

## “Optimalisasi Pertanian Berkelanjutan untuk Mendukung Indonesia Emas 2045”

---

Isolasi dan Karakterisasi *Rhizobium* dari Rhizosfer Kacang Tanah (*Arachis hypogaea*) serta Aplikasinya sebagai Pupuk Hayati pada Pertumbuhan Akar Kedelai (*Glycine max*)

**Yohanna Anisa Indriyani<sup>1</sup>, Hengki Tornado<sup>2</sup>, Aditya Dyah Utami<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Alumni Program Studi Ilmu Tanah, Fakultas Pertanian, IPB University

<sup>2</sup>Alumni Program Studi Bioteknologi Tanah dan Lingkungan, Fakultas Pertanian, IPB University

<sup>3</sup>Program Studi Ilmu Tanah, Fakultas Pertanian, Universitas Lambung Mangkurat

e-mail: aditya.utami@ulm.ac.id

### Abstrak

Unsur hara N merupakan hara makro yang mendukung pertumbuhan tanaman. *Rhizobium* adalah salah satu mikrob tanah yang berperan dalam memfiksasi N<sub>2</sub> atmosfer sehingga N tersedia bagi tanaman. Tujuan penelitian yaitu mengkaji kelimpahan *Rhizobium* dari rhizosfer kacang tanah serta aplikasinya sebagai pupuk hayati sehingga dapat mendukung pertumbuhan tanaman. Sampel tanah yang digunakan dari rhizosfer kacang tanah dengan menggunakan bintil akar. Tahapan penelitian meliputi isolasi *Rhizobium*, karakterisasi (morfologis dan fisiologis) dan perbanyakan *Rhizobium* serta inokulasi *Rhizobium* pada tanaman kedelai. Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolasi bakteri *Rhizobium* berhasil dengan ditunjukkan dengan informasi karakter morfologi dan pengujian fisiologis. *Rhizobium* yang berhasil diisolasi bersifat aerob dan non-motil serta termasuk dalam bakteri gram negatif. Aplikasi *Rhizobium* meningkatkan pertumbuhan akar tanaman.

Kata kunci: Inokulasi, Mikrob, Nitrogen, Pertumbuhan tanaman, Simbiosis

### Pendahuluan

Kelompok mikrob tanah yang salah satunya banyak mendapatkan perhatian adalah *Rhizobium*. *Rhizobium* sangat erat kaitannya dalam membantu kebutuhan manusia pada bidang pertanian. *Rhizobium* secara umum termasuk bakteri heterotrof yaitu sumber energinya berasal dari oksidasi senyawa-senyawa organik seperti sukrosa dan glukosa (Vargas et al., 2023). Mikrob tersebut merupakan mikrob simbiosis dapat bersimbiosis dengan tanaman kacang-kacangan (legume) dengan membentuk nodul dan memiliki peranan yang sangat penting. Simbiosis antara *Rhizobium* dan tanaman kacang-kacangan (legume) merupakan salah satu

bentuk simbiosis mutualisme. *Rhizobium* dapat memfiksasi  $N_2$  dari atmosfer apabila berasosiasi dengan akar tanaman legume dengan membentuk nodul (Almeida et al., 2023; Li et al., 2022). Kemampuan dalam menambat  $N_2$  dari atmosfer sehingga dapat menyediakan N yang tidak tersedia menjadi tersedia untuk tanaman inangnya (legume) (Mpongwana et al., 2024; Imran et al., 2024).

Oleh karena hal tersebut saat ini *Rhizobium* telah dimanfaatkan dalam budidaya pertanian untuk meningkatkan ketersediaan N bagi tanaman sehingga mengurangi penggunaan pupuk anorganik (Xu et al., 2023). Beberapa penelitian tentang peran *Rhizobium* sebagai pupuk hayati telah dilakukan. Hasil penelitian Purwani & Sucahyono (2020), inokulan *Rhizobium* yang didapatkan dari hasil isolasi rhizosfer kedelai dan putri memiliki potensi sebagai pupuk hayati. Aplikasi *Rhizobium* dapat menggunakan bahan pembawa berupa biochar dan gambut (Purwani & Sucahyono, 2020). Selain itu, pemanfaatan *Rhizobium* yang dikombinasikan dengan pupuk organik mampu meningkatkan pertumbuhan kedelai (Fransiska et al., 2023), sedangkan aplikasi *Rhizobium* mempengaruhi pembentukan polong pada kacang tanah (Inokulasi et al., 2022). Oleh karena itu, diperlukan suatu penelitian yang mengkaji kelimpahan *Rhizobium* dari rhizosfer kacang tanah serta aplikasinya sebagai pupuk hayati sehingga dapat mendukung pertumbuhan akar tanaman serta mengurangi penggunaan pupuk anorganik.

## **Metodologi**

Pengambilan sampel tanah dilakukan pada rhizosfer kacang tanah dengan cara komposit. Isolasi *Rhizobium* dengan cara menggunakan bintil akar kacang tanah sebanyak 1 g diambil dan dicuci dengan aquades steril. Bintil kembali dicuci melalui perendaman dengan alkohol 70% selama 5 menit. Bintil dihancurkan menggunakan mortar (secara aseptis) kemudian dimasukkan pada garam fisiologis. Larutan tersebut didiamkan hingga bintil akar yang telah dihancurkan mengendap. Larutan suspensi diambil sebanyak 1 ml untuk dilakukan *serial dilution*, yakni dengan mengencerkan 1 ml suspensi ke dalam 9 ml larutan garam fisiologis kemudian divortex agar homogen. Seri pengenceran dibuat sampai tingkat  $10^{-6}$ . Larutan suspensi dari pengenceran  $10^{-4}$ - $10^{-6}$  sebanyak 0.1 ml diinokulasikan pada medium YEMA (ulangan dibuat sebanyak dua kali). Populasi mikrob yang akan didapatkan dengan inokulasi seri pengenceran tersebut adalah  $10^5$ - $10^7$ cfu/ml. Medium yang telah diinokulasi kemudian diinkubasi selama 2-3 hari pada  $34$ - $37^{\circ}C$ .

Identifikasi dan karakterisasi morfologi *Rhizobium* dilakukan dengan mengamati koloni-koloni yang muncul pada medium YEMA pada cawan petri, yakni dengan mengamati

ukuran, warna, bentuk, tepian, elevasi, serta permukaan koloni. Setelah itu, dilakukan perbandingan dengan ciri-ciri morfologis *Rhizobium* berdasarkan literatur yang ada.

Uji gram dilakukan dengan metode Vincent (1970) dengan menggunakan *crystal violet*, iodine, alkohol 95%, dan safaranin. Setelah dilakukan pewarnaan gram kemudian diamati di bawah mikroskop. Masing-masing isolat kemudian diidentifikasi apakah termasuk Gram negatif (warna koloni ungu) ataukah Gram positif (warna koloni merah).

Uji motilitas dilakukan dengan menggoreskan secara vertikal pada medium semisolid. Masing-masing isolat digoreskan secara vertikal pada medium semisolid (metode tusukan) kemudian diinkubasi selama 1-2 hari pada suhu ruang. Motilitas bakteri ditunjukkan dengan adanya pertumbuhan yang menyebar (tidak hanya pada bekas/alur tusukan). Bakteri non motil hanya akan tumbuh di sepanjang alur tusukan.

Uji kebutuhan oksigen dilakukan dengan mengencerkan terlebih dahulu satu ose isolat ke dalam 9 ml larutan garam fisiologis, kemudian 1 ml suspensi dari masing-masing isolat diinokulasikan secara aseptis pada medium yang sesuai (YEM cair untuk *Rhizobium* dan NB untuk isolat penghasil antibiotik). Masing-masing perlakuan dibuat duplo dan diinkubasi selama 1-2 hari pada suhu ruang. Kebutuhan oksigen pada masing-masing isolat ditandai oleh tipe pertumbuhan bakteri yaitu dekat permukaan medium (aerob), di dasar tabung (anaerob); mikroaerofilik, atau lainnya.

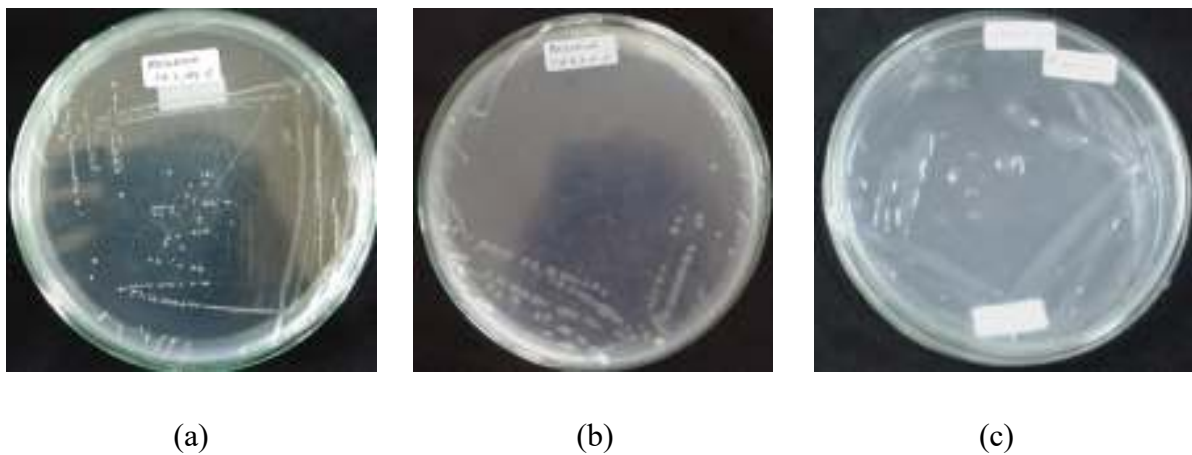
Inokulasi *Rhizobium* pada tanaman kedelai dilakukan dengan menumbuhkan *Rhizobium* pada media YEMA dan diinkubasi selama 24 jam. Larutan YEMA dituangkan pada cawan petri yang telah ditumbuhi oleh bakteri *Rhizobium*, kemudian dibantu dengan menggunakan ose untuk melepas bakteri dari media. Larutan tersebut kemudian dimasukkan ke dalam larutan YEMA sebanyak 250 ml, kemudian dishaker selama 5 hari. Setelah dishaker selama 5 hari, kerapatan bakteri dihitung dengan menggunakan metode *total plate count* (TPC). Bakteri *Rhizobium* sebanyak 5 ml kemudian disuntikan ke dalam pupuk kompos sebanyak 50 g. Kompos tersebut kemudian diberikan ke tanaman kedelai yang berumur 14 HST. Tanaman kedelai dipanen setelah 4 minggu dan dilakukan pengamatan panjang akar.

## **Hasil dan Pembahasan**

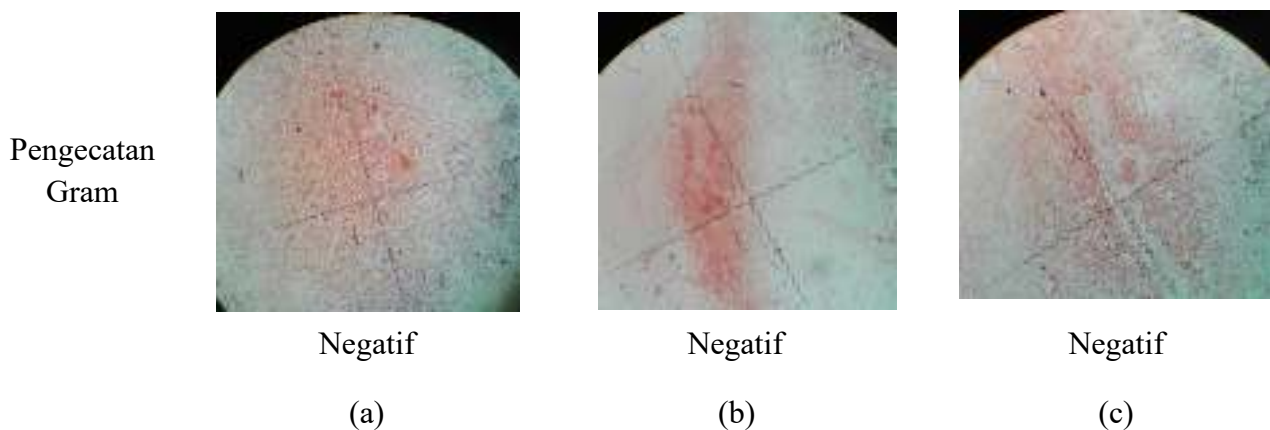
*Rhizobium* bersimbiosis dengan tanaman legum, sehingga untuk mendapatkan isolat bakteri tersebut maka diisolasi dari bintil akar tanaman-tanaman Leguminosae (Chaurasia et al., 2024). Bintil akar yang dapat dipilih adalah bintil dengan ukuran besar (ukuran bintil menggambarkan jumlah populasi *Rhizobium*) dan adanya warna merah ketika bintil dibelah.

Warna merah ini merupakan leghaemoglobin, pigmen yang dijumpai dalam bintil akar (antara bakteroid dan selubung membran yang mengelilinginya) (Singh et al., 2019).

Hasil isolasi yang dilakukan terhadap bintil akar tanaman kacang tanah, berhasil diperoleh tiga isolat *Rhizobium*. Ketiga isolat tersebut adalah Rhi1, Rhi2, dan Rhi3. Ketiga isolat kemudian di-*streak* ulang untuk mendapatkan isolat tunggal/murni (Gambar 1). *Rhizobium* karena memiliki ciri-ciri morfologis *Rhizobium*, di antaranya berwarna putih susu, berbentuk bulat, dan memiliki permukaan koloni yang agak mengkilat (Gauri et al. 2011).



Gambar 1. Hasil *streak* ulang isolat (a) Rhi1, (b) Rhi2, (c) Rhi3



Gambar 2. Hasil pewarnaan gram (a) Rhi1, (b) Rhi2, (c) Rhi3

Selain jumlah koloni, pengamatan terhadap karakteristik morfologis juga dilakukan. Berdasarkan hasil pengecatan gram menunjukkan bahwa ketiga isolat merupakan bakteri kelompok *Rhizobia*. Hal ini semakin dikuatkan dengan hasil pengecatan Gram yang

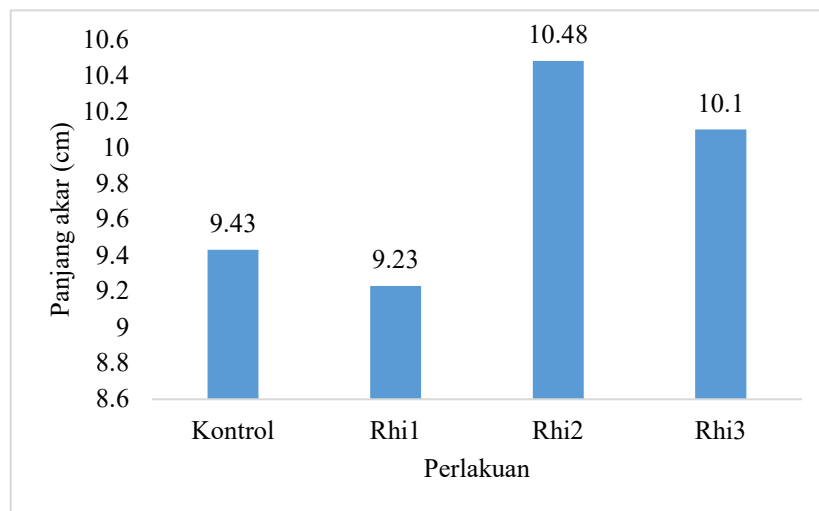
menunjukkan bahwa ketiganya adalah bakteri Gram negatif (Gambar 2). Bakteri Gram negatif merupakan kelompok bakteri yang memiliki membran luar terdiri dari lipid, protein, dan lipopolisakarida, sedangkan sementara peptidoglikannya berada di antara membran dalam dan membran luar sel. Hal ini berbeda dengan kelompok bakteri Gram positif yang memiliki dinding sel berupa lapisan peptidoglikan tebal. Oleh karena itu, bakteri Gram negatif tidak dapat mengikat/mempertahankan warna *crystal violet* (cat pertama dalam pengecatan Gram) sehingga akan nampak berwarna merah di bawah mikroskop. Hal ini karena lapisan luar sel mengikat dengan erat warna penutup dalam Gram *staining*, yakni safranin yang berwarna merah (Enowashu et al., 2012; Bakteri et al., 2022).

Karakterisasi *Rhizobium* juga dilakukan secara fisiologis. Hasil pengujian terhadap sifat-sifat fisiologis isolat *Rhizobium* Rhi1, Rhi2, dan Rhi3 sebagaimana disajikan dalam Tabel 1. Isolat Rhi1, Rhi2, dan Rhi3 menunjukkan karakteristik sebagai kelompok bakteri *Rhizobium*. Berdasarkan Tabel 1 diketahui bahwa *Rhizobium* bersifat aerob yang memerlukan oksigen selama respirasi selulernya. *Rhizobium* juga non-motil yang artinya tidak memiliki alat gerak untuk mobilitasnya. Hal ini sebagaimana hasil penelitian Gauri *et al.* (2011) bahwa ciri-ciri kelompok *Rhizobium* di antaranya memiliki kemampuan dalam melakukan fermentasi gula (misal glukosa dan sukrosa), katalase dan oksidase positif, bersifat aerob (membutuhkan oksigen dalam pertumbuhannya), dan non-motil.

Tabel 1. Karakteristik fisiologis *Rhizobium*

Isolat	Kebutuhan O <sub>2</sub>	Motilitas
Rhi1	Aerob	Non-motil
Rhi2	Aerob	Non-motil
Rhi3	Aerob	Non-motil

Berdasarkan hasil isolasi *Rhizobium* dari sampel bintil akar kacang tanah, telah diperoleh 3 isolat *Rhizobium* dengan sifat morfologis dan fisiologis yang telah diketahui. Ketiga kontrol tersebut (Rhi1, Rhi2, dan Rhi3) cukup potensial untuk dikembangkan lebih lanjut sebagai pupuk hayati. Isolat diaplikasikan pada tanaman kedelai dengan bahan pembawa kompos. Hasil penelitian menunjukkan bahwa aplikasi *Rhizobium* mempengaruhi pertumbuhan akar tanaman (Gambar 3). Tanaman kedelai yang diaplikasikan *Rhizobium* cenderung memiliki akar yang lebih panjang dibandingkan dengan kontrol. Aplikasi *Rhizobium* akan membantu dalam ketersediaan unsur N. Unsur tersebut merangsang pembelahan sel pada meristem apikal, sehingga menyebabkan akar bertambah panjang (Sun et al., 2021; Severo et al., 2020).



Gambar 3. Pengaruh aplikasi *Rhizobium* terhadap panjang akar tanaman

### Kesimpulan dan Saran

Isolasi bakteri *Rhizobium* berhasil dengan ditunjukkan dengan informasi karakter morfologi dan pengujian fisiologis. *Rhizobium* yang berhasil diisolasi bersifat aerob dan non-motil serta termasuk dalam bakteri gram negatif. Aplikasi *Rhizobium* meningkatkan pertumbuhan akar tanaman kedelai. Perlu adanya penelitian lebih lanjut terkait pembuatan produk pupuk hayati berdasarkan standar nasional Indonesia (SNI) pupuk hayati.

### Daftar Pustaka

- Almeida, A., Trevenzoli, B., Dong, L., Pablo, D. C., Saenz-mata, J., & Lütken, H. (2023). Plant Physiology and Biochemistry Lessons learned from metabolic engineering in hairy roots : Transcriptome and metabolic profile changes caused by *Rhizobium* -mediated plant transformation in Cucurbitaceae species. 201. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2023.107797>
- Bakteri, I., Pada, K., Tri, G., Of, I., Bacteria, C., Tri, O. N., & Bracelet, D. (2022). Identifikasi bakteri kontaminan pada gelang tri datu volume 7. *Bioma: Jurnal Biologi Makassar*, 7(2), 24–33.
- Chaurasia, J., Poudel, B., Mandal, T., & Acharya, N. (2024). Heliyon Effect of micronutrients , rhizobium, salicylic acid, and effective microorganisms in plant growth and yield characteristics of green gram [*Vigna radiata* ( L .) Wilczek ] in Rupandehi , Nepal. *Heliyon*, 10(5), e26821. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e26821>
- Enowashu, E., Kandeler, E., Schloter, M., Rasche, F., & Engel, M. (2012). Development of a primer system to study abundance and diversity of the gene coding for alanine aminopeptidase pepN gene in Gram-negative soil bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 91(1), 14–21. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.07.001>
- Fransiska, N., Lestari, T., & Santi, R. (2023). Respons pertumbuhan dan hasil kedelai dengan aplikasi pupuk organik dan *Rhizobium*. *Agrotechnology Research Journal*, 7(1), 16–20. <https://doi.org/10.20961/agrotechresj.v7i1.63714>

- Imran, M., Mukkamula, N., Kumar, B. K., Raghu, K., Parray, J. A., Khan, I., Hameeda, B., & Oluranti, O. (2024). South African Journal of Botany Impact of microbial consortium of *Rhizobium tropici* and *Rhizobium mayense* on the growth of *Phaseolus vulgaris* L. *South African Journal of Botany*, 168, 562–572. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2024.04.004>
- Inokulasi, P., Vermikompos, D. A. N., Hadiyah, I., & Milati, P. A. (2022). Pembentukan bintil akar dan hasil kacang tanah (*Arachis hypogaea* L.) the effect of inoculation *Rhizobium* spp. and vermicompost on root nodule formation and yield of peanuts (*Arachis hypogaea* L.). 7(2), 101–111.
- Li, Y., Yu, H., Liu, L., Liu, Y., Huang, L., & Tan, H. (2022). Ecotoxicology and Environmental Safety Transcriptomic and physiological analyses unravel the effect and mechanism of halosulfuron-methyl on the symbiosis between rhizobium and soybean. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 247(November), 114248. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.114248>
- Mpongwana, S., Manyevere, A., & Mupangwa, J. (2024). Heliyon Improving soil fertility through dual inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and *Rhizobium* on a eutric cambisol cultivated with forage legumes in a semi-arid region. *Heliyon*, 10(2), e24817. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e24817>
- Purwani, J., & Suchayono, D. (2020). Viabilitas *Rhizobium* dalam formula bahan pembawa dan cara inokulasi dalam teknik produksi pupuk hayati. *Jurnal Agrosains Dan Teknologi*, 5(2), 99–107.
- Severo, M., Kulmann, D. S., Oliveira, L., Squizani, W., Alberto, G., Fogliarini, C., Hindersmann, J., Luís, Á., Berghetti, P., Machado, M., Colpo, L., & Brunetto, G. (2020). Forest Ecology and Management Nitrogen supply methods affect the root growth dynamics in *Eucalyptus grandis*. *Forest Ecology and Management*, 473(June), 118320. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2020.118320>
- Singh, A. K., Singh, G., & Yadav, G. (2019). Food Industry Waste Material as A Growth Medium for *Rhizobium*. 9, 144–155.
- Sun, X., Ren, W., Wang, P., Chen, F., Yuan, L., Pan, Q., & Mi, G. (2021). Evaluation of maize root growth and genome-wide association studies of root traits in response to low nitrogen supply at seedling emergence. *The Crop Journal*, 9(4), 794–804. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2020.09.011>
- Vargas, A., Quijano, G., Vargas, L., Garc, E., Vargas, L., & Garc, E. (2023). Systems with and Photoinhibition with and Model with and with Nitrification and. 2, 9745–9750. <https://doi.org/10.1016/j.ifacol.2023.10.289>
- Xu, Y., Teng, Y., Wang, X., Ren, W., Zhao, L., Luo, Y., Christie, P., & Greening, C. (2023). Endogenous biohydrogen from a rhizobium-legume association drives microbial biodegradation of polychlorinated biphenyl in contaminated soil. *Environment International*, 176(February), 107962. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2023.107962>