan
BBP212	Bulat	Tinggi	Halus Mengkilap	Rata	Transparan
BBP214	Bulat	Tinggi	Halus Mengkilap	Berombak	Transparan
BBP222	Bulat	Tinggi	Halus Mengkilap	Rata	Kekuningan
BBP232	Bulat	Tinggi	Halus Mengkilap	Rata	Putih transparan
BBP231	Bulat	Tinggi	Halus Mengkilap	Rata	Putih Keruh

Berdasarkan data pada tabel 1 dapat dilihat bahwa sebagian besar isolat bakteri memiliki koloni berbentuk bulat, walaupun ada beberapa isolat yang bentuknya tidak teratur. Bentuk elevasi koloni sebagian besar menunjukkan elevasi yang rata dengan permukaan yang halus mengkilap, sementara margin koloni ada yang rata dan ada yang berombak. Karakter koloni bakteri yang menunjukkan keragaman

cukup tinggi diantara isolat yang diperoleh adalah warna koloni. Data yang diperoleh ini konsisten dengan beberapa data morfologi koloni bakteri penambat nitrogen yang telah dilaporkan pada penelitian sebelumnya oleh Metasari dkk, (2011), Wibowo dkk, (2012), dan Tarigan dkk, (2012). Adanya variasi karakter dari koloni yang berhasil diamati mengindikasikan beragamnya jenis bakteri penambat

nitrogen yang berhasil diisolasi pada tahap ini.

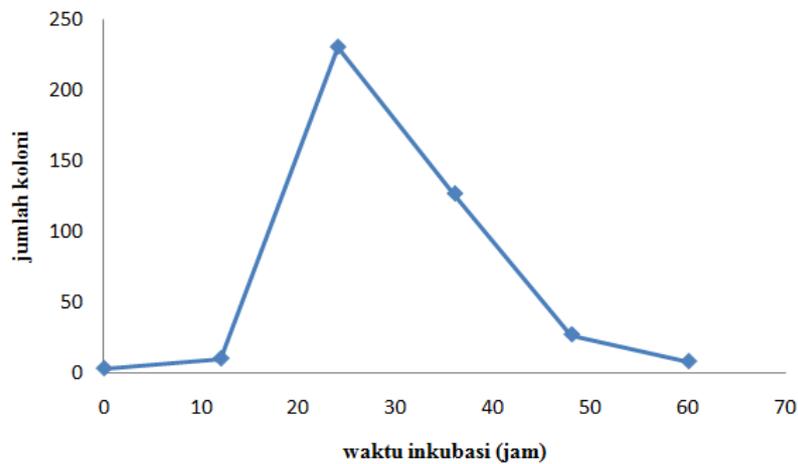
Data pada tabel 1 juga menunjukkan bahwa dari 20 isolat yang berhasil diisolasi, 16 isolat diantaranya berasal dari rhizosfer tanaman padi sementara 4 isolat berasal dari rhizosfer tanaman jagung. Hal ini menunjukkan bahwa keragaman bakteri yang hidup pada rhizosfer tanaman padi lebih tinggi jika dibandingkan dengan tanaman jagung. Pada penelitian ini juga terlihat bahwa tidak ada perbedaan jumlah isolat yang tumbuh pada medium burks's dan medium Ashby.

Isolat dengan karakter morfologi yang sama pada satu medium, tetapi berasal dari sampel tanah yang berbeda tetap dipilih dengan asumsi bahwa isolat tersebut merupakan isolat yang berbeda. Contohnya

isolat ABP213 dengan ABJ111 penampakan morfologinya sama, tapi isolat ini berasal dari sampel yang berbeda. ABP213 berasal dari sampel tanah padi, sedangkan ABJ111 berasal dari tanah jagung.

2. Analisis Kemampuan Eksresi Amonium

Pengukuran konsentrasi amonium pada medium pertumbuhan isolat bakteri penambat nitrogen dilakukan pada waktu inkubasi 24 jam yakni ketika sel bakteri memasuki fase pertumbuhan eksponensial (gambar 1). Pada fase ini kematian sel bakteri sangat rendah sedangkan pertumbuhan sel maksimum sehingga produk amonium yang diekskresikan diasumsikan bukan berasal dari sel yang telah mati dan lisis.



Gambar 1. Grafik pertumbuhan untuk isolat bakteri penambat nitrogen

Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa ekskresi amonium pada bakteri *Clostridium pasterurianum* strain W5 dan *Anabaena siamensis* terjadi pada awal pertumbuhan (*lag phase*) (Zelithc dkk, 1952; Thomas dkk, 1990), sementara penelitian lain yang dilakukan pada bakteri *A. Chrococum*, *A. vinelandii*, dan *Klebsiella pneumoniae* menunjukkan

bahwa ekskresi amonium tertinggi terjadi pada saat pertumbuhan bakteri memasuki akhir fase eksponensial menjelang masuk fase stationer ketika pertumbuhan bakteri mulai berhenti, (Narula dkk, 1981; Bali dkk, 1992)

Hasil pengujian ekskresi amonium pada 20 isolat bakteri penambat nitrogen yang berhasil di isolasi pada tahap pertama,

diperoleh 9 isolat yang memiliki kemampuan ekskresi amonium yang tinggi sebagaimana disajikan dalam tabel 2.

Berdasarkan data pada tabel 2, diketahui bahwa isolat bakteri yang tumbuh pada medium Burk's memiliki ekskresi amonium yang lebih tinggi dari pada hasil dari isolat medium Ashby. Keempat isolat yang tumbuh pada medium Burk's yakni BBJ221, BBJ222, BBP222 dan BBP214 sedangkan isolat dari medium Ashby yaitu isolat ABJ211, ABP213, ABP211, ABP131 dan ABP242. Isolat BBJ222 dari medium pertumbuhan Burk's yang diisolasi dari tanah jagung memiliki angka ekskresi amonium tertinggi yakni 272 µg/L. Iwata dkk, (2010) dan Iwata dkk (2012) melaporkan bahwa bakteri penambat nitrogen strain wildtype yang ditumbuhkan pada medium Burk's yang mengandung sumber karbon sukrosa dengan konsentrasi yang bervariasi dapat menginduksi *A. beijerinckii* mengekskresikan amonium sebesar 0,192 mM sedangkan *A. vinelandii* dapat mengekskresikan amonium dengan konsentrasi 0,63 mM. Penelitian ini juga melaporkan bahwa perbedaan sumber karbon dapat berpengaruh pada kemampuan sel bakteri dalam mengekskresikan amonium.

Tabel 2. Ekskresi amonium pada isolat bakteri penambat nitrogen.

Kode isolat	Konsentrasi Amonium (µg/L)
ABJ211	179
ABP213	269
ABP211	162
ABP131	254
ABP242	104

BBJ221	263
BBJ222	272
BBP222	269
BBP214	257

Hartono dkk (2009) telah melakukan penelitian pada beberapa isolat bakteri penambat nitrogen yang mengekskresikan amonium yaitu GMA1, GMA3, GMA6 dan GMA9. Konsentrasi amonium tertinggi terdeteksi pada medium pertumbuhan isolat GMA6 yaitu 1107,692 µMol. Selain itu, penelitian sebelumnya pun telah berhasil menguji kemampuan ekskresi amonium pada beberapa bakteri penambat nitrogen strain *wild type* seperti *Azotobacter vinelandii* strain OP dengan konsentrasi sebesar 260,251 µM (Gordon dkk, 1983). Penelitian yang dilakukan oleh Bali dkk (1992) melaporkan bahwa isolat bakteri *Azotobacter vinelandii* dapat mengekskresikan amonium dengan konsentrasi sekitar 200 µM.

3. Karakteristik Morfologis dan Fisiologis Isolat Bakteri Penambat Nitrogen

Setiap spesies bakteri memiliki karakteristik yang berbeda antara satu spesies dengan spesies yang lainnya baik itu karakteristik morfologi, fisiologi maupun biokimiawinya. Perbedaan karakter tersebut dapat dijadikan sebagai panduan untuk mengetahui posisi taksonominya. Berdasarkan hal tersebut, maka dilakukan pengujian fisiologis dan morfologis untuk mengetahui karakter-karakter bakteri penambat nitrogen yang telah diperoleh pada penelitian ini. Tabel 3 menunjukkan hasil karakterisasi terhadap 9

isolat bakteri penambat nitrogen yang mengekskresikan amonium tinggi.

Berdasarkan tabel 3 diatas, diketahui bahwa secara umum bakteri penambat Nitrogen yang dikarakterisasi memiliki sel yang berbentuk bulat dan umumnya merupakan jenis gram negatif. Secara umum bentuk sel yang bulat dan sifat dinding sel berupa gram negatif merupakan

salah satu karakter yang umum ditemukan pada bakteri penambat nitrogen (Agustian dkk, 2010; Wibowo dkk, 2012; Tarigan dkk, 2013; Metasari dkk, 2012). Secara umum bakteri penambat nitrogen yang diisolasi dapat menghidrolisis pati sebagai sumber karbon kecuali isolat ABP133 dan dapat mereduksi nitrat.

Tabel 3. Hasil uji mikroskopik dan Fisiologis isolat bakteri penambat nitrogen yang memiliki kemampuan mengekskresikan amonium tinggi

Kode Isolat	Mikroskopik			Biokimiawi				
	Bentuk sel	Gram	Hidrolisis Pati	Reduksi Nitrat	Hidrolisis Gelatin	Katalase	Kasein	Methyl Red
ABJ211	Batang	-	+	+	-	-	-	-
ABP211	Bulat	-	+	+	-	-	-	-
ABP213	Bulat	-	+	+	-	-	-	-
ABP131	Bulat	+	-	+	-	-	-	-
ABP242	Batang	+	+	+	-	-	+	-
BBJ221	Bulat	-	+	+	-	-	+	-
BBJ222	Bulat	-	+	+	+	-	-	-
BBP222	Bulat	-	+	+	-	-	-	-
BBP214	Bulat	-	+	+	+	-	-	-

Pada pengujian hidrolisis gelatin dan kasein hanya 2 isolat yang menunjukkan hasil yang positif yaitu isolat BBJ222 dan BBP214. Penelitian yang dilakukan oleh Firrani (2011), menunjukkan bahwa semua isolat bakteri penambat nitrogen yang diisolasi dari akar kelapa sawit bersifat negatif setelah diuji gelatin. Pada pengujian katalase dan methyl red semua isolat menunjukkan hasil yang negatif. Hal ini menunjukkan bahwa semua isolat yang diteliti tidak memiliki kemampuan dalam mereduksi H₂O₂ dan tidak mampu

memfermentasikan glukosa untuk menghasilkan asam. Sifat katalase negatif dari isolat yang diteliti sangat berbeda dengan hasil penelitian sebelumnya. Stella dkk, (2010) dan Tarigan dkk, (2013) melaporkan bahwa pada penelitian mereka sebelumnya menunjukkan secara umum bakteri penambat nitrogen yang diisolasi dari rhizosfer tanaman mampu mereduksi H₂O₂ atau bersifat katalase positif, sementara penelitian yang dilakukan oleh Metasari dkk, (2012) melaporkan bahwa semua isolat bakteri penambat nitrogen

yang diteliti tidak dapat memfermentasi glukosa menghasilkan asam.

Hasil penelitian pada tabel 3 juga menunjukkan bahwa terdapat 2 kelompok isolat bakteri yang memiliki karakteristik morfologi sel dan fisiologis yang sama, yaitu ABP211 dan ABP213 yang berasal dari rhizosfer tanaman padi dan isolat BBJ222 dan BBP214 dimana isolat BBJ222 berasal dari rhizosfer tanaman jagung sementara BBP214 berasal dari rhizosfer tanaman padi. Jika merujuk pada karakteristik koloni bakteri seperti yang disajikan dalam tabel 1 tampak bahwa kedua pasangan isolat ini memiliki perbedaan. Walaupun demikian diduga pasangan isolat tersebut memiliki hubungan kekerabatan yang dekat karena memiliki kesamaan dalam karakter morfologi sel, fisiologis dan aktivitas ekskresi amonium.

Karakter-karakter yang telah diperoleh pada tahap penelitian ini nantinya akan berguna pada proses identifikasi jenis bakteri penambat nitrogen untuk penentuan posisi taksonominya. Karakteristik morfologi koloni dan sel serta fisiologis yang terkumpul pada tahap penelitian ini belumlah dianggap cukup untuk melakukan identifikasi bakteri. Masih dibutuhkan beberapa tambahan informasi lagi terutama terkait karakteristik biokimiawi dan molekularnya untuk bisa menentukan posisi taksonomi isolat bakteri penambat nitrogen yang diperoleh.

KESIMPULAN

Penelitian ini berhasil memperoleh 20 isolat bakteri penambat nitrogen yang setelah dilakukan uji ekskresi amonium diperoleh 9 isolat yang memiliki

kemampuan mengekskresikan amonium tinggi dengan konsentrasi yang bervariasi antara 104 µg/L – 272 µg/L. Isolat dengan kode BBJ222 dari medium pertumbuhan Burk's memiliki kemampuan ekskresi amonium paling tinggi yakni 272 µg/L. Kesembilan isolat tersebut memiliki karakteristik morfologi dan fisiologis yang bervariasi terutama pada sifat struktur dinding sel (gram), kemampuan hidrolisis pati, gelatin dan kasein, sementara kemampuan dalam mereduksi nitrat dan H₂O₂ (reaksi katalase positif) serta fermentasi glukosa menunjukkan karakter yang seragam.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kami ucapkan kepada Direktorat Jendral pendidikan Tinggi (Dirjen Dikti) Republik Indonesia dan Lembaga Penelitian (Lemlit) Universitas Negeri Makassar atas bantuan dana Penelitian Hibah Bersaing (PHB) Tahun 2013 untuk jangka 1 tahun.

DAFTAR PUSTAKA

- Agustian, Nuriyani, Maira L, Emalinda O. 2010. *Rhizobakteria Penghasil Fitohormon IAA pada Rhizosfir Tumbuhan Semak Karamunting, Titonia, dan Tanaman Pangan*. J. Solum. 7(1): 49-60.
- Baldani JI, L Caruso V, Baldani LD, Silvia RG, Dobreiner J. 1997. *Recent advance in BNF with non-legume plants*. Soil Biology and Biochemistry.
- Bali A, Blanco G, Hill S, Kennedy C. 1992. *Excretion of amonium by a nifL mutant of Azotobacter vinelandii fixing nitrogen*. Appl. Environ. Microbiol. 58:1711–1718.
- Benson. 2001. *Microbiological Applications Lab Manual Eighth Edition*. The McGraw-Hill Companies.

- Bruehl GW. 1987. *Soilborne Plant Pathogen*. New York : Macmillan Publishing Company.
- Brewin B, Woodley P, Drummond M. 1999. *The Basis of Ammonium Release in nifL Mutants of Azotobacter vinelandii*. Journal of Bacteriology. 181: 7356–7362.
- Colnaghi R, Green A, Luhong H, Rudnick P, Kennedy C. 1997. *Strategies for increased ammonium production in free-living or plant associated nitrogen fixing bacteria*. Plant Soil. 194:145–154.
- Castorph H, Kleiner D. 1984. *Some properties of Klebsiella pneumoniae ammonium transport negative mutant (Amt)*. Arch. Microbiol. 139: 245–247.
- Dobbelaere S, Vanderleyden J, Okon Y. 2003. *Plant Growth-Promoting Effects of Diazotrophs in the Rhizosphere*. Critical Reviews in Plant Sciences. 22(2): 107–149.
- Firrani M. 2011. *Isolasi dan Uji Kemampuan Bakteri Endofit Diazotrof yang Memfiksasi Nitrogen Bebas pada Akar Kelapa Sawit (Elaeis guineensis Jacq.)*. [Skripsi]. Medan. Universitas Sumatera Utara
- Gordon JK, Jacobson MR. 1983. *Isolation and characterization of Azotobacter vinelandii mutant strains with potential as bacterial fertilizer*. Can. J. Microbiol. 29: 973–978.
- Gothwal RK; Nigam VK, Mohan MK, Sasmal D, Gosh P. 2008. *Screening Of Nitrogen Fixers From Rhizospheric Bacterial Isolats Associated With Important Desert Plants*. Applied ecology and environmental research.
- Hartono, Widada J, kabirun S. 2009. *16s rRNA Sequence Analysis and Ammonium Excretion Ability Of Nitrogen Fixing Bacteria Isolatd From Mineral Acid Soil*. Indonesian Journal of Biotechnology. 14(22).
- Iwata K, Azlan A, Yamakawa H, Omori T. 2010. *Ammonia accumulation in culture broth by the novel nitrogen-fixing bacterium, Lisobactersp. E4*. Journal of Bioscience
- Iwata K, Yu SS, Azlan A, Omori T. 2012. *Ammonia Accumulation of Novel Nitrogen-Fixing Bacteria. Biotechnology - Molecular Studies and Novel Applications for Improved Quality of Human Life*. InTech Janeza Trdine: Croatia.
- Jack WN, Wilson PW, Burris RH. 1953. *Direct demonstration of ammonia as an intermediate in nitrogen fixation by Azotobacter*. J. Biol. Chem. 204.
- James E, FL Olivares. 1997. *Infection and colonization of sugarcane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophicus*. Plant Science. and Bioengineering. 110(4): 415-418.
- John GH, Noel RK, Peter HAS, James TS, Stanley TW. 1994. *Aerobic / Microaerophilic , motile , helical / vibroid Gram negative bacteria*. In: *Bergey's Manual of determinative bacteriology*. USA: Lippincott Williams & Wilkins.
- Kleiner D. 1982. *Ammonium (methylammonium) transport by Klebsiella pneumoniae*. Biochim. Biophys. Acta. 688: 702- 708.
- Leonard RH. 1961. *Quantitative Range Of Nessler's Reaction With Ammonia*. Clinical Chemistry.
- Metasari K. 2011. *Eksplorasi Bakteri Penambat Nitrogen Non Simbiosis Dari Tanah Kawasan Mangrove Wonorejo Surabaya*. Surabaya: Universitas Airlangga.
- Narula N, Lakshminarayana K, Tauro P. 1981. *Ammonia excretion by Azotobacter chroococcum*. Biotech. Bioeng. 23: 467-470.
- Reitzer. 1996, dalam Colnaghi R, Green A, Luhong H, Rudnick P, Kenney C. 1997. *Strategies for increased ammonium productions in free-living or plant associated fixing bacteria*. Plant and Soil.

- Stella M, Suhaimi M. 2010. *Selection of suitable growth medium for free-living diazotrophs isolated from compost*. J. Trop. Agric. and Fd. Sc. 38(2): 211– 219.
- Subba Rao NS. 1984. *Biofertilizers in agriculture*. New Delhi: Oxford & IBH Publishing Co.
- Tarigan RS, Jamilah I, Elimasni. 2012. *Seleksi Bakteri Penambat Nitrogen dan Penghasil Hormon IAA (indole acetic acid) dari Rizosfer Tanah Perkebunan Kedelai (glycine max L.)*. <http://repository.usu.ac.id/bitstream/123456789/38222/7/Cover.pdf>
- Thomas SP, Zaritsky A, Boussiba S, 1990. *Ammonium excretion by an L-methionine-DL-sulfoximine resistant mutant of the rice field Cyanobacterium Anabaena siamensis*. Appl. Environ. Microbiol. 56: 3499-3504.
- Wibowo AM, Supriyanto A, Hariyanto S. 2012. *Eksplorasi Bakteri Penambat Nitrogen dan Bakteri Pelarut Fosfat pada Tanah Gambut di Provinsi Kalimantan Timur*. <http://biologi.fst.unair.ac.id/wp-content/uploads/2012/04/Jurnal-Eksplorasi-Bakteri-Ario-080710379.pdf>
- Weninger CC, Van Veen JA. 1991. *NH₄⁺-Excreting Azospirillum brasilense mutants enhance the nitrogen supply of Wheat host*. Appl. Environ. Microbiol. 57: 3006-3012.
- Yuen SH, Pollard AG. 1952. *The Determination Of Nitrogen In Agricultural Materials By The Nessler Reagent. I-Preparation Of The Reagent*. The Scottish School of Bakery. The Royal Technical Collega Glasgow, C.I.
- Zelitch I, Rosenblum ED, Burris RH, PW Wilson. 1951. *Isolation of the key intermediate in biological nitrogen fixation by Clostridium*. J. Bact. 62: 747-298.