

DETECTION OF NITROGENASE PRODUCING BACTERIA FROM THE SOIL OF LIWA BOTANICAL GARDEN

Christina Nugroho Ekowati*, Mica Mirani, Kusuma Handayani,
Rochmah Agustrina

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung
Jl. Prof. Soemantri Brodjonegoro No. 1, Bandar Lampung, Indonesia
*E-mail: ecoli.lacto@gmail.com

ABSTRACT

Liwa Botanical Gardens is an ex-situ conservation area for various types of plants. Each plant produces organic matter that will provide nutrients for the growth of nitrogen-fixing bacteria. This indicates the existence of an environment that supports the growth of nitrogen-fixing bacteria. Nitrogen is one of the nutrients needed by plants for their growth. However, the abundance of nitrogen in the atmosphere cannot be utilized directly by plants but needs to transform into ammonium and nitrate first. This transformation can be done by nitrogen-fixing bacteria through an enzymatic process. This research aims to obtain bacterial isolates that can fix nitrogen. Nitrogen-fixing bacteria were isolated using Nutrient Agar (NA) medium and furthered by nitrogenase activity detection test with semi-solid Nitrogen Free Bromothymol Blue (NFB). Nitrogen-fixing bacteria are characterized by color changes in the medium. The results obtained 22 isolates with 3 isolates detected capable of producing nitrogenase enzymes, namely TBP B3, TB1 B2, and TMA2 B2.

Keywords: KRL, NFB, Nitrogen, Nitrogenase.

PENDAHULUAN

Kebun Raya Liwa merupakan kawasan konservasi ex-situ untuk berbagai spesies tanaman. Keberhasilan dalam mengkonservasi berbagai jenis tanaman tidak terlepas dari ketersediaan unsur hara yang cukup di dalam tanah. Salah satu unsur hara yang dapat memacu pertumbuhan tanaman yaitu unsur nitrogen. Nitrogen berfungsi dalam sintesis klorofil, asam amino dan protein sehingga dapat meningkatkan pertumbuhan vegetatif pada tanaman (Subowo *et al.*, 2010).

Namun, unsur nitrogen dapat hilang dari tanah karena tercuci oleh aliran air, penguapan dan diserap oleh tanaman (Patti *et al.*, 2013). Keadaan tersebut membuat proses fiksasi nitrogen dari atmosfer mutlak diperlukan untuk menjaga ketersediaan nitrogen di dalam tanah. Pemulihan atau peningkatan unsur nitrogen di dalam tanah dapat dilakukan oleh bakteri penambat nitrogen.

Kemampuan bakteri dalam menambat nitrogen disebabkan adanya aktivitas nitrogenase. Nitrogenase merupakan enzim kompleks yang dikode oleh sekitar 20 gen *nifH* yang dapat mengubah bentuk nitrogen bebas di udara menjadi amonia yang selanjutnya akan diubah menjadi amonium dan nitrat yang dapat dimanfaatkan oleh tanaman (Lee *et al.*, 2000).

Bakteri penambat nitrogen yaitu diantaranya bakteri *Azospirillum*, *Azotobacter*, dan *Rhizobium* merupakan bakteri yang dapat ditemukan di daerah rhizosfer tanaman (Amalia *et al.*, 2020). Bakteri penambat nitrogen dapat dijadikan sebagai pupuk nitrogen hayati untuk menunjang pertumbuhan tanaman. Namun, sampai saat ini belum ditemukan adanya data ilmiah terkait bakteri penambat nitrogen pada tanah KRL sehingga perlu dilakukan penelitian untuk

mendapatkan isolat bakteri penambat nitrogen.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu sekop, autoklaf, inkubator, oven, neraca analitik, *hot plate*, *magnetic stirrer*, mikroskop, *ultrasonic cleaner*, *vortex mixer*, peralatan gelas, pipet volume, mikropipet.

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu *Nutrient Agar* (NA), *Nitrogen Free Bromothymol Blue* (NFB) dengan komposisi media yaitu asam malat 1 g, KOH 0,8 g, K_2HPO_4 0,1 g, $FeSO_4$ 0,01 g, $MnSO_4$ 0,002 g, $MgSO_4$ 0,004 g, NaCl 0,004 g, $CaCl_2$ 0,004 g, Na_2MoO_4 0,002 g, BTB (*Bromothymol Blue*) 2 ml, bacto agar 0,36 g untuk media semi padat dan 3,6 g untuk media padat, 200 mL akuades. semi solid, akuades, alkohol, spiritus, H_2O_2 , glukosa, sukrosa, laktosa, galaktosa, fruktosa, *Nutrient Broth* (NB), cat Gram (larutan *crystal violet*, larutan *lugol iodine*, alkohol asam, dan *safranin*) dan cat spora (larutan *safranin* dan *malachite green*).

Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel tanah dilakukan di Kawasan Kebun Raya Liwa, Lampung Barat. Sampel tanah diambil pada kedalaman 5-20 cm (Gagelidze *et al.*, 2018) dari 5 lokasi tanah yang berbeda, yaitu tanah laterit, tanah Araceae, tanah serasah, tanah miring, tanah miring Araceae, dan tanah biopori. Pengambilan sampel dilakukan sebanyak 2 titik pada setiap lokasi tanah. Kemudian dilakukan pengukuran pH pada setiap sampel tanah dengan menggunakan kertas indikator pH.

Isolasi Bakteri dari Tanah Kebun Raya Liwa

Sebanyak 1 gram sampel tanah dimasukkan pada 9 ml garam fisiologis 0,85% kemudian dihomogenkan. Selanjutnya dilakukan pengenceran bertingkat hingga 10^{-5} . Sebanyak 1 mL diambil dari pengenceran 10^{-3} , 10^{-4} , dan 10^{-5}

untuk diinokulasikan pada 20 mL media *Nutrient Agar* (NA). Selanjutnya diinkubasi selama 24 jam pada suhu $30^\circ C$ (Santoso *et al.*, 2019).

Karakterisasi Mikroskopis dan Makroskopis

Karakterisasi secara makroskopis dilakukan dengan mengamati koloni yang meliputi warna, tepi, bentuk, dan elevasi. Karakterisasi secara mikroskopis dilakukan pewarnaan Gram dan spora (Kaburuan *et al.*, 2014).

Uji Deteksi Aktivitas Nitrogenase

Isolat yang telah didapat selanjutnya dilakukan uji kemampuan dalam menambat nitrogen. Uji ini dilakukan pada media NFB semi solid (Raffi *et al.*, 2012). Uji positif penambatan nitrogen dicirikan dengan terjadinya perubahan warna media kuning menjadi biru.

Uji Fisiologis Bakteri Penambat Nitrogen

Uji fisiologis yang dilakukan yaitu uji katalase dan uji fermentasi karbohidrat. Uji katalase menggunakan H_2O_2 3% sebanyak 2-3 tetes yang ditambahkan pada 1 ose isolat bakteri penambat nitrogen. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya gelembung udara (Restuati *et al.*, 2012). Uji fermentasi karbohidrat dilakukan dengan menginokulasikan 1 ose isolat bakteri penambat nitrogen pada 9 mL media *Phenol Red Carbohydrate Broth* dengan penambahan 1% substrat karbohidrat (glukosa, sukrosa, laktosa, fruktosa, dan galaktosa) kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu $37^\circ C$. Hasil positif ditunjukkan dengan terjadinya perubahan warna media dari merah menjadi kuning karena terjadinya perubahan pH media menjadi asam (Lay *et al.*, 1994).

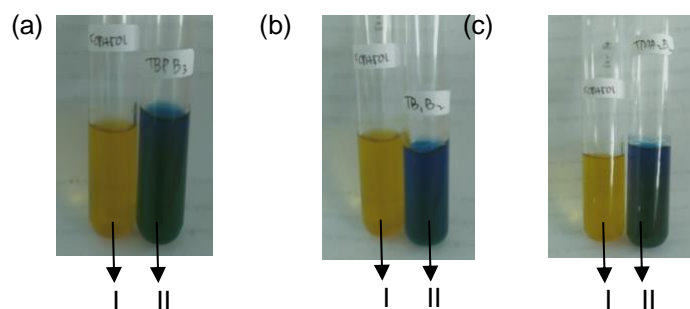
HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil pengukuran pH pada setiap sampel tanah Kebun Raya Liwa memiliki pH dengan kisaran 6-7. Bakteri penambat nitrogen dapat tumbuh pada rentang pH 4,5-8,5 (Holt *et al.*, 1994).

Kondisi pH tanah tersebut memungkinkan adanya bakteri penambat nitrogen pada tanah Kebun Raya Liwa. Hasil isolasi bakteri diperoleh 22 isolat dengan karakteristik morfologi koloni yang berbeda.

Setiap isolat yang didapatkan kemudian dilakukan uji dengan menggunakan media NFB semi solid untuk melihat kemampuan bakteri dalam menambat N_2 . Pada media NFB semi solid tidak terdapat senyawa nitrogen, sehingga bakteri yang tumbuh dapat memanfaatkan nitrogen bebas (N_2) dengan bantuan enzim nitrogenase untuk

memenuhi kebutuhan unsur nitrogen pada proses pertumbuhan bakteri tersebut. Berdasarkan hasil pengujian ini hanya 3 isolat yang menunjukkan adanya aktivitas nitrogenase dalam menambat nitrogen yaitu TBP B3, TB1 B2, dan TMA2 B2 (Gambar 1) yang ditandai dengan perubahan warna pada media menjadi biru akibat adanya aktivitas nitrogenase yang menghasilkan senyawa amonia yang bersifat basa. Media NFB menggunakan senyawa indikator *Bromothymol Blue* yang mampu merubah warna media menjadi biru ketika kondisi lingkungan basa (Hasan dan Ansori, 1992).



Gambar 1. Hasil pengamatan uji deteksi aktivitas nitrogenase: Isolat TBP B3 (a), TB1 B2 (b), TMA2 B2 (c).

Keterangan:

I : Kontrol negatif uji deteksi aktivitas nitrogenase

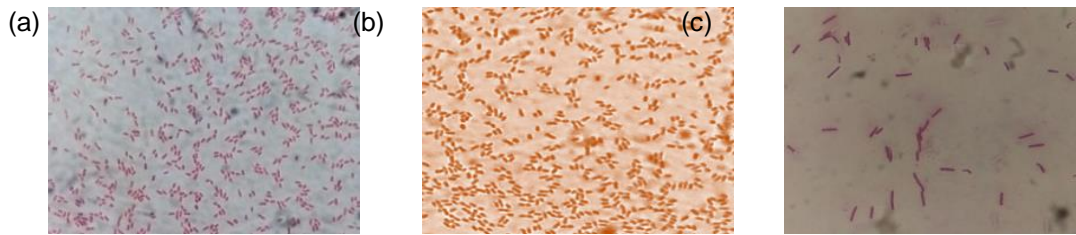
II: Hasil positif uji deteksi aktivitas nitrogenase

Proses penambatan nitrogen aktivitas enzim nitrogenase dimulai ketika nitrogen bebas di atmosfer berikatan dengan kompleks enzim nitrogenase. Pertama, protein Fe pada kompleks nitrogenase akan direduksi oleh elektron dari *ferredoxin* atau *flavodoxin*. Selanjutnya protein Fe yang tereduksi menghasilkan elektron yang akan mereduksi protein Fe-Mo. Kemudian protein Fe-Mo yang tereduksi akan memberikan sepasang elektron kepada substrat N_2 sehingga ikatan rangkap tiga akan terputus dan membentuk $HN=NH$ karena adanya penambahan ion H^+ . Selanjutnya, ikatan rangkap $HN=NH$ akan terputus dan membentuk H_2N-NH_2 . Pada akhir proses aktivitas nitrogenase akan tereduksi menjadi $2NH_3$ (Simanungkalit *et al.*, 2006).

Karakteristik makroskopis dan mikroskopis ketiga isolat tertera pada Tabel 1. Pada ketiga isolat memiliki bentuk, elevasi, dan warna koloni yang berbeda, sedangkan bentuk tepian pada isolat TBP B3 dan TMA2 B2 memiliki bentuk yang sama yaitu *entire* dan isolat TB1 B2 memiliki tepi dengan bentuk *undulate*. Hasil pengamatan mikroskopis isolat TBP B3 merupakan bakteri Gram negatif dengan bentuk sel *coccobacillus*, TB1 B2 memiliki bentuk sel *coccobacillus* dan termasuk kedalam Gram negatif, TMA2 B2 termasuk kedalam Gram yang bersifat negatif dan memiliki bentuk sel *bacilli*. Ketiga isolat setelah dilakukan pengamatan mikroskopis termasuk kedalam bakteri yang tidak memiliki kemampuan dalam membentuk spora. Hasil pengamatan mikroskopis dapat dilihat pada Gambar 2.

Tabel 1. Karakteristik makroskopis dan mikroskopis isolat penambat nitrogen.

Karakteristik	Kode Isolat		
	TBP B3	TB1 B2	TMA2 B2
Makroskopis			
Bentuk	<i>Circular</i>	<i>Irregular</i>	<i>Round</i>
Elevasi	<i>Convex</i>	<i>Raised</i>	<i>Convex</i>
Tepi	<i>Entire</i>	<i>Undulate</i>	<i>Entire</i>
Warna	Putih tulang	Putih susu	Putih transparan
Mikroskopis			
Gram	Negatif	Negatif	Negatif
Spora	-	-	-
Bentuk sel	<i>coccobacillus</i>	<i>Coccobacillus</i>	<i>Bacilli</i>



Gambar 2. Karakteristik mikroskopis isolat : (a) TBP B3; (b) TB1 B2; (c) TMA2 B2

Tabel 2. Hasil uji karakter fisiologis isolat bakteri penambat nitrogen

Isolat	Karakter Fisiologis					
	Katalase	Fermentasi Karbohidrat				
		Glukosa	Sukrosa	Laktosa	Fruktosa	Galaktosa
TBP B3	+	+	+	-	+	+
TB1 B2	-	+	+	-	+	+
TMA2 B2	+	+	+	-	+	+



Gambar 3. Hasil pengamatan uji katalase : Isolat TBP B3 terbentuk gelembung udara yang menunjukkan uji positif (a), TB1 B2 tidak membentuk gelembung udara yang menunjukkan uji negatif (b), TMA2 B2 terbentuk gelembung udara yang menunjukkan uji positif (c).

Karakter fisiologis isolat bakteri TBP B3 dan TMA2 B2 pada uji katalase memiliki respon positif dengan terbentuknya gelembung, sedangkan isolat TB1 B2 tidak memiliki enzim katalase karena tidak terbentuk gelembung (Gambar 3). Senyawa hidrogen peroksida (H_2O_2) bersifat toksik bagi sel bakteri maupun sel tanaman. Bakteri yang memiliki enzim katalase mampu mengubah H_2O_2 menjadi air dan oksigen sehingga aman untuk sel. Pada mikroorganisme enzim katalase digunakan untuk menguraikan senyawa hidrogen peroksida menjadi H_2O dan O_2 (Palealu *et al.* 2018).

Pembentukan energi oleh bakteri dapat dilakukan dengan cara proses fisiologis yaitu yaitu fermentasi. Uji fermentasi karbohidrat dilakukan untuk mengetahui kemampuan isolat dalam memecah berbagai jenis karbohidrat yang mampu menghasilkan berbagai asam organik, asam laktat, propionate, ester, dan keton (Pelczar, 2008). Berdasarkan pengamatan hasil uji fermentasi karbohidrat isolat TBP B3, TB1 B2, TMA2 B2 memiliki kemampuan dalam memfermentasi sumber karbohidrat berupa glukosa, sukrosa, fruktosa dan galaktosa. Akan tetapi ketiga isolat tidak memiliki kemampuan dalam memfermentasi laktosa. Penggunaan jenis gula sebagai sumber karbon dipengaruhi oleh sifat enzimatik di dalam sel bakteri. Oleh karena itu, tidak semua mikroorganisme mampu memanfaatkan semua jenis gula karena adanya keterbatasan aktivitas enzimatik. Keterbatasan suatu mikroorganisme dalam memanfaatkan jenis gula tertentu dapat dijadikan sebagai kunci dalam melakukan identifikasi mikroorganisme (Trivendi *et al.*, 2010).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian didapatkan 22 isolat dan 3 diantaranya terdeteksi mampu melakukan penambatan nitrogen yaitu pada tanah biopori, tanah datar, dan tanah datar Araceae dengan kode isolat TBP B3, TD1 B2, dan TDA2 B2.

DAFTAR PUSTAKA

- Amalia, D. A. L., Oedjijono, O., & Purwanto, P. (2020). Eksplorasi Bakteri Diazotrof dari Rizosfer Tanaman Bawah Merah (*Allium ascalonicum* L.) di Brebes, Jawa Tengah. *BioEksakta: Jurnal Ilmiah Biologi Unsoed*, 2(3): 464-478.
- Gagelidze, N. A., Amiranashvili, L. L., Sadunishvili, T. A., Kvesitadze, G. I., Urushadze, T. F., & Kvrivishvili, T. O. (2018). Bacterial composition of different types of soils of Georgia. *Annals of Agrarian Science*, 16(1): 17-21.
- Hasan, S., & Ansori, N. (1992). Bioteknologi Pertanian Bogor Pusat Antar Universitas Bioteknologi, Bogor: Institut Pertanian Bogor Press.
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T., & William, S. T., (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 2nd Edition. New York: Lippincott William and Wilkins.
- Kaburuan, R., Hapsah, H., & Gusmawartati, G. (2014). Isolasi dan karakterisasi bakteri penambat nitrogen non-simbiotik tanah gambut Cagar Biosfer Giam Siak Kecil-Bukit Batu. *Jurnal Agroteknologi*, 5(1): 35-39.
- Lay, B. W. (1994). *Analisis Mikroba di Laboratorium*. Jakarta: PT. Raja Grafindo Persada.
- Lee, S., Reth, A., Meletzus, D., Sevilla, M., & Kennedy, C. (2000). Characterization of a major cluster of nif, fix, and associated genes in a sugarcane endophyte, *Acetobacter diazotrophicus*. *Journal of Bacteriology*, 182(24): 7088.
- Patti, P. S., Kaya, E., & Silahooy, C. (2013). Analisis status nitrogen tanah dalam kaitannya dengan serapan N oleh tanaman padi sawah di Desa Waimital, Kecamatan Kairatu, Kabupaten Seram Bagian Barat. *Agrologia*, 2(1): 51-58.
- Pelczar, M. J. (2008). *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Malang: Djambatan.

- Pelealu, J. B., Butarbutar, R. R., & Tallei, T. E. (2018). Isolasi dan identifikasi bakteri rizosfir *Arachis pintoi* setelah inokulasi *Mikoriza Arbuskular* dan penambahan pupuk organik. *Jurnal Bios Logos*, 7(2): 35-40.
- Raffi, M. M., & Charyulu, P. B. B. N. (2012). Nitrogen fixation by the native *Azospirillum* spp. Isolated from rhizosphere and non-rhizosphere of foxtail millet. *Asian Journal of Biological and Life Sciences*, 1(3): 213-218.
- Restuati, M., & Gultom, E. S. (2012). Potensi Bakteri Yang Berasosiasi Dengan Spons Asal Pulau Ngge (Sibolga) Sebagai Sumber Antibakteri. *Jurnal Penelitian Saintika*, 12(2): 98-104.
- Santoso, K., & Rahmawati, R. (2019). Eksplorasi bakteri penambat nitrogen dari tanah Hutan Mangrove Sungai Peniti, Kabupaten Mempawah. *Protobiont*, 8(1): 52-58.
- Simanungkalit, R. D. M., Saraswati, R., Hastuti, R. D., & Husein, E. (2006). *Bakteri Penambat Nitrogen*. Bogor.: Balai Besar Litbang Sumberdaya Lahan Pertanian Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian.
- Subowo Y. B., Sugiharto, W., Suliasih, & Widawati, S. (2010). Pengujian pupuk hayati Kalbar untuk meningkatkan produktivitas tanaman kedelai (*Glycine max*) var. Baluran. *Cakra Tani*, 25(1): 112-118.
- Trivedi, P. C., Pandey, S., & Bhadauria, S. (2010). *Text Book of Microbiology*. Jaipur: Aavishkar Publishers.