

Isolasi dan Identifikasi Bakteri Penambat Nitrogen Non Simbiotik pada Lahan Restorasi dengan Metode *Legume Cover Crop* (LCC) di Daerah Pasirian Lumajang Jawa Timur

Amik Agisti, Nur Hidayatul Alami, dan Tutik Nur Hidayati
Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS)
Jl. Arief Rahman Hakim, Surabaya 60111 Indonesia
e-mail: tutik@bio.its.ac.id

Abstrak—Penerapan LCC menggunakan kacang tanah (*Arachis hypogaea*) pada lahan pertanian kritis akan mampu meningkatkan kesuburan tanah. Sistem LCC menghasilkan lingkungan perakaran yang sesuai bagi pertumbuhan bakteri. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui kelimpahan dan mengidentifikasi genus bakteri penambat nitrogen non simbiotik pada lahan restorasi di Pasirian, Lumajang dengan penerapan metode LCC. Kelimpahan Bakteri dihitung dengan metode Total Plate Count (TPC). Proses isolasi bakteri diawali dengan pengenceran bertingkat dan diidentifikasi berdasarkan Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Hasil penelitian didapatkan populasi bakteri penambat N non simbiotik di lahan pertanian Pasirian sebelum LCC adalah sebesar $2,7 \times 10^5$ CFU/g dan setelah LCC adalah sebesar $1,8 \times 10^6$ CFU/g, serta didapatkan 30 isolat bakteri penambat nitrogen non simbiotik yang mengarah pada genus *Azotobacter*, *Beijerinckia*, dan *Derxia*. *Azotobacter* merupakan bakteri gram negatif cocoid, *Beijerinckia* merupakan bakteri gram negatif basil, dengan katalase positif dan *Derxia* merupakan bakteri gram negatif basil dengan katalase negatif.

Kata Kunci—Bakteri penambat nitrogen, LCC, Lumajang, non simbiotik.

I. PENDAHULUAN

TANAH di lahan UMKM Multi Agro Makmur, Desa Condro, Kecamatan Pasirian, Kabupaten Lumajang Jawa Timur. ini merupakan tanah yang ditanami secara monokultur. Akibat sistem monokultur dan aplikasi pupuk sintesis yang tidak terkendali, yang diterapkan pada lahan tersebut menyebabkan kerusakan tanah secara biologis, kimia dan fisik. Perbaikan lahan pertanian terus diupayakan, salah satunya dengan menggunakan metode *Legume Cover Crops* (LCC) [1].

Penerapan LCC menggunakan kacang tanah (*Arachis hypogaea*) akan mampu meningkatkan kesuburan tanah. Sistem LCC menghasilkan perakaran yang luas, dengan sistem perakaran yang mampu mengeluarkan eksudat akar. Sehingga mampu menciptakan lingkungan perakaran yang memiliki ketersediaan senyawa nitrogen (NH_4Cl , NaNO_3 dan lainnya), kelembaban, aerasi dan kondisi optimum dan pH yang sesuai bagi pertumbuhan bakteri. Hal ini memberikan

kesempatan lebih besar terhadap kolonisasi mikoriza arbuskular dan kolonisasi mikroba lain, salah satunya bakteri penambat N non simbiotik. Bakteri penambat N non simbiotik menggunakan sumber karbon dari tanaman sebagai sumber energi dalam mengubah gas N_2 menjadi bentuk tersedia bagi tanaman [2].

Mikroba penambat N non simbiotik (*Azospirillum sp*, *Azotobacter sp*, *Aeromonas sp* dan *Aspergillus sp*) memiliki kemampuan ganda dalam penambatan nitrogen bebas dari udara sekaligus sebagai pemantap agregat tanah [3].

Langkah awal dalam pemanfaatan kelompok mikroba ini adalah dengan mengisolasi dari tanah pertanian tersebut untuk kemudian dilakukan studi terhadap karakteristik mikroba.

II. METODE PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Mikrobiologi dan tanah diambil dari lahan pertanian di UMKM Multi Agro, Desa Nguter Kecamatan Pasirian Kabupaten Lumajang. Tanah yang digunakan sebagai sampel untuk analisis biologi, fisik dan kimia tanah diambil pada kedalaman 0 cm sampai 20 cm yang merupakan lapisan *top soil* pada koordinat S 08°13'19.4" dan E 113°07'47.3". Luas area sampling yang digunakan adalah 21x18 meter.

B. Restorasi lahan dengan penerapan metode LCC

Tanah seluas 18x20 m² ditanami dengan tanaman *Legume Cover Crops* (LCC) yaitu dengan ditanami kacang tanah (*Arachis hypogaea*). Dibuat 12 bedeng, setiap bedeng ditanami kacang tanah (*Arachis hypogaea*) dengan jarak tanam 40 cm. Tanah digali hingga kedalam 15-20 cm kemudian dimasukkan 3 biji kacang tanah (*Arachis hypogaea*) pilihan. Ditumbuhkan hingga panen (± 3 bulan).

C. Pengambilan sampel tanah

Sampel tanah diambil pada bedeng seluas 18x 20 m² secara aseptik dengan kedalaman 0-20 cm. Pengambilan dilakukan dengan metode komposit. Sampel tanah diambil sebelum dan sesudah penerapan metode *Legume Cover Cropss* (LCC).

D. Isolasi bakteri penambat nitrogen non simbiotik dari tanah

Sebanyak 10 gram dimasukkan ke dalam elenmeyer yang berisi aquades steril sebanyak 90 ml, selanjutnya dikocok hingga homogen menggunakan vortex. Dari pengenceran tadi diambil 1 ml dimasukkan dalam elenmeyer dan ditambahkan aquades 9 ml lalu diencerkan dengan cara yang sama sampai pengenceran 10⁻⁷. Dari masing-masing pengenceran diambil 1 ml dan dimasukkan dalam cawan petri steril, selanjutnya cawan petri dituang dengan media pertumbuhan dengan metode taburan (*pour plate*). Selanjutnya diinkubasi selama 7 hari pada suhu ruang. Adanya pertumbuhan bakteri penambat nitrogen ditandai dengan zona bewarna biru di sekeliling koloni. Koloni yang dikelilingi zona biru menunjukkan adanya penambatan nitrogen. Dari koloni yang terbentuk, masing-masing diambil dengan jarum ose dan digores pada media NA.

E. Penghitungan kelimpahan bakteri penambat nitrogen non simbiotik

Perhitungan kelimpahan bakteri pada medium menggunakan Colony counter kemudian dihitung dengan rumus:

$$\text{Total Bakteri} = \sum \text{Koloni} \times \text{Faktor pengencer}$$

F. Identifikasi menggunakan uji biokimia bakteri penambat nitrogen

Uji biokimia dilakukan untuk mengetahui karakter masing-masing isolat. Isolat bakteri yang sudah diketahui karakternya kemudian dicocokkan dengan buku panduan *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9th Edition* (Holt, et al., 2000). Uji fermentasi glukosa, uji katalase, fermentasi manitol, thioglikolat, oksidase.

III. HASIL DAN DISKUSI

A. Gambar dan Tabel

Tabel 1.
Hasil Kelimpahan Bakteri Penambat Nitrogen Non Simbiotik

Sampel Tanah	Kelimpahan Bakteri (CFU/g)
Sebelum LCC	2,7x10 ⁵
Setelah LCC	1,8x10 ⁶

Berdasarkan hasil analisis yang telah dilakukan menunjukkan perbedaan jumlah kelimpahan bakteri penambat nitrogen non simbiotik sebelum dan sesudah penerapan LCC. Berdasarkan Tabel 1. tampak bahwa jumlah bakteri penambat nitrogen non simbiotik yang diisolasi setelah dilakukan LCC lebih banyak daripada sebelum dilakukan LCC. Hal ini menunjukkan adanya kecenderungan kenaikan kelimpahan bakteri penambat nitrogen non simbiotik setelah dilakukan penerapan LCC.

Akar tanaman mempengaruhi kehidupan mikroorganisme

dan secara fisiologis mikroorganisme yang berada dekat dengan daerah perakaran akan lebih aktif daripada yang hidup jauh dari daerah perakaran [4]. Salah satunya adalah bakteri penambat nitrogen non simbiotik yang mengalami peningkatan setelah penerapan LCC. Sistem LCC memperbaiki media tumbuh mikroba dalam tanah. Populasi *Azotobacter* pada lahan alang alang sekitar 5x10³, sedangkan populasi *Azotobacter* pada lahan dengan system LCC meningkat menjadi 2 kali [5].

Tabel 2.
Hasil Pengujian Parameter Fisik dan Kimia Sampel Tanah Sebelum dan Setelah LCC (Per g Tanah)

Parameter	Sebelum LCC (*)	Kategori (**)	Sesudah LCC (*)	Kategori (**)
N total (%)	0,13	Rendah	0,07	sangat rendah
P (mg/Kg)	25,15	Tinggi	46,64	sangat tinggi
K (mg/100g)	0,36	sedang	0,52	Sedang
pH	6,2	agak masam	6,4	agak masam

*Hasil uji laboratorium sampel tanah (2014)

**Departemen Pertanian (1983)

Berdasarkan hasil analisis, seperti pada Tabel 2, ditunjukkan bahwa pH sebelum dan setelah penerapan LCC tidak jauh berbeda, namun terjadi perubahan yang signifikan pada parameter kimia tanah yaitu peningkatan jumlah P dan K serta penurunan N. Perubahan tersebut dimungkinkan adanya pengaruh dengan penerapan sistem LCC menggunakan kacang tanah.

Pada saat pengambilan sampel tanah di daerah Pasirian merupakan musim penghujan. Dari hasil uji sifat fisik dan kimia tanah menunjukkan bahwa tanah di pasirian, Lumajang tergolong tang lempung berpasir. Sifat fisik lahan kering yang memiliki struktur berpasir, mudah mengalami pencucian. Pada kondisi curah hujan tinggi, unsur alkali tanah (Na, K, Ca, dan Mg) banyak yang tercuci. Pada lahan kering yang mudah tererosi, rentan terjadi kehilangan unsur hara oleh adanya proses erosi dan pencucian (*leaching*) yang dapat menyebabkan unsur hara terbawa ke bagian dalam tanah. Nitrogen (N) adalah unsur yang sangat mudah mengalami pencucian, sehingga pada tanah kering jumlah nitrogen menjadi semakin terbatas [6].

Kacang tanah yang termasuk tanaman *Leguminosa* mempunyai kemampuan untuk membentuk bintil akar yang mampu menambat nitrogen bebas dari udara. Kemampuan membentuk bintil akar ini mensuplai N dalam tanah. Disisi lain tanaman kacang tanah termasuk tanaman yang membutuhkan N dalam jumlah yang besar untuk pertumbuhannya. acang tanah nitrogen sebanyak 15-20 kg N/ha. Kondisi ini yang memungkinkan terjadinya penurunan N setelah penerapan LCC. Dari hasil pengamatan kandungan nitrogen total dalam tanah sebelum LCC lebih besar daripada setelah LCC. Diketahui kandungan nitrogen total sebelum LCC yaitu 0,13 (%) sementara kandungan N total setelah LCC turun menjadi sebesar 0,07 (%) [7].

Selain itu penurunan jumlah N total setelah penerapan LCC dimungkinkan karena di dalam tanah terdapat pula mikroba yang mampu melakukan proses nitrifikasi dan denitrifikasi sehingga N tersedia lepas dalam bentuk NO₂ ke atmosfer [8].

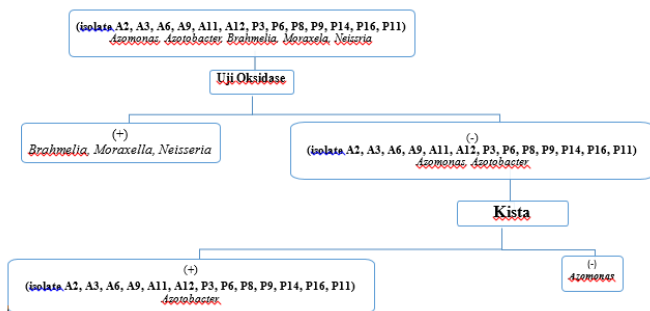
Ketersediaan fosfor didalam tanah ditentukan oleh banyak faktor, tetapi yang paling penting adalah pH tanah. Pada tanah dengan pH rendah, fosfor akan bereaksi dengan ion besi dan aluminium. Pada tanah dengan pH tinggi, fosfor akan bereaksi dengan ion kalsium. Dengan demikian, tanpa memperhatikan pH tanah, pemupukan fosfor tidak akan berpengaruh bagi pertumbuhan tanaman [9], pH tanah netral terletak antara 6.5 – 7.5 [10]. pH tanah pertanian cabai sebelum dan setelah LCC adalah 6.4. Hal ini menunjukkan bahwa pH tanah pertanian cabai Lumajang mendekati netral. Banyak penelitian yang mengemukakan pendapat tentang kisaran pH tanah yang mendukung ketersediaan dan kelarutan P paling tinggi, yaitu 6.5-7.0 [11].

B. Identifikasi Genus Bakteri Penambat Nitrogen Non Simbiotik

Hasil isolasi bakteri tanah pada lahan perkebunan cabai di wilayah Pasirian Jawa Timur, sebelum penerapan LCC didapatkan 12 isolat dan 18 isolat pada sesudah penerapan LCC. Semua isolat dilakukan purifikasi, pengamatan makroskopik, pengamatan mikroskopik dan uji biokimia yang merupakan tahapan dalam identifikasi bakteri. Isolat sebelum LCC diberi kode A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8, A9, A10, A11 dan A12. Sedangkan isolat sebelum LCC diberi kode P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10, P11, P12, P13, P14, P15, P16, P17, dan P18.

Dari hasil analisa yang telah dilakukan ditemukan 3 kecenderungan genus bakteri penambat nitrogen non simbiotik yang ditemukan di daerah Pasirian Lumajang, yaitu *Azotobacter*, *Beijerinckia*, dan *Derxia*.

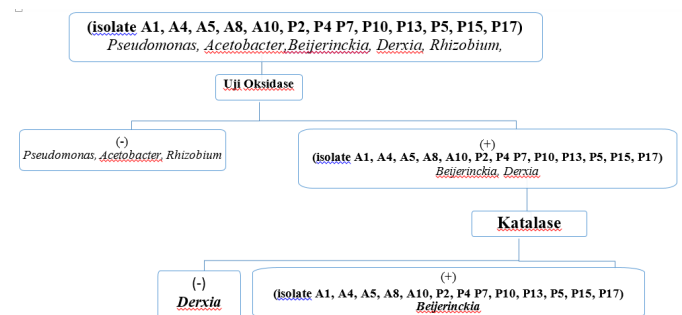
Sebanyak 13 isolat cenderung masuk ke dalam genus *Azotobacter*. Karakter kunci utama genus *Azotobacter* adalah sel berbentuk coccid, oksidase negatif, katalase positif dan membentuk kista (Gambar 1.) yang berfungsi untuk melindungi dari keadaan lingkungan yang ekstrim, misalnya kekeringan, sinar ultraviolet dan radiasi ion [12]. *Azotobacter* merupakan bakteri berbentuk kokus yang berukuran 1,5-2,0 µm. tidak membentuk endospora tapi kista. Bergerak dengan flagella, bersifat aerob dan kemoorganotrof, menggunakan gula, alkohol, garam dari bahan organik untuk tumbuh, katalase positif. pH optimum pada 7-7,5 dan biasa ditemukan di tanah dan air. Spesies tertentu dapat berasosiasi dengan akar tumbuhan [13].



Gambar 1. Diagram Dikotomi Karakterisasi Bakteri Gram Negatif Coccid Isolat A (A1, A4, P7, P10, P13) yang mempunyai bentuk

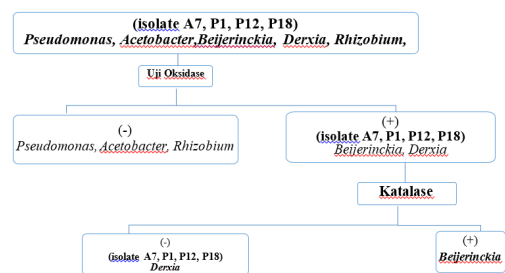
koloni bulat, tepian koloni utuh, permukaan koloni cembung dan warna putih bening. Isolat D (A5, A8, P2, P5, P15) mempunyai bentuk koloni bulat, tepian koloni berombak, permukaan koloni timbul dan warna putih. Isolat F (A10, P4, P17) mempunyai bentuk koloni bulat, tepian koloni utuh, permukaan koloni cembung dan warna putih kemerahan cenderung tergolong genus *Beijerinckia*. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan bakteri golongan *Beijerinckia* menunjukkan kenampakan pigmentasi pada koloni seperti *B. indica* subsp. *indica* LMG 2817T yang berwarna putih; *B. fluminensis* LMG 2819 berwarna cream; *B. fluminensis* CIP 106281T berwarna kecoklatan (Monike *et al.*, 2009).

Karakter kunci dari genus *Beijerinckia* adalah sel berbentuk basil, gram negatif, oksidasi positif, katalase positif (Gambar 2.).



Gambar 2. Diagram Dikotomi Karakterisasi Bakteri Gram Negatif Basil

Isolat A7, P1, P12 dan P18 cenderung masuk ke dalam genus *Derxia*. Karakter kunci utama genus *Derxia* adalah sel berbentuk basil, oksidase positif dan katalase negatif (Gambar 3.).



Gambar 3 Diagram Dikotomi Karakterisasi Bakteri Gram Negatif Basil

Derxia gummosa yang banyak ditemukan di wilayah tropis Amerika Utara, mampu tumbuh dengan baik pada pH 4,5-6,5 [14]. Penelitian lain menyebutkan bahwa *Derxia gummosa* mampu menggunakan metana dan methanol sebagai sumber karbon. Tumbuh pada glukosa, fruktosa, manitol, etanol, glycerol, dan sangat baik pada sorbitol. Umum dijumpai pada tanah tropis. *Derxia gummosa* juga mampu melakukan fiksasi nitrogen secara efektif dengan range yang luas pada pH dan pO₂ [15].

IV. KESIMPULAN/RINGKASAN

Berdasarkan perhitungan populasi bakteri, pengamatan karakteristik bakteri dan uji potensi penambat nitrogen (N) oleh bakteri penambat N non simbiotik sebelum dan setelah LCC di lahan pertanian Pasirian, dapat disimpulkan:

- 1) Kelimpahan populasi bakteri penambat N non simbiotik di lahan pertanian Pasirian cenderung mengalami kenaikan dari sebesar $2,7 \times 10^5$ CFU/g sebelum LCC menjadi sebesar $1,8 \times 10^6$ CFU/g setelah LCC.
- 2) Genus bakteri penambat nitrogen non simbiotik yang ditemukan pada lahan pertanian Pasirian dengan penerapan metode LCC adalah *Azotobacter* sp., *Beijerinckia* sp. dan *Derrxia* sp.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis A.A. (inisial nama mahasiswa) mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Republik Indonesia yang telah memberikan dukungan finansial.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Saribay, G., Fid'an. *Growth and nitrogen fixation dynamics of Azotobacterchroococcum in nitrogen-free and omw containing medium*. The middle east technical university. (2003) p:1-12.
- [2] Killham, K. *Soil ecology*. Cambridge : University Press. (1994).
- [3] Nurhayati, Hesti. *Isolasi Dan Seleksi Bakteri Penambat Nitrogen Non Simbiotik Dari Lahan Kering Masam*. Thesis. Jurusan Biologi Fakultas Sains Dan Teknologi Universitas Islam Negeri (Uin) Malang. Malang. (2006).
- [4] Schottendrei, M. and U. Falkengren-greup. *Plant induced alteration in the rhizosphere and the utilization of soil heterogenicity*. Plant Soil. (1999) 209: 297-309.
- [5] Sudharto, T., Suwardjo, H., Erfandi, D., Budhyastoro, T. *Permasalahan dan Penanggulangan Lahan Alang Alang*. Prosiding Seminar Lahan Alang Alang: Pemanfaatan Lahan Alang Alang untuk Usaha Tani Berkelanjutan. (1993). Bogor, 1 Desember 1992. Puslittanak. Bogor.
- [6] Suciati, H. *Populasi Jamur Mikoriza Vesikular-Arbuskular Pada Lahan Bekas Galian Emas Yang Direklamasi Dengan Legum Tumbuh Cepat Dikombinasikan Dengan Penutup Tanah Dan Mikroba*. Berk. Penel. Hayati. (2006) 12 (45-49). Bidang Mikrobiologi, Puslit Biologi – Lipi Jl. H. Juanda 18, Bogor 16122. Surabaya.
- [7] Yulhasmir. *Respon Pertumbuhan dan Produksi Tanaman Kacang Tanah (Arachis hypogea. L) Terhadap Dosis dan Waktu Pemberian Pupuk KCL*. AgronobiS. (2009). Vol. 1, No. 2.
- [8] Mulyadi, Achmad. *Pengaruh Pemberian Legin, Pupuk Npk (15:15:15) Dan Urea Pada Tanah Gambut Terhadap Kandungan N, P Total Pucuk Dan Bintil Akar Kedelai (Glycine max (L.) Merr.)*. Kaunia. (2012) Vol. VIII, No. 1, April 2012: 21-29.
- [9] Rukmi. *Pengaruh Pemupukan Kalium dan Fosfat Terhadap Pertumbuhan dan Hasil Kedelai*. Skripsi. Fakultas Pertanian Universitas Muria Kudus. (2009).
- [10] Sulaeman, Mulyadi, Dwiningsih S. *Penentuan ketersediaan P tanah menggunakan kurva erapan pada tanah sawah bukaan baru*. Jurnal Tanah dan Iklim. (2000). 18: 23-28.
- [11] Agbenin, J.O. *Phosphorus Sorption by three Cultivated Savanna Alfisols as influenced by pH*. Fertilizer Research (1996). 44:107-11.
- [12] Madigan, M.T., Martinko, J.M and J. Parker. 1997. "Biology of Microorganisms". USA: Prentice Hall. (1997).
- [13] Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T dan Williams, S. T. "Bergeys Manual Determinative Bacteriology, Edisi Ke 9. Amerika : Lippincott Williams dan Wilki N. S. (1999).
- [14] Tate, R. L. "Soil Microbiology", second edition. New York. Jhon Wiley & Sons, Inc. (2000).

- [15] Laskar, Folguni, Sharma, G.D. dan Deb, B. *Biodiversity of Diazotrophs Derrxia and Beijerinckia in the Rhizospheric and Nonrhizospheric Soils of Rice Plant- A Review Assam University*. Journal of Science & Technology : Biological and Environmental Sciences. (2010). Vol. 5 Number I 154-162.