ISOLASI DAN KARAKTERISASI RHIZOBAKTERI POTENSIAL DARI ULTISOL SEBAGAI PUPUK HAYATI LOKAL

Isolation and Characterization of Potential Rhizobacteria from Ultisol as Local Biofertilizer

Garuda*

Jurusan Biologi, Institut Teknologi dan Kesehatan Avicenna, Jl. Y. Wayong Bypass Baruga Kendari

* Penulis korespondensi: garudabot@gmail.com

Abstract

Southeast Sulawesi is one of the provinces where agriculture is one of the fastest growing industries because most of the people are farmers. An obstacle encountered by farmers in Southeast Sulawesi is the lack of land for farming because most of the area is dominated by Ultisol. One way to overcome this problem is by using biofertilizers. This study aimed to isolate and characterize rhizobacteria from Ultisol as a material for making biofertilizers. The method used in sampling was purposive sampling. Soil samples taken were isolated for microorganisms and tested for hypersensitivity and then characterized based on the ability of nitrogen fixation, phosphate dissolving, and production of growth regulators. The test results and characterization of rhizobacteria selected 10 isolates from 92 isolated isolates, namely MN-06, MN-12, MN-21, KDI-09, KDI-11, KNW-02, KNW-05, KTM-07, KKK-04, and KKK-09.

Keywords: *agriculture, biofertilizer, rhizobacteria, Southeast Sulawesi, Ultisol*

Pendahuluan

Ultisol merupakan tanah yang memiliki spesifikasi kandungan hara rendah, kandungan liat tinggi, berwarna merah-kuning pada umumnya, dan kadar keasaman tinggi sehingga sangat tidak cocok untuk pertumbuhan tanaman, khususnya komoditas pertanian. Wilayah Sulawesi Tenggara merupakan salah satu wilayah potensial dalam pengembangan sumberdaya pertanian, namun kondisi lahan yang didominasi oleh Ultisol menjadi salah satu hambatan yang perlu diperhatikan. Pengembangan komoditas pertanian di Sulawesi Tenggara memiliki hambatan pada tingkat kesuburan tanah yang rendah. Kendala yang umum pada Ultisol adalah rendahnya kesuburan tanah seperti keasaman tanah yang tinggi, pH rata-rata <4,50, kejenuhan Al tinggi, kandungan hara makro terutama P, K, Ca, dan Mg rendah, kandungan bahan organik rendah serta sifat fisik dan biologi tanah yang kurang mendukung pertumbuhan tanaman (Nurmas *et al.*, 2014).

Kesuburan tanah terukur dari jumlah kandungan hara makro seperti N, P, K tinggi, ketersediaan bahan organik tinggi, kandungan Fe, Mn, dan Al rendah, dan komposisi mikroba tanah yang menguntungkan. Pengembangan sumber daya pertanian di lahan Ultisol perlu dibantu dengan pemupukan yang tepat dan berkelanjutan. Salah satu alternatifnya adalah pupuk hayati yang bersumber dari mikroorganisma.

Aplikasi campuran rhizobakteri secara efektif mengendalikan penyakit busuk akar rhizoctonia pada tingkat insidensi 0%, meningkatkan pertumbuhan tinggi tanaman dan jumlah daun sebesar 119% dan 170%, dan bobot biji bernas sebesar 180% tanaman kedelai di Ultisol (Khaeruni *et al.*, 2014). Hal ini menunjukkan bahwa bioremediasi menggunakan bakteri merupakan salah satu cara untuk menurunkan bahan toksik yang ada di lingkungan tercemar (Andriani dan Rachmadiarti, 2019). Salah satu cara pengolahan limbah secara

biologi dapat dilakukan melalui biofiltrasi dengan bantuan rhizobakteri yang terdapat pada akar tanaman air. Hal ini dimungkinkan karena rhizobakteri mempunyai potensi untuk mengikat logam berat (Arrizal *et al.*, 2013). Pemanfaatan rhizobakteri tanaman sorgum sebagai inokulan pemacu pertumbuhan tanaman secara efektif mampu meningkatkan tinggi tanaman, panjang akar dan berat kering tanaman sorgum (Widyasari *et al.*, 2016). Selain itu, pemanfaatan rhizobakteri juga dapat mengendalikan penyakit layu stewart pada tanaman jagung yang terdiri dari kelompok bakteri *fluorescens*, *non fluorescens* dan bakteri tahan panas (Rahma *et al.*, 2016).

Rhizobakteri yang berperan dalam membantu pertumbuhan tanaman baik secara langsung maupun tidak langsung dikenal dengan nama *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR). PGPR mempengaruhi pertumbuhan tanaman melalui berbagai jenis mekanisme, seperti fiksasi nitrogen, produksi senyawa dan enzim organik yang mudah menguap dan sebagai kontaminan dalam bioremediasi lingkungan (Noha dan Yin, 2018). Jenis *Bacillus* dan *Pseudomonas* dilaporkan dapat memproduksi IAA dan memfiksasi nitrogen sehingga dapat meningkatkan tinggi tanaman, panjang akar, bobot segar tanaman carob (*Ceratonia siliqua* L.) (Kahkal *et al.*, 2019).

Pemanfaatan mikroorganisme lokal yang berasal dari Ultisol diharapkan dapat meningkatkan pertumbuhan tanaman pertanian di lahan tersebut. Hal ini akan berdampak pada peningkatan produksi pertanian di Sulawesi Tenggara. Sehingga program pemerintah provinsi Sulawesi Tenggara untuk meningkatkan komoditas pertanian serta ketahanan pangan dapat terwujud. Aplikasi pupuk hayati dalam pemupukan sudah banyak dilakukan oleh para peneliti maupun petani namun masih berskala lokal dan hanya cocok diaplikasikan pada daerah dimana sumber mikrobanya diisolasi. Oleh karena itu, pupuk hayati yang beredar di pasaran belum tentu cocok diaplikasikan pada Ultisol di Sulawesi Tenggara.

Berdasarkan uraian di atas, penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengarakterisasi rhizobakteri potensial untuk diproduksi menjadi pupuk hayati lokal.

Bahan dan Metode

Waktu dan tempat penelitian

Pengambilan sampel tanah rhizosfer dilakukan pada Ultisol di beberapa daerah Sulawesi Tenggara. Proses isolasi dan karakterisasi dilakukan di Laboratorium mikrobiologi, Fakultas MIPA, Universitas Halu Oleo. Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan Maret – Agustus 2020.

Teknik pengumpulan data

Rhizobakteri yang digunakan dalam penelitian ini bersumber dari rizosfer tanaman yang tumbuh dengan baik pada Ultisol. Sebanyak 10 gram tanah dan butiran tanah yang melekat dipermukaan akar dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer berisi 90 mL air destilata dan dikocok menggunakan shaker dengan kecepatan 120 rpm selama 15 menit. Suspensi yang diperoleh diambil sebanyak 1 mL untuk diencerkan hingga tingkat pengenceran 10^{-7} . Pada seri pengenceran 10^{-6} dan 10^{-7} diambil sebanyak 0,1 mL dan ditumbuhkan pada media NA. Setiap koloni yang tumbuh dikelompokkan berdasarkan bentuk dan warna koloni kemudian dimurnikan. Rhizobakteri yang tumbuh kemudian diseleksi melalui uji hipersensitif menggunakan daun tanaman tembakau (*Nicotiana tabacum* L.) dari tanaman yang berumur sekitar dua bulan. Isolat yang berumur 24 jam diambil dengan konsentrasi 10^{-7} sel/mL dan dicampurkan ke dalam larutan fisiologis (NaCl 0,85%). Suspensi bakteri diinfiltrasikan ke daun tanaman tembakau dan diamati selama 48 jam setelah injeksi. Respon yang diamati dari daun tembakau berupa reaksi nekrosis pada sekitar daun yang diinjeksi (Oktavianto *et al.*, 2018). Rhizobakteri yang lolos uji hipersensitif, selanjutnya dikarakterisasi dengan menggunakan tiga karakter, yaitu kemampuan melarutkan fosfat, fiksasi nitrogen dan kemampuan produksi Zat Pengatur Tumbuh (ZPT). Kemampuan rhizobakteri dalam melarutkan fosfat diuji dengan menggunakan media pikovskaya, media dituang ke dalam cawan petri sampai membeku. Kemudian biakan isolate bakteri berumur 24 jam dipindahkan sebanyak 1 jarum ose, selanjutnya diinkubasi pada suhu ruang selama 1-3 hari.

Adanya zona bening di sekitar rhizobakteri mengindikasikan kemampuan isolat dalam melarutkan fosfat (Garuda *et al.*, 2014). Pengujian kemampuan bakteri dalam memfiksasi N menggunakan media *James Nitrogen Free Malat Bromthymol Blue* (JNFB) semi padat. Isolat murni umur 48 jam, ditumbuhkan pada media tersebut dan diinkubasi pada suhu ruang selama 10 hari, pengamatan dilakukan terhadap pelikel yang terbentuk dalam media (Garuda *et al.*, 2014).

Pengujian karakter produksi ZPT dilakukan dengan cara kultur bakteri ditumbuhkan selama 24 jam dalam *Nutrient Broth* pada suhu ruang dan diaduk menggunakan shaker pada kecepatan 150 rpm. Sebanyak 5 g kultur dimasukkan ke dalam corong pemisah lalu diekstraksi dengan larutan metanol, kloroform, dan 2N ammonium hidroksida (12:5:3 v/v/v) sebanyak 100 ml dan ditambahkan 22,4 ml air destilata. Kemudian didiamkan selama 24 jam. Fase air diambil sedangkan fase kloroform dibuang. Selanjutnya, pH pada fase air diatur menjadi 2,5 dengan menambahkan HCl 7N, kemudian diekstraksi sebanyak 3 kali dengan 15 ml etilasetat. Ekstrak didiamkan hingga fase air dan fase etilasetat terpisah. Fase etilasetat diambil dan fase air dilanjutkan untuk perlakuan berikutnya. Fase

etilasetat yang diperoleh diharapkan mengandung IAA dan GA₃. Fase air berikutnya diatur pH nya menjadi 7 dengan menambahkan 7N NaOH kemudian diekstraksi kembali sebanyak 3 kali dengan 15 ml etilasetat. Perlakuan ini akan menghasilkan kinetin bebas. Ekstrak IAA, GA₃, dan kinetin yang diperoleh selanjutnya dievaporasi. Ekstrak kering yang diperoleh kemudian ditimbang $\pm 0,1-0,5$ mg dan dilarutkan dalam 10 ml metanol kemudian diukur menggunakan spektrofotometer UV-VIS. Konsentrasi ZPT pada sampel yang diperoleh dihitung dengan persamaan kurva standar ZPT murni (Garuda *et al.*, 2014).

Hasil dan Pembahasan

Isolasi rhizobakteri

Isolasi rhizobakteri dari tanah sekitar perakaran tanaman dilakukan di 5 kabupaten/kota di Sulawesi Tenggara, yaitu Kabupaten Muna, Kota Kendari, Kabupaten Konawe, Kabupaten Kolaka Timur, dan Kabupaten Kolaka. Total isolat yang didapatkan dari kelima daerah tersebut adalah 92 isolat. Hasil isolasi rhizobakteri pada kelima daerah tersebut tersaji pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil isolasi rhizobakteri di berbagai daerah lokasi penelitian.

Asal Rhizobakteri	Jumlah Isolat	Total populasi rhizobakteri (10 ⁷ cfu g ⁻¹ tanah)
Kabupaten Muna	24	1,44
Kota Kendari	18	1,08
Kabupaten Konawe	21	1,26
Kabupaten Kolaka Timur	13	0,78
Kabupaten Kolaka	16	0,96
Total	92	

Uji hipersensitif

Uji hipersensitif dilakukan untuk mengetahui sifat patogen bakteri terhadap tanaman. Tanaman uji yang digunakan adalah tanaman tembakau yang merupakan tanaman indikator terhadap mikrob patogen dan nonpatogen. Reaksi hipersensitif ditandai dengan munculnya gejala nekrotik, yaitu terjadinya pencoklatan daun pada daerah yang diinokulasikan bakteri akibat kematian jaringan secara lokal sehingga perkembangan patogen ke jaringan lain

terhambat. Gejala nekrotik timbul 10-20 jam setelah inokulasi. Hasil uji hipersensitif 92 isolat menunjukkan 48 isolat tidak menunjukkan reaksi sedangkan 44 isolat menunjukkan reaksi nekrosis (Tabel 2). Isolat yang tidak menunjukkan reaksi nekrosis akan diseleksi pada tahapan selanjutnya.

Karakterisasi isolat

Isolat yang tidak menunjukkan gejala nekrosis selanjutnya dikarakterisasi berdasarkan

kemampuannya dalam melarutkan fosfat, memfiksasi nitrogen dan menghasilkan ZPT. Berdasarkan hasil uji dari tiga karakter tersebut terpilih 10 isolat dengan nilai tertinggi setiap

komponen uji yang dianalisis, yaitu MN-06, MN-12, MN-21, KDI-09, KDI-11, KNW-02, KNW-05, KTM-07, KLK-04, dan KLK-09 (Tabel 3).

Tabel 2. Hasil uji hipersensitif isolat rhizobakteri.

Asal Rhizobakteri	Jumlah Isolat	
	Nekrosis	Tidak Nekrosis
Kabupaten Muna	10	14
Kota Kendari	9	9
Kabupaten Konawe	13	8
Kabupaten Kolaka Timur	7	6
Kabupaten Kolaka	5	11
Total	44	48

Tabel 3. Hasil karakterisasi isolat rhizobakteri.

No	Jenis Isolat	Fiksasi N	Karakterisasi				
			Produksi ZPT (ppm)				Pelarut P
			IAA	GA ₃	Zeatin	Kinetin	Indeks Zona Bening
1	MN-02	+	10,02	254,60	2,53	7,13	2,31
2	MN-05	+	10,27	260,10	3,15	6,28	5,46
3	MN-06	+	24,64	321	8,76	14,75	9,68
4	MN-07	-	12,23	256,62	3,46	9,89	4,77
5	MN-09	+	12,62	247,37	6,21	9,67	4,01
6	MN-10	-	10,32	247,50	6,23	8,76	3,60
7	MN-12	+	20,13	249,20	7,77	15,32	9,80
8	MN-15	-	9,77	257,91	5,68	8,02	7,30
9	MN-17	-	12,76	246,02	5,71	8,35	6,25
10	MN-18	-	16,93	213,74	6,77	8,47	6,04
11	MN-19	+	12,54	301,21	6,82	7,10	7,39
12	MN-20	+	8,01	265,87	5,28	7,21	6,82
13	MN-21	+	23,10	347,80	7,69	12,84	9,72
14	MN-23	+	9,76	216	5,89	8,20	7,33
15	KDI-03	+	12,33	131,20	6,26	9,67	6,58
16	KDI-04	+	8,34	221,50	6,88	9,77	7,39
17	KDI-07	-	9,12	271,2	5,97	8,80	7,05
18	KDI-08	+	10,67	178,33	5,01	10,11	7,32
19	KDI-09	+	20,24	274,76	8,22	12,13	8,88
20	KDI-11	+	22,17	300,20	8,21	14,86	9,04
21	KDI-12	+	10,68	112,48	5,26	9,41	4,36
22	KDI-14	+	12,37	167,32	6,13	6,35	4,61
23	KDI-17	+	12,45	164,90	6,32	9,59	2,94
24	KNW-01	+	9,04	234,78	6,43	6,83	2,75
25	KNW-02	+	18,26	356,60	9,21	9,35	7,24
26	KNW-05	+	21,50	316,72	8,51	10,25	8,66
27	KNW-14	-	12,59	235,94	4,61	7,30	6,43
28	KNW-17	-	19,32	147,88	2,39	7,42	4,80
29	KNW-18	-	17,79	156,24	3,37	9,76	7,36

Lanjutan Tabel 3

No	Jenis Isolat	Karakterisasi					
		Fiksasi N	Produksi ZPT (ppm)				Pelarut P Indeks Zona Bening
			IAA	GA ₃	Zeatin	Kinetin	
30	KNW-19	+	12,98	176,39	3,63	9,90	2,87
31	KNW-21	-	17,65	158,77	4,52	8,61	3,66
32	KTM-06	-	14,63	248,28	6,69	8,77	3,06
33	KTM-07	+	21,37	278,19	9,28	10,02	8,12
34	KTM-09	-	20,21	231,65	6,43	7,48	2,41
35	KTM-10	-	20,34	246,07	7,68	7,80	3,16
36	KTM-11	-	19,76	246,58	7,55	6,39	2,18
37	KTM-12	-	19,01	234,17	6,04	8,99	4,64
38	KLK-03	+	16,68	249,61	6,02	7,23	3,27
39	KLK-04	+	23,32	322,76	9,01	9,23	8,57
40	KLK-06	+	17,86	188,25	7,61	7,63	5,49
41	KLK-07	-	17,03	163,65	6,90	8,56	9,24
42	KLK-08	+	16,04	210,97	6,50	8,78	8,37
43	KLK-09	+	19,15	300,38	8,16	9,54	9,34
44	KLK-10	-	15,62	212,61	7,32	8,67	8,09
45	KLK-11	-	10,19	224,66	7,88	7,56	7,39
46	KLK-12	-	12,75	257,80	6,58	7,54	8,88
47	KLK-13	+	10,80	178,22	7,08	8,80	7,79
48	KLK-14	+	16,32	211,60	7,94	8,21	6,98

Pengujian isolat yang mampu memfiksasi nitrogen didasarkan pada terbentuknya pelikel ada media JNFB. Berdasarkan data yang diperoleh terdapat 30 isolat yang mampu membentuk pelikel pada media. Kemampuan mikroba dalam memfiksasi nitrogen merupakan salah satu karakter utama yang harus dimiliki oleh mikroba untuk digunakan sebagai pupuk hayati. Hal ini dikarenakan nitrogen merupakan unsur hara makro yang penting dan paling sulit didapatkan oleh tumbuhan dari dalam tanah. Seperti yang telah diketahui bahwa nitrogen hanya tersedia di udara bebas dalam bentuk N₂, sedangkan tumbuhan hanya bisa menyerap nitrogen dari dalam tanah dalam bentuk NO₃ atau NH₄.

Uji karakteristik isolat dalam pelarutan fosfat didasarkan pada indeks zona bening yang dibentuk oleh isolat dalam media pikovskaya. Selain nitrogen, unsur fosfat juga jarang ditemukan dalam kondisi tersedia untuk tanaman sekalipun fosfat berada di dalam tanah. Hal ini disebabkan unsur fosfat lebih banyak terikat oleh logam sehingga tidak mampu diserap oleh tanaman. Fosfat di dalam tanah

banyak tersedia dalam bentuk ikatan Al-P atau Fe-P, sedangkan tanaman hanya mampu menyerap fosfat dalam bentuk ion anorganik orthofosfat (HPO₄²⁻ atau H₂PO₄⁻). Karakter isolat dalam memproduksi zat pengatur tumbuh (ZPT) merupakan karakter yang juga tidak kalah pentingnya dalam pupuk hayati. ZPT seperti yang sudah banyak diketahui merupakan senyawa yang membantu dan memacu pertumbuhan tanaman baik secara langsung maupun tidak langsung.

Kesimpulan

Isolasi rhizobakteri dari beberapa wilayah di Provinsi Sulawesi Tenggara menghasilkan 92 isolat. Hasil uji hipersensitif dari 92 isolat menunjukkan 48 isolat yang tidak menyebabkan gejala nekrosis pada daun. Hasil karakterisasi 48 isolat berdasarkan kemampuan fiksasi nitrogen, pelarutan fosfat dan produksi ZPT dipilih 10 isolat yang potensial untuk diproduksi menjadi pupuk hayati, yaitu MN-06, MN-12, MN-21, KDI-09, KDI-11, KNW-02, KNW-05, KTM-07, KLK-04, dan KLK-09.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih kepada Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi – Direktorat Jenderal Penguatan Riset dan Pengembangan yang telah mendanai penelitian ini melalui skema Penelitian Dosen Pemula (PDP) tahun 2020 atas nama penulis.

Daftar Pustaka

- Andriani, N. dan Rachmadiarti F. 2019. Keanekaragaman rhizobakteri pada *Pistia stratiotes* dan *Azola microphylla* yang terpapar logam timbal (Pb). *Lentera Bio* 8(1): 73-79.
- Arrizal, S., Fida, R. dan Yuliani. 2013. Identifikasi rhizobakteri pada semanggi (*Marsilea crenata* Presl.) yang terpapar logam berat timbal (Pb). *Lentera Bio* 2(1): 165-169.
- Garuda, Triadiati, and Mubarik, N.R. 2014. Corn growth and yield improvement using biofertilizer based on plant growth promoting bacteria in acid soil. *Journal International Environmental Application and Science* 9(4): 569-576.
- Kahkal, R.E., Meryama, M., Souhall, C., Majida, H., Rachid, Z., Mustapha, A.C. and Rafik, E. 2019. Characterization of plant growth promoting rhizobacteria isolated from rhizosphere of carob tree (*Ceratonia siliqua* L.) in Morocco. *EurAsian Journal of BioScience* 13: 921-930.
- Khaeruni, A., Asniah, Taufik, M. dan Sutariati G.A.A. 2014. aplikasi formula campuran rhizobakteri untuk pengendali penyakit busuk akar rhizoctonia dan peningkatan hasil kedelai di Ultisol. *Jurnal Fitopatologi Indonesia* 10(2): 37-44.
- Noha, I.O. and Yin, S., 2018. Isolation and characterization of pea plant (*Pisum sativum* L.) growth promoting rhizobacteria. *African Journal of Microbiology Research* 12(34): 820-828.
- Nurmas, A., Nofianti, Rahman A. dan Khaeruni A. 2014. Eksplorasi dan karakterisasi azotobacter indigenous untuk pengembangan pupuk hayati tanaman padi gogo lokal di lahan marjinal. *Jurnal Agroteknos* 4(2): 128-134.
- Oktaviyanto, M.F., Munif, A. dan Kikin, H.M. 2018. Aktivitas antagonis bakteri endofit asal mangrove terhadap *Ralstonia solanacearum* dan *Meloidogyne* spp. *Jurnal Fitopatologi Indonesia* 14(1): 23-29.
- Rahma, H., Aprizal, Z. dan Suryati, 2016. Isolasi dan seleksi rhizobakteri yang berpotensi sebagai agen pengendali *Pantoea stewartii* subs. *Stewartii* penyebab layu Stewart pada tanaman jagung. *Jurnal HPT Tropika* 16(2): 124-130.
- Widyasari, A., Wijanarka, Budi, R. dan Mamik S., 2016. Penapisan dan pemanfaatan rhizobakteri tanaman sorgum (*Sorgum bicolor* L.) sebagai inokulan pemacu tumbuh tanaman. *Jurnal Biologi* 5(4): 51-61.