

ISOLASI, IDENTIFIKASI, BAKTERI PENAMBAT NITROGEN NON SIMBIOSIS DARI DALAM TANAH

Ni Putu Ristiati, Jurusan Pendidikan Biologi FMIPA Undiksha Singaraja,
puturistiati69@gmail.com

ABSTRAK

Tujuan penelitian untuk mengetahui apakah dari sampel tanah persawahan dapat diisolasi bakteri penambat nitrogen non simbiosis dan dari 4 media diperkaya yang digunakan untuk menumbuhkan mikroba, media manakah yang paling baik untuk pertumbuhan bakteri nitrogen non simbiosis. Jumlah keseluruhan unit percobaan 25 cawan petri. Untuk menumbuhkan bakteri penambat nitrogen dilakukan dengan menggunakan 4 medium diperkaya dan 1 medium sebagai kontrol yaitu : (1) 50 gr tanah sebagai kontrol; (2) 50 gr tanah + 0,75 gr manitol (perlakuan 1); (3) 50 gr tanah + 0,75 gr manitol + 0,1 gr CaCO_3 (perlakuan 2); (4) 50 gr tanah + 0,75 gr manitol + 5 ml K_2HPO_4 3% (perlakuan 3); (5) 50 gr tanah + 0,75 gr manitol + 0,1 gr CaCO_3 + 5 ml K_2HPO_4 3% (perlakuan 4). Dari uji di laboratorium didapatkan dari sampel tanah persawahan dapat diisolasi bakteri penambat nitrogen non simbiosis yaitu : *Azotobacter sp.* Media yang diperkaya pada perlakuan 4 yang tersusun atas 50 gr tanah + 0,75 gr manitol + 0,1 gr CaCO_3 + 5 ml K_2HPO_4 3% merupakan media yang paling baik untuk pertumbuhan bakteri *Azotobacter sp.*

Kata kunci : Bakteri nitrogen non simbiosis, *Azotobacter sp.*

ABSTRACT

The role of statements presented in this research represent are from ground for rice growing soil sample can be isolated nitrogen fixation non symbiotic bacteria and from four riched media that used to growing microbes, which media are the best to growth nitrogen non symbiotic bacteria. Amounts of research units are 25 petri dish. For growing nitrogen fixation bacteria was carried out utilizing four riched media and one medium as control i.e : (1) 50 gr soil as control; (2) 50 gr soil + 0.75 gr mannitol (treatment 1); (3) 50 gr soil + 0.75 gr manntol + 0.1 gr CaCO_3 (treatment 2); (4) 50 gr soil + 0.75 gr mannitol + 5 ml K_2HPO_4 3% (treatment 3); (5) 50 gr soil + 0.75 gr mannitol + 0.1 gr CaCO_3 + 5 ml K_2HPO_4 3% (treatment 4). Assesment of laboratory test have indicated from ground for rice growing soil sample can isolated fixation nitrogen non symbiotic bacteria i.e : *Azotobacter sp.* Riched media in treatment 4 which contains 50 gr soil + 0.75 gr mannitol + 0.1 gr CaCO_3 + 5 ml K_2HPO_4 3% appear the best medium to growth *Azotobacter sp.*

Key words : Nitrogen non symbiotic bacteria, *Azotobacter sp.*

I. Pendahuluan

Tanah merupakan hasil gabungan proses fisik, kimia, dan biologi. Suatu pengamatan terhadap hampir seluruh batuan memperlihatkan adanya alga, lichenes, dan lumut. Organisme tersebut dapat tetap dorman pada batuan kering dan akan tumbuh jika batuan tersebut menjadi lembab. Organisme tersebut bersifat fototropik dan menghasilkan bahan organik yang membantu

pertumbuhan bakteri dan fungsi organotrof. Tanah, jika dianalisis akan merupakan campuran yang terdiri dari bahan organik, anorganik, air, dan udara yang keseluruhannya tercampur menjadi satu secara sempurna, sehingga sukar untuk dipisahkan antara yang satu dengan yang lainnya. Senyawa organik merupakan kumpulan sisa-sisa makanan, yang sebagian telah diuraikan dan bahan ini merupakan bagian yang mudah

dihancurkan oleh organisme tanah seperti bakteri, fungi, mikroalga dan protozoa. Dengan demikian mikroba merupakan bagian dari tanah yang memegang peranan penting dalam menentukan sifat dan tekstur tanah.

Salah satu faktor terpenting yang mempengaruhi aktivitas mikroba dalam tanah adalah air. Air merupakan komponen variabel tanah, keberadaannya bergantung pada komposisi tanah, curah hujan, aliran udara, dan penutupan tumbuhan. Air terperangkap dalam tanah dengan dua cara, yaitu : melalui adsorpsi pada permukaan tanah atau sebagai air bebas. Air dalam tanah memiliki berbagai bahan yang terlarut didalamnya; keseluruhannya bercampur menjadi larutan tanah. Dalam tanah berdrainase baik, tekanan air cepat dan konsentrasi oksigen menjadi cukup tinggi. Dalam tanah rawa, hanya terdapat oksigen yang terlarut dalam air, dan segera dikonsumsi oleh mikroba tanah. Tanah demikian akan cepat bersifat anaerobik, memperlihatkan perubahan yang sangat cepat dalam komponen biologiknya. Keadaan nutrisi dalam tanah, merupakan faktor penting lain yang mempengaruhi aktivitas mikroba tanah. Aktivitas terbesar terdapat dalam lapisan permukaan yang kaya bahan organik, khususnya pada daerah yang dekat dengan akar tumbuhan (rizosfer). Jumlah dan aktivitas mikroba tanah bergantung pada besarnya tingkat keseimbangan jumlah nutrisi. Hal ini akan berpengaruh terhadap tingkat kesuburan tanah.

Udara mengandung sekitar 80% nitrogen. Tetapi walaupun udara di atas sebidang tanah sangat kaya akan unsur tersebut, tetapi yang secara langsung dapat digunakan oleh tanaman hanya sedikit (Suriawiria,1995). Sehingga setiap saat para petani harus menambahkan sumber nitrogen ke dalam tanah dalam bentuk

pupuk yang mengandung nitrogen seperti urea, ZA, NPK.

Siklus nitrogen merupakan proses berantai yang sangat kompleks, dimana semua jasad, sejak mikroba, tanaman dan hewan berperan didalamnya. Yang penting untuk diketengahkan adalah kemampuan dari sekelompok mikroba, baik yang hidup secara simbiosis ataupun hidup bebas, yang mempunyai kemampuan untuk memfiksasi nitrogen udara. Sehingga peranan kedua kelompok tersebut memfiksasi nitrogen udara, besar pengaruhnya terhadap nilai ekonomi tanah pertanian. Kelompok mikroba tersebut dapat dibagi menjadi 2 yaitu : a) Hidup bebas/non simbiosis : *Azotobacter* dan *Beijerinckia* yang berada di lingkungan perladangan ataupun persawahan. b) Hidup bersimbiosis : *Rhizobium* yang bersimbiosis dalam akar tanaman leguminosae.

Berdasarkan latar belakang masalah yang telah diuraikan, maka dalam penelitian ini akan dikaji beberapa permasalahan sebagai berikut : (1) Apakah dari sampel tanah persawahan dapat diisolasi bakteri penambat nitrogen non simbiosis? (2) Dari 4 media diperkaya yang digunakan untuk menumbuhkan mikroba, media manakah yang paling baik untuk pertumbuhan bakteri nitrogen non simbiosis ?

Sejalan dengan orientasi latar belakang dan rumusan masalah yang ada, maka penelitian ini bertujuan : (1) Untuk mengetahui cara isolasi bakteri penambat nitrogen non simbiosis dari dalam tanah; (2) Untuk mengetahui medium diperkaya yang mana yang terbaik untuk pertumbuhan bakteri penambat nitrogen non simbiosis.

Secara lebih rinci manfaat yang dapat diharapkan dengan selesainya penelitian ini adalah sebagai berikut : (1) Dengan mengetahui cara isolasi bakteri penambat

nitrogen non simbiosis akan lebih mudah bagi mahasiswa yang mempelajari mikrobiologi terapan untuk mengamati bakteri tersebut; (2) Menambah khasanah keilmuan khususnya di bidang Ilmu Mikrobiologi Terapan

II. Metode

Jenis penelitian yang digunakan adalah eksperimen sungguhan (True experimental). Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanah persawahan di sekitar Kampus Tengah Undiksha Singaraja. Sampel dalam penelitian ini adalah tanah yang diambil dari sawah di sekitar Kampus Tengah. Pemilihan sampel secara *simple random sampling*. Perlakuan dalam penelitian ini yaitu tanah 50 gr dengan penambahan manitol, CaCO₃, K₂HPO₄ 3%. Jumlah ulangan sebanyak 5 kali berdasarkan $(t-1)(r-1) \geq 15$ (Rochiman,1989) dimana t = perlakuan dan r = replikasi. Jadi, unit percobaan akan berjumlah 5 cawan petri yang berisi tanah dan manitol, CaCO₃, K₂HPO₄ 3% untuk menumbuhkan bakteri penambat nitrogen non simbiosis. Jumlah keseluruhan unit percobaan menjadi 25 cawan petri. Untuk menumbuhkan bakteri penambat nitrogen dilakukan dengan menggunakan 4 medium diperkaya dan 1 medium sebagai kontrol yaitu : 1) 50 gr tanah sebagai kontrol; 2) 50 gr tanah + 0,75 gr manitol (perlakuan I); 3) 50 gr tanah + 0,75 gr manitol + 0,1 gr CaCO₃ (perlakuan II); 4) 50 gr tanah + 0,75 gr manitol + 5 ml K₂HPO₄ 3% (perlakuan III); 5) 50gr tanah +0,75 gr manitol +0,1 gr CaCO₃ +5 ml K₂HPO₄ 3%(perlakuan IV).

Tempat penelitian dilakukan di kota Singaraja. Tahap observasi, analisis dilakukan di laboratorium mikrobiologi Undiksha. Tahap observasi dan analisis dilaksanakan di laboratorium mikrobiologi Undiksha. Tahapan kegiatan yang

dilakukan adalah : (1) persiapan alat dan bahan, (2) pelaksanaan, (3) pengamatan.

Alat dan bahan. Alat yang digunakan : laminar air flow, timbangan, lampu spiritus, cawan petri, pipet, gelas ukur, batang pengaduk, gelas benda, labu erlenmeyer, inkubator, kawat inokulasi berkolong, mikroskop.

Bahan yang digunakan. Tanah yang diambil secara acak di sawah sekitar kampus tengah, Manitol , CaCO₃ , K₂HPO₄ 3%, Suhu yang digunakan dalam penelitian ini 37⁰C (dalam inkubator), pH optimum yaitu : 6,4 untuk pertumbuhan bakteri nitrogen non simbiosis, Alkohol 70 %, akuades steril, spiritus, *cotton swabs*, kapas, aluminium foil.

Sterilisasi alat dan bahan. Cara kerja : 1) 50 gr tanah sebagai kontrol; 2) 50 gr tanah + 0,75 gr manitol (perlakuan I); 3) 50 gr tanah + 0,75 gr manitol + 0,1 gr CaCO₃ (perlakuan II); 4)50 gr tanah + 0,75 gr manitol + 5 ml K₂HPO₄ 3% (perlakuan III); 5) 50 gr tanah + 0,75 gr manitol + 0,1 gr CaCO₃ + 5 ml K₂HPO₄ 3% (perlakuan IV).

- mencampur sampai merata masing-masing perlakuan dan kontrol di dalam cawan petri, tambahkan akuades steril sedikit demi sedikit hingga terbentuk pasta
- permukaan pasta tadi diratakan dengan menggunakan gelas benda hingga licin
- diinkubasi selama satu minggu pada suhu 37⁰C .
- mengamati dengan mikroskop pada perbesaran kuat (1000 x)
- melakukan pengecatan sederhana

Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya koloni berlendir pada permukaan tanah cawan petri masing-masing perlakuan, selain itu juga akan dilakukan tes organoleptik dengan indra penciuman untuk mengetahui bau dari masing-masing perlakuan. Dari koloni yang berlendir kemudian dilakukan

pengecatan sederhana untuk identifikasi terhadap mikroba tersebut

Data dianalisis secara kuantitatif. Data dari perlakuan kontrol dan eksperimen dengan medium yang diperkaya dibandingkan, kemudian di observasi secara morfologi dan di isolasi serta di identifikasi. Data dianalisis dengan prosedur sebagai berikut (Sujana, 1992) : 1) Uji Kolmogorov-Smirnov untuk menganalisis normalitas data; 2) Uji Leven untuk menganalisis homogenitas data; 3) Uji anava satu arah untuk menganalisis beda rerata antar kelompok; 3) Uji perbandingan ganda (multiple comparison : Post Hock) antar kelompok untuk menguji beda rerata kelompok kontrol dengan perlakuan 1, kelompok kontrol dengan perlakuan 2, kelompok kontrol dengan perlakuan 3, kelompok kontrol dengan perlakuan 4 dan perlakuan 1 dengan perlakuan 2, perlakuan 1 dan perlakuan 3, perlakuan I dan perlakuan 4 dengan menggunakan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) untuk data yang variannya homogen;

4) Dalam percobaan ini digunakan tingkat kemaknaan $\alpha = 0,05$

III Hasil dan Pembahasan

3.1 Hasil

Dari hasil pengujian di laboratorium didapatkan pada kontrol tidak terjadi pertumbuhan, karena tidak ditemukan koloni mikroba pada media. Pada eksperimen, medium tanah yang diperkaya dengan manitol saja, dan manitol + CaCO_3 menunjukkan tidak terjadi pertumbuhan, karena tidak ditemukan koloni mikroba pada media, sedang manitol + K_2HPO_4 3% , dan manitol + CaCO_3 + K_2HPO_4 3% menunjukkan terjadinya pertumbuhan karena ditemukan koloni berlendir.

Tabel 1. Hasil pengujian medium tanah terhadap pertumbuhan bakteri nitrogen non simbiosis

Media	Tanah (Kel. kontrol)	Tanah + manitol (Perlk. 1)	Tanah + manitol + CaCO_3 (Perlk. 2)	Tanah + manitol + K_2HPO_4 (Perlk. 3)	Tanah + manitol + CaCO_3 + K_2HPO_4 (Perlk. 4)
Bau	Apek	Busuk	Apek	Khas tanah	Khas tanah
Koloni	-	-	-	++	+++

Keterangan : - = tidak terjadi pertumbuhan, + = terjadi pertumbuhan

Data di atas menunjukkan bahwa pada kontrol medium berbau apek, perlakuan 1 medium berbau busuk, perlakuan 2 medium berbau apek sedang perlakuan 3 dan 4 medium berbau khas tanah. Pada kontrol, perlakuan 1 dan 2 tidak terdapat pertumbuhan, sedang pada perlakuan 3 dan 4 terdapat pertumbuhan dengan adanya koloni yang berlendir.

Sedang jumlah koloni berlendir yang ditemukan pada medium tanah dilakukan penghitungan dengan *colony counter*, hasilnya terlihat pada tabel 2.

Tabel 2 Data jumlah koloni pada kelompok kontrol, perlakuan 1, 2, 3, 4 setelah inkubasi 7 x 24 jam

Jumlah koloni kel.kontrol	Jumlah koloni Perlk. 1	Jumlah koloni Perlk. 2	Jumlah koloni Perlk. 3	Jumlah koloni Perlk. 4
0	0	0	50	79
0	0	0	58	88
0	0	0	68	84
0	0	0	69	98
0	0	0	73	102

Data di atas menunjukkan bahwa kontrol, perlakuan 1, perlakuan 2 tidak terdapat pertumbuhan, sedang perlakuan 3 dan 4 terdapat pertumbuhan koloni mikroba dan secara statistik berbeda bermakna ($p < 0,05$).

Hasil uji BNT jumlah koloni di atas menunjukkan bahwa penggunaan media berpengaruh terhadap jumlah koloni, dimana perlakuan 4 (50 gr tanah + 0,75 gr

manitol + 0,1 gr CaCO_3 + 5 ml K_2HPO_4 3%) menunjukkan beda rerata jumlah koloni yang terbanyak dengan kontrol yaitu 90,20 dan secara statistik berbeda bermakna ($p < 0,05$). Kontrol (media tanah) dan perlakuan 1 (50 gr tanah + 0,75 gr manitol) dan perlakuan 2 (50 gr tanah + 0,75 gr manitol + 0,1 gr CaCO_3) menunjukkan secara statistik tidak berbeda bermakna karena nilai $p > 0,05$.

Dilakukan pengecatan sederhana untuk mengetahui bentuk dari bakteri nitrogen non simbiosis. Pengamatan dengan mikroskop pada perbesaran 1000x menunjukkan bakteri berbentuk basil/batang berwarna merah yaitu *Azotobacter sp.* Bakteri ini tergolong Gram negatif.

3.2 Pembahasan

Temuan hasil penelitian menunjukkan koloni lebih banyak ditemukan pada media yang cembung karena adanya aerasi (oksigen lebih banyak) karena permukaan menjadi lebih luas sehingga bakteri yang tergolong aerob mengalami pertumbuhan yang optimal. Jalur katabolik yang paling umum dan paling efisien adalah respirasi aerob, dimana oksigen dikonsumsi sebagai reaktan bersama-sama dengan bahan bakar organik. Respirasi adalah sebuah proses dimana oksigen molekuler biasanya berperan sebagai penerima elektron utama. Jika oksigen adalah penerima utama, prosesnya disebut respirasi aerobik yang berbeda dengan respirasi anaerobik, dimana menggunakan unsur anorganik seperti nitrat, sulfat, atau karbonat.

Dalam proses fiksasi, N_2 direduksi menjadi amonium dan amonium dirubah menjadi bentuk organik. Proses reduksi dikatalisis oleh kompleks enzim nitrogenase yang terdiri dari dua komponen protein yang terpisah yang disebut denitrogenase dan denitrogenase reduktase. Kedua komponen mengandung besi dan denitrogenase mengandung

molibdenum, keduanya bersifat sensitif terhadap oksigen. Mo dan besi dalam denitrogenase didukung oleh kofaktor yang disebut FeMo-co, dan reduksi N_2 ternyata melibatkan besi-Mo. Enzim ini mampu mereduksi molekul berikatan tiga seperti N_2 dan membutuhkan Mg, dan stabilitas pada tiga ikatan N. Enam elektron dipindahkan untuk mereduksi N_2 menjadi 2 NH_3 dan menghasilkan beberapa tahap perantara, tetapi karena tidak ada perantara yang diisolasi, diperkirakan tiga tahap reduksi terjadi dengan perantara yang berikatan kuat pada enzim. Fiksasi nitrogen sangat reduktif di alam dan prosesnya dihambat oleh oksigen, karena denitrogenase reduktase secara cepat dan irreversibel diinaktifkan oleh oksigen (bahkan ketika diisolasi dari bakteri aerob penambat nitrogen).

Pada bakteri aerobik, fiksasi nitrogen terjadi dengan adanya oksigen dalam seluruh sel, tetapi tidak pada pemurnian penyiapan enzim, dan dalam hal ini nitrogenase dalam sel dianggap berbentuk oksigen yang dilindungi mikro-lingkungan. Beberapa bakteri dan cyanobacteri yang mampu tumbuh secara aerobik dan anaerobik, melakukan fiksasi nitrogen hanya dalam kondisi anaerobik. Biosintesa enzim ini dikontrol oleh gen *nif* yaitu gen yang mengontrol fiksasi nitrogen. Mikroorganisme menunjukkan perkembangan untuk menghindari inaktivasi enzim nitrogenase sensitif oksigen. Sebagai contoh, *Azotobacter sp* menghasilkan sejumlah salinan (copy) polisakarida, yang membantu mengurangi difusi oksigen, melindungi inaktivasi enzim tersebut.

Pada pengecatan sederhana terlihat bakteri berbentuk batang/basil, berwarna merah. Bakteri ini tergolong Gram negatif, polimorfik, motile, organisme diazotropik yaitu organisme yang mampu mengubah nitrogen menjadi amonia. Bakteri ini

adalah *Azotobacter sp.* Dalam proses kesuburan tanah tidak sedikit sumbangan yang diberikan oleh bakteri-bakteri nitrogen yang mampu menambat gas N_2 yang ada dalam udara untuk dijadikan senyawa-senyawa N yang diperlukan pula oleh tanaman. Bakteri-bakteri penambat N_2 bebas itu ada yang hidup bebas di dalam tanah seperti misalnya *Azotobacter sp.*, tetapi ada pula yang hidup bersimbiosis dengan tanaman lain, terutama jenis-jenis tanaman dari suku Leguminosae, misalnya *Rhizobium radicicola* yang membentuk bintil-bintil pada akar tanaman tersebut.

Dari tabel 2 di atas ternyata media yang diperkaya dengan K_2HPO_4 menyebabkan bakteri ini dapat tumbuh dengan baik, terlihat pada perlakuan 3 dan perlakuan 4. Hal ini disebabkan karena tersedianya posphat yang cukup untuk pertumbuhan *Azotobacter sp.* Phosphat merupakan elemen yang sangat penting di dalam kehidupan dan berada dalam bentuk phospholipida, asam nukleat dan ATP (adenosin triphosphat). Kehadirannya tidak sebesar karbon dan nitrogen, tetapi sangat menentukan sebagai faktor pembatas di dalam nutrien. Phosphat akan didapatkan didalam tanah dengan kadar 400 – 1200 mg/kg, dan kurang dari 5% didapatkan dalam bentuk phosphat anorganik, khususnya dengan Ca dan Fe.

Pada medium yang tidak mengandung phosphat tidak terdapat pertumbuhan *Azotobacter sp.* Jadi dalam pertumbuhan *Azotobacter sp.* phosphat memegang peranan penting selain karbon dan nitrogen.

IV. Simpulan dan Saran

Berdasarkan hasil penelitian didapatkan simpulan sebagai berikut :1) Dari sampel tanah persawahan dapat diisolasi bakteri penambat nitrogen non simbiosis yaitu : *Azotobacter sp.* 2) Media yang diperkaya pada perlakuan 4 yang

tersusun atas 50 gr tanah + 0,75 gr manitol + 0,1 gr $CaCO_3$ + 5 ml K_2HPO_4 3% merupakan media yang paling baik untuk pertumbuhan bakteri *Azotobacter sp.*

Berdasarkan simpulan diajukan saran sebagai berikut :1) Perlu penelitian lanjutan untuk mengetahui peranan *Azotobacter sp.* dalam membantu kesuburan tanah pertanian.2) Para petani sebaiknya memperhatikan penggunaan pupuk agar komposisi unsur phosphat sesuai untuk pertumbuhan *Azotobacter sp.* yang membantu dalam kesuburan tanah pertanian.

DAFTAR PUSTAKA

- Brock, T. D., Madigan, M.T., Martinko, J. 2003. *Biology of Microorganisms*. Sixth edition. New York : Prentice Hall.
- Benson, H. J.1990. *Microbiological Applications: A Laboratory Manual in General Microbiology*. Fifth edition. Dubuque : WCB Publishers.
- Jawetz, Melnick & Adelberg. 1996. *Mikrobiologi Kedokteran*. Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Kristanto, Philip. 2002. *Ekologi Industri*. Yogyakarta : Penerbit Andi dan LPPM Universitas Kristen Petra Surabaya.
- Kusnadi, P., Syulasmi A, Purwianingsih W., Diana. 2003. *Mikrobiologi*. Jurusan Pendidikan Biologi. FPMIPA-UPI. IMSTEP
- Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A. Rodwell, V.W. 2003. *Biokimia Harper* Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Ristiati, N.P. 2015. Pengantar Mikrobiologi Umum. UNUD Press.
- Todar, Kenneth. 1998. *Bacteriology at UW-Madison*. <http://www.bact.wisc.edu/Bact330/lecturestaph>.