

**BUKU PENGAJUAN HAKI**



**ISOLAT BAKTERI AZOTOBACTER PADA RHIZOSFIR  
TANAMAN PADI METODE SRI**

**Ir. Hj. NELSON ELITA, MP**

**NIDN 00-1103-6114**

**Ir. RITA ERLINDA, MP**

**NIDN 00-0309-6805**

**DR. Ir. AGUSTAMAR, MP**

**NIDN 00-0705-5912**

**POLITEKNIK PERTANIAN NEGERI PAYAKUMBUH  
MEI, 2018**

## PENDAHULUAN

Bakteri penambat N<sub>2</sub> di daerah perakaran dan bagian dalam jaringan tanaman padi yaitu, *Pseudomonas spp*, *Enterobacteriaceae*, *Bacillus*, *Azotobacter*, *Azospirillum* dan *Herbaspirillum* telah terbukti mampu meningkatkan secara nyata penambatan N<sub>2</sub> (James dan Olivares, 1997). Bakteri penambat N<sub>2</sub> pada rhizosfir tanaman gramineae seperti *Azotobacterpaspali* dan *Beijerinchia spp* termasuk salah satu dari kelompok bakteri aerobik yang mengkolonisasi permukaan akar (Baldani et al, 1997). *Azotobacter* merupakan bakteri penambat N<sub>2</sub> yang mampu menghasilkan substansi zat pemacu tumbuh giberellin, sitokinin, dan asam indolasetat sehingga pemanfaatannya dapat memacu pertumbuhan akar (Alexander, 1977). Menurut Samah et al (2014) peningkatan pertumbuhan vegetative tanaman yang diinokulasi dengan *Azotobacter* mungkin karena sintesis dari beberapa hormon tumbuh yang dipengaruhi oleh pemberian *Azotobacter*.

Uphoff (2003) menyatakan kondisi aerobik pada metode SRI mendukung mikroba tanah dan keanekaragamannya melimpah dilahan melalui eksudat akar. Tanaman padi melalui eksudat akar ada aktifitas mikroba tanah ke akar berupa fiksasi N secara biologis dengan rhizosfir, adanya infeksi cendawan mikoriza ke akar tanaman yang meningkatkan variasi dan jumlah hara diserap akar. Rhizobia dalam rhizosfir tanaman padi meningkatkan kadar protein dan hasil perhektar melalui produksi auksin dan zat perangsang tumbuh lainnya. Eksudat akar merupakan suatu faktor kunci didalam berbagai proses metode SRI yang menghasilkan sistem perakaran lebih besar dan anakan padi lebih banyak.

Berbagai hasil penelitian menunjukkan bahwa inokulan tanah atau benih dengan *Azotobacter* efektif meningkatkan hasil tanaman berkisar 10-15 kg h<sup>-1</sup> tahun<sup>-1</sup> (Subba-Rao, 1999). Jumlah N dihasilkan oleh kelompok bakteri ini adalah 10 kgN ha<sup>-1</sup> (Tenuta, 2006). Penambatan N<sub>2</sub> lebih besar, yakni sekitar 46 kg N ha<sup>-1</sup> (30% dari kebutuhan total N) dilaporkan oleh Malik et al (1997) pada tanaman padi diinokulasi inokulan campuran dan beberapa jenis bakteri penambat N<sub>2</sub> hidup bebas dan pemacu tumbuh tanaman. Roger and Ladha (1999) mengemukakan kandungan N pada lahan sawah irigasi 80-110 kg h<sup>-1</sup> diperoleh dari penambatan N<sub>2</sub> oleh rhizobakteria non simbiotik mampu meningkatkan produksi padi sampai 24%. Beberapa bakteri penambat N<sub>2</sub> yakni *Azospirillum brasilensi Wh-3*, *Azospirillum lipoferum N-4*, *Azoarcus K-1* *Zooglea Ky-4* selain menambat N<sub>2</sub> dari udara juga memproduksi AIA, sehingga mempunyai peran ganda penyedia N dan pemacu perkembangan tanaman.

Pemberian inokulan mikroba pada tanaman padi metode SRI ketersediaan nutrisi dan serapan hara lebih tinggi dengan adanya fiksasi nitrogen dari *Rhizobium* sp dibandingkan dengan system konvensional. Ketersediaan P dalam tanah dan translokasi P melalui akar ke daun meningkat secara signifikan sebagai akibat dari inokulasi *cyanobacterial*. Selain itu kandungan N dan P biji padi lebih tinggi karena pemberian mikroba dalam metode SRI (Prasanna, R, *et al.* 2015).

Siklus N biologis yang dilakukan oleh mikroba yang terlibat memberikan efek yang mengeksploitasi fiksasi Nitrogen lebih banyak. Selain itu dapat menghambat nitrifikasi dan mengurangi denitrifikasi sehingga meminimalkan aplikasi pupuk anorganik yang mengurangi kerugian akibat dampak dari pupuk anorganik (R. Hirsch, Penny and H, Mauchine, 2015)

*Azotobacter* dan *Azospirillum* sebagai bakteri penambat N non simbiotik dan Rhizobakteria Pemacu Pertumbuhan Tanaman (RPPT).

Nitrogen merupakan faktor pembatas bagi tanaman budidaya terutama padi. Salah satu sumber Nitrogen yang dibutuhkan oleh tumbuhan adalah ammonia. Amonia dapat dihasilkan oleh mikroba melalui proses fiksasi nitrogen. Fiksasi nitrogen dilakukan oleh mikroba di lahan padi dengan menambah populasi bakteri endemik penambat nitrogen yang hidup bebas di rhizospir padi. Hasil penelitian Rachman (2006) bahwa hasil isolasi penambat nitrogen di lahan padi adalah tiga spesies bakteri yaitu *Beijerinchia fluminensis*, *Azotobacter beijerinchii* dan *Azomas macrocytogenesis*. Hasil penapisan ketiga bakteri adalah *Azotobacter beijerinchii* dan *Azomas macrocytogenesis*. Kedua agensia dapat tumbuh diatas populasi  $1,3 \times 10^9$  sel/gram. Penambahan agensia dapat mempengaruhi penambahan biomassa baik batang maupun akar.

Hasil penelitian Hakim (2006) potensi penambat N diperoleh 40 isolat dari lima sampel tanah kering masam. Berbagai hasil penelitian menunjukkan bahwa inokulasi tanah atau benih dengan *Azotobacter* efektif dapat meningkatkan hasil tanaman sampai 20%. Di daerah empat musim (temperate region) jumlah nitrogen yang ditambat oleh *Azotobacter* berkisar  $10-15 \text{ kg h}^{-1} \text{ tahun}^{-1}$  (Subba Rao, 1999).

Bakteri penambat  $\text{N}_2$  di daerah perakaran dan bagian dalam jaringan tanaman padi yaitu, *Pseudomonas spp*, *Enterobacteriaceae*, *Bacillus*, *Azotobacter*, *Azospirillum* dan *Herbaspirillum* telah terbukti mampu meningkatkan secara nyata penambatan  $\text{N}_2$  (James dan Olivares, 1997). Bakteri penambat  $\text{N}_2$  pada rhizospir tanaman gramineae seperti *Azotobacterpaspali* dan *Beijerinchia spp* termasuk salah satu dari kelompok bakteri aerobik

yang mengkolonisasi permukaan akar (Baldani et al, 1997). *Azotobacter* merupakan bakteri penambat N<sub>2</sub> yang mampu menghasilkan substansi zat pemacu tumbuh giberellin, sitokinin, dan asam indol asetat sehingga pemanfaatannya dapat memacu pertumbuhan akar (Alexander,1977). Menurut Samah *et al* (2014) peningkatan pertumbuhan vegetative tanaman yang diinokulasi dengan *Azotobacter* mungkin karena sintesis dari beberapa hormon tumbuh yang dipengaruhi oleh pemberian *Azotobacter*.

Uphoff (2003) menyatakan kondisi aerobik pada metode SRI mendukung mikroba tanah dan keanekaragamannya melimpah dilahan melalui eksudat akar. Tanaman padi melalui eksudat akar ada aktifitas mikroba tanah ke akar berupa fiksasi N secara biologis dengan rhizosfir, adanya infeksi cendawan mikoriza ke akar tanaman yang meningkatkan variasi dan jumlah hara diserap akar. Rhizobia dalam rhizosfir tanaman padi meningkatkan kadar protein dan hasil perhektar melalui produksi auksin dan zat perangsang tumbuh lainnya. Eksudat akar merupakan suatu faktor kunci didalam berbagai proses metode SRI yang menghasilkan sistem perakaran lebih besar dan anakan padi lebih banyak.

Berbagai hasil penelitian menunjukkan bahwa inokulan tanah atau benih dengan *Azotobacter* efektif meningkatkan hasil tanaman berkisar 10-15 kg h<sup>-1</sup>tahun<sup>-1</sup> (Subba-Rao,1999). Jumlah N dihasilkan oleh kelompok bakteri ini adalah 10 kgN ha<sup>-1</sup> (Tenuta,2006). Penambatan N<sub>2</sub> lebih besar, yakni sekitar 46 kg N ha<sup>-1</sup> (30% dari kebutuhan total N) dilaporkan oleh Malik *et al* (1997) pada tanaman padi diinokulasi inokulan campuran dan beberapa jenis bakteri penambat N<sub>2</sub> hidup bebas dan pemacu tumbuh tanaman. Roger and Ladha (1999) mengemukakan kandungan N pada lahan sawah irigasi 80-110 kg h<sup>-1</sup> diperoleh dari penambatan N<sub>2</sub> oleh rhizobakteria non simbiotik mampu meningkatkan produksi padi sampai 24%. Beberapa bakteri penambat N<sub>2</sub> yakni *Azospirillum brasilensi Wh-3*, *Azospirillum lipoferum N-4*, *Azoarcus K-1 Zooglea Ky-4* selain menambat N<sub>2</sub> dari udara juga memproduksi AIA, sehingga mempunyai peran ganda penyedia N dan pemacu perkembangan tanaman.

Pemberian inokulan mikroba pada tanaman padi metode SRI ketersediaan nutrisi dan serapan hara lebih tinggi dengan adanya fiksasi nitrogen dari *Rhizobium* sp dibandingkan dengan system konvensional. Ketersediaan P dalam tanah dan translokasi P melalui akar ke daun meningkat secara signifikan sebagai akibat dari inokulasi *cyanobacterial*. Selain itu kandungan N dan P biji padi lebih tinggi karena pemberian mikroba dalam metode SRI (Prasanna, R, *et al*. 2015).

Siklus N biologis yang dilakukan oleh mikroba yang terlibat memberikan efek yang mengeksploitasi fiksasi Nitrogen lebih banyak. Selain itu dapat menghambat nitrifikasi dan mengurangi denitrifikasi sehingga meminimalkan aplikasi pupuk anorganik yang mengurangi kerugian akibat dampak dari pupuk anorganik (R. Hirsch, Penny and H. Mauchine, 2015)

Pengambilan sampel tanah dilakukan secara komposit pada rhizosfir tanaman padi yang dibudidayakan dengan metode SRI. Kemudian dilakukan analisis terhadap sifat biologi tanah yaitu :

#### **A. Eksplorasi,**

Dieksplorasi beberapa bakteri yang terdapat pada rhizosfir tanaman padi tanah sawah dan gramineae di lahan darat. Kemudian diisolasi dan dimurnikan pada media tumbuh, jika ditemukan *Azotobacter* menggunakan media sukrosa garam mineral (Atlas, 2005), jika *Azospirillum* pada media DL- Malic (Santa, Hernández, Gergina, Ivarez, Junior dan Soccol, 2004).

Eksplorasi dilakukan pada rhizosfir tanaman dengan menggali tanah di sekitar perakaran padi tanah sawah dan gramineae di lahan darat secara hati-hati. Contoh tanah yang menempel pada perakaran tersebut diusahakan agar dapat terbawa sebanyak mungkin, kemudian dimasukkan kedalam box pendingin agar temperaturnya dapat diturunkan, kemudian dibawa ke labor diisolasi prosedur sesuai oleh Balai Penelitian Tanah (2004).

#### **B. Isolasi**

Isolasi bakteri dilakukan metoda pengenceran menggunakan agar cawan pengenceran  $10^{-1}$ - $10^{-3}$ . 1 ml suspensi tanah setiap pengenceran, disebarkan disetiap cawan petri berisi media tumbuh bakteri. Beberapa potongan akar kecil padi dan gramineae ( $\pm 0,5$  cm) dicuci menggunakan deterjen sampai bersih, kemudian dibilas dengan akuades 3 kali, diinokulasikan ke media (Anas, 1989).

#### **C. Identifikasi dan koleksi**

Koloni yang tumbuh pada masing-masing media diamati sifat morfologinya. Pengamatan ciri morfologi koloni bakteri meliputi warna koloni (pigmen), diameter, serta bentuk permukaan koloni.

#### **D. Pengamatan Pemurnian Isolat**

Koloni ciri sama diisolasi dan dimurnikan pada media sama dengan metoda penggoresan diperoleh isolat murni. Isolat murni ditandai dengan tidak adanya koloni bakteri lain yang tumbuh pada media selain isolat yang murni dan dikoleksi.

## **E. Karakterisasi isolat rizo-bakteria (penambat N dan *Pelarut fospat*) sebagai RPPT**

Karakterisasi : Pengamatan Gram, Fluoresensi, Mortilitas dan Produksi IAA Isolat-isolat

**Pengamatan gram** : Dilakukan dengan menggunakan metoda Klement *et al.*, (1990).

**Pengamatan *fluoresensi***: Dilakukan dengan membiakan isolat bakteri pada media Kings B, hasilnya disesuaikan dengan petunjuk Anas (1989).

**Pengamatan pergerakan** : Pergerakan ditandai timbulnya kekeruhan pada medium akibat perpindahan bakteri dari garis inokulasi seperti yang dikemukakan oleh Sutedjo *et al.* (1991).

### **Pengamatan kemampuan bakteri penambat N dan pelarut fosfat *indigenus* sebagai RPPT**

Kemampuan isolat untuk menghasilkan *Indol Asetic Acid* (IAA) menggunakan metoda kolorimetrik. Prosedur selanjutnya dapat di lihat pada Lampiran 6d.

### **Perbanyak Isolat bakteri penambat N dan RPPT *indigenus***

Perbanyak isolat dilakukan dengan menumbuhkan pada media selektif padat sesuai jenis rhizobakteria yang akan diperbanyak selama 72 jam. Isolat terbaik yang telah terseleksi menurut sifat dan karakteristiknya dibiakkan pada media tumbuh *Nutrient broth* (Atlas, 2005). Bahan perbanyak yang diperoleh dipergunakan untuk percobaan selanjutnya.

### **Pengujian Gram**

Karakterisasi dilakukan dengan mengamati aktivitas isolat mengenai reaksi gram, tujuannya mengetahui isolat bersifat gram negatif atau gram positif. Metoda dipakai Klement *et al* (1990) meneteskan 1 tetes KOH 3 % pada kaca objek, diambil satu koloni akan di uji pakai ose dan disuspensikan pada tetesan tersebut. Bakteri gram negatif akan menunjukkan koagulasi suspensi (lekat), bakteri gram positif tidak ada koagulasi.

### **Pengujian *fluorescens***

Fluorescent isolat bakteri. Pengujian dilakukan membiakan isolat bakteri pada media Kings B. Isolat ditumbuhkan pada media Kings B teknik goresan (*steak plate*) dengan ose, diinkubasikan 24 jam, diamati warna fluorescent yang dihasilkan (Anas, 1989).

### **Pengujian Pergerakan**

Ada pergerakan bakteri, berarti bakteri tersebut memiliki flagella. Diamati dengan menginokulasikan biakan murni pada *testube* berisi media tumbuh sesuai jenis bakteri. Inokulasi cara menusukan jarum ose steril, digoreskan pada *testube*. Inkubasikan temperatur 28°C selama 24 jam di inkubator. Adanya pergerakan ditandai dengan timbulnya kekeruhan pada medium adanya perpindahan bakteri dari garis inokulasi (Sutedjo *et al*, 1991).

Hasil penemuan isolat bakteri Azotobacter pada rhizosfir tanaman padi dengan metode SRI ada 3 jenis isolat Azotobacter yang potensial seperti pada gambar dibawah ini.

#### **Uraian Singkat Gambar**



Isolat bakteri Azotobacter yang memiliki karakteristik spesifik isolat A1.b.k bentuk koloni bulat, tepi koloni utuh, warna pigmen krem kekuningan, total populasi  $1 \times 10^5$  (cfu/g tanah)



Isolat bakteri Azotobacter A2.bb.p bentuk koloni berbenang, tepi koloni berombak, warna pigmen putih, total populasi  $5 \times 10^4$  (cfu/g tanah)



Isolat bakteri Azotobacter A3.tt.k bentuk koloni tidak teratur, tepi koloni bergerigi, warna pigmen krem kekuningan, total populasi  $4 \times 10^4$  (cfu/g tanah)