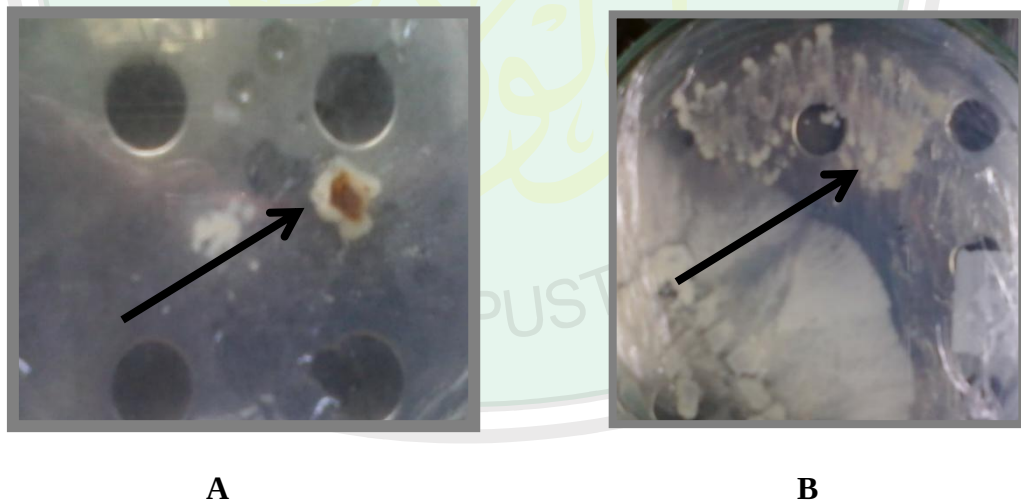


BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Isolasi dan Identifikasi Bakteri Pada Akar Tanaman *Alfafa* (*Medicago sativa* L) Yang Berpotensi Sebagai Bakteri Penambat Nitrogen.

Berdasarkan penelitian yang telah dilaksanakan pada bulan Maret sampai dengan April 2014, didapatkan 5 isolat bakteri yang diisolasi dari akar tanaman *alfafa*. Kemudian dimurnikan menjadi 10 isolat untuk diamati dan diidentifikasi untuk mengetahui hasil isolat bakteri akar tanaman *alfafa* yang berhasil ditumbuhkan pada media khusus *Rhizobium* dapat dilihat pada gambar 4.1.



Gambar 4.1 A. Salah satu morfologi koloni bakteri isolat akar *alfafa* pada saat penanaman. B. Salah satu morfologi koloni bakteri isolat akar *alfafa* pada saat pemurnian pertama.

Berdasarkan hasil penelitian dan pengamatan pada gambar 4.1 di atas, membuktikan bahwa bakteri akar tanaman *alfafa* dapat ditemukan pada jaringan akar tanaman *alfafa*. Didapatkan dari lima isolat bakteri yang telah di isolasi dari akar tanaman *alfafa*. Setelah dilakukan pengamatan didapatkan hasil sebagai berikut. Kode BA diberikan berdasarkan singkatan yang berarti (Bakteri *Alfafa*).

Tabel 4.1 Karakter Morfologi Koloni Bakteri Dari Akar Tanaman *alfafa*

NO	Kode Isolat	Morfologi Koloni			
		Bentuk	Tepi	Elevasi	Warna
1	BA 1.1	Sirkular	Udulate	Raised	Putih Kekuningan
2	BA 1.2	Sirkular	Udulate	Raised	Putih Kekuningan
3	BA 2.1	Sirkular	Udulate	Raised	Putih Kekuningan
4	BA 2.2	Sirkular	Udulate	Raised	Putih Kekuningan
5	BA 3.1	Sirkular	Udulate	Raised	Putih Kekuningan
6	BA 3.2	Sirkular	Udulate	Raised	Putih Kekuningan
7	BA 4.1	Sirkular	Udulate	Raised	Putih Kekuningan
8	BA 4.2	Sirkular	Udulate	Raised	Putih Kekuningan
9	BA 5.1	Sirkular	Udulate	Raised	Putih Kekuningan
10	BA 5.2	Sirkular	Udulate	Raised	Putih Kekuningan

Keterangan:

1. BA1 adalah bakteri dari akar tanaman *alfafa* 1.
2. BA2 adalah bakteri dari akar tanaman *alfafa* 2.
3. BA3 adalah bakteri dari akar tanaman *alfafa* 3.
4. BA4 adalah bakteri dari akar tanaman *alfafa* 4.
5. BA5 adalah bakteri dari akar tanaman *alfafa* 5.

Menurut Dwijoseputro (2005), pengamatan makroskopis morfologi koloni meliputi bentuk koloni (dilihat dari atas), permukaan koloni (dilihat dari samping), tepi koloni (dilihat dari atas) dan warna koloni bakteri. Menurut buku *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1994)*, bakteri merupakan kelompok prokariotik karena belum memiliki organel-organel sel yang kompleks, sehingga terdapat perbedaan struktur dinding sel bakteri. Oleh sebab itu ada 4 kategori umum bakteri yaitu bakteri gram positif dan bakteri gram negatif yang mempunyai dinding sel, bakteri berdinding sel tidak sempurna dan *archaeobacteria*. Bakteri akar tanaman *alfafa* termasuk kedalam kategori gram negatif yang memiliki lapisan lipid lebih tebal dari pada dinding sel bakteri gram positif.

Setelah didapatkan 10 isolat kemudian isolat tersebut diseleksi untuk mendapatkan isolat yang terbaik. Dari 10 isolat diambil 5 isolat untuk perwakilan untuk dilakukan uji selanjutnya, isolat ini mempunyai morfologi koloni dan ciri-ciri koloni yang sama.

4.2 Pewarnaan Gram.

Pewarnaan gram merupakan penentuan karakter isolat berdasarkan perbedaan struktur dinding sel bakteri gram positif dan negatif. Pewarnaan ini sebagai pembeda antar bakteri lainya. Lapisan peptidoglikan yang terdapat pada lapisan dinding sel bakteri gram positif lebih tebal jika dibandingkan dengan bakteri gram negatif. Menurut Brooks *et al.*, (2005), bakteri gram positif memiliki unsur khusus yaitu *teichoic* sebanyak 5% dari berat kering dinding sel. Unsur ini

memiliki fungsi untuk menjaga transportasi ion, integritas dinding sel, penggantian *choline* oleh *ethanolamine* sehingga resisten terhadap autolisis dan menjaga permeabilitas eksternal.

Hasil isolasi yang telah diperoleh selanjutnya dilakukan pewarnaan gram. Pewarnaan gram dilakukan pada kultur bakteri 2-3 hari yang ditumbuhkan pada media miring. Bakteri gram positif akan memberikan warna ungu ketika diberikan pewarnaan gram. Hal ini disebabkan karena bakteri ini mempunyai kandungan lipid yang lebih rendah, sehingga dinding sel bakteri akan lebih mudah terdehidrasi akibat perlakuan alkohol. Dinding sel terdehidrasi menyebabkan ukuran pori-pori sel menjadi kecil dan daya permeabilitas berkurang sehingga zat warna ungu kristal yang merupakan zat warna utama tidak dapat keluar dari sel dan sel akan tetap berwarna ungu. Bakteri gram negatif akan memberikan warna merah ketika diberi pewarnaan gram. Hal ini disebabkan karena bakteri kehilangan warna pada saat pewarnaan kristal violet pada saat pembilasan dengan alkohol, namun mampu menyerap warna tandingan yaitu pewarnaan safranin. Bakteri gram negatif mengandung lipid dalam prosentase lebih tinggi daripada yang dikandung oleh bakteri gram positif, dinding sel bakteri gram negatif lebih tipis dibandingkan dengan dinding sel gram positif (Pelczar dan Chan, 1986).

Hasil pewarnaan gram juga dapat digunakan untuk melihat susunan sel bakteri. Hasil uji pewarnaan selengkapnya dapat dilihat pada tabel 4.2.

Tabel 4.2 Hasil Uji Pewarnaan Gram Bakteri Dari Akar Tanaman *alfafa*

NO	Kode Isolat	Gram	Bentuk sel
1	BA 1	(Negatif)	Batang
2	BA 2	(Negatif)	Batang
3	BA 3	(Negatif)	Batang
4	BA 4	(Negatif)	Batang
5	BA 5	(Negatif)	Batang

Berdasarkan Tabel 4.2 menunjukkan bahwa telah diperoleh 5 isolat yang semuanya mempunyai gram negatif dengan bentuk sel batang yang ditandai dengan warna merah pada sel bakteri (Gambar 4.1). Berdasarkan hasil uji pewarnaan gram, maka ditetapkan isolat bakteri yang termasuk genus *Rhizobium* ada 5 isolat, karena bakteri berbentuk batang dan bakteri gram negatif. Selanjutnya kelima isolat tersebut akan dilakukan uji lanjutan.

4.3 Identifikasi Bakteri *Rhizobium* Sampai Tingkat Spesies dari Akar

Tanaman *alfafa*

لِّنُخْرِجَ بِهِ حَبًّا وَنَبَاتًا ﴿١٥﴾ وَجَنَّاتٍ أَلْفَافًا ﴿١٦﴾

Supaya Kami tumbuhkan dengan air itu biji-bijian dan tumbuh-tumbuhan. Dan kebun-kebun yang lebat (QS. An-Naba. 15-16).

Pada ayat di atas menjelaskan kata *alfaf* menunjukkan pepohonan di kebun yang lebat, pohon tumbuh berjajar dan bersambung satu dengan yang lainnya. Sebenarnya dalam dua ayat sebelumnya telah dijelaskan tentang bahan makanan yang tumbuh dan dimanfaatkan oleh manusia dan hewan ternak sebagian besar

dari tanah yang terdiri dari biji-bijian, sayur-mayur, akar-akaran, dan buah-buahan (Faqih, 2006).

Pada tanaman *alfafa* memiliki banyak kelebihan yang berguna bagi manusia maupun hewan. Yang paling menonjol dari tanaman ini adalah kadar protein 2 kali lipat dari rumput lain. Daun tanaman *alfafa* banyak mengandung saponin, coumestrol, vitamin, mineral, antioksidan, kandungan protein, dan serat yang tinggi sangat cocok digunakan sebagai hijauan pakan ternak sapi atau ruminansia. Kadar protein yang banyak ini berasal dari akar, akar ini bersimbiosis dengan bakteri *Rhizobium* yang dapat mengikat langsung nitrogen bebas yang ada di lingkungan sekitar (Stochmal, 2001). Pada surat Ibrahim (14):24-26 menjelaskan tentang keistimewaan akar yaitu:

أَلَمْ تَرَ كَيْفَ ضَرَبَ اللَّهُ مَثَلًا كَلِمَةً طَيِّبَةً كَشَجَرَةٍ طَيِّبَةٍ أَصْلُهَا ثَابِتٌ وَفَرْعُهَا فِي
السَّمَاءِ ﴿٢٤﴾ تُؤْتِي أُكْلَهَا كُلَّ حِينٍ بِإِذْنِ رَبِّهَا ۚ وَيَضْرِبُ اللَّهُ الْأَمْثَالَ لِلنَّاسِ
لَعَلَّهُمْ يَتَذَكَّرُونَ ﴿٢٥﴾ وَمَثَلُ كَلِمَةٍ خَبِيثَةٍ كَشَجَرَةٍ خَبِيثَةٍ اجْتُثَّتْ مِنْ فَوْقِ
الْأَرْضِ مَا لَهَا مِنْ قَرَارٍ ﴿٢٦﴾

Tidakkah kamu perhatikan bagaimana Allah telah membuat perumpamaan kalimat yang baik seperti pohon yang baik, akarnya teguh dan cabangnya (menjulang) ke langit. Pohon itu memberikan buahnya pada Setiap musim dengan seizin Tuhannya. Allah membuat perumpamaan-perumpamaan itu untuk manusia supaya mereka selalu ingat. Dan perumpamaan kalimat yang buruk seperti pohon yang buruk, yang telah dicabut dengan akar-akarnya dari permukaan bumi; tidak dapat tetap (tegak) sedikitpun.

Dari ayat di atas menerangkan bahwa akar adalah pondasi yang kuat untuk menopang kehidupan dari tumbuhan. Akar mengambil nutrisi, air, dan zat-zat yang dibutuhkan oleh tumbuhan dari tanah. Jika akar bersimbiosis dengan bakteri tertentu untuk proses pengambilan nutrisi untuk metabolisme maka tugas tumbuhan akan lebih ringan dan memungkinkan mendapatkan nutrisi, air, dan zat-zat yang dibutuhkan oleh tumbuhan lebih banyak dari pada tumbuhan yang lain.



Tabel 4.3 Hasil Identifikasi Dengan *Microbact 12B* Isolat Bakteri *Rhizobium*.

KODE ISOLAT	11-BA-4/IB	12-BA-5/IB
JENIS TES	HASIL	HASIL
BGN	POSITIF	POSITIF
SPORA	NEGATIF	NEGATIF
FERMENT GULA		
Glukosa	POSITIF	POSITIF
Xylosa	NEGATIF	NEGATIF
Mannitol	POSITIF	POSITIF
Laktosa	NEGATIF	NEGATIF
Sukrosa	POSITIF	POSITIF
Maltosa	NEGATIF	NEGATIF
Arabinosa	NEGATIF	NEGATIF
UJI PH		
4%	NEGATIF	NEGATIF
5%	POSITIF	POSITIF
6%	POSITIF	POSITIF
7%	POSITIF	POSITIF
SUHU PERTUMBUHAN		
25 ⁰ C	POSITIF	POSITIF
37 ⁰ C	NEGATIF	NEGATIF
40 ⁰ C	NEGATIF	NEGATIF
45 ⁰ C	NEGATIF	NEGATIF
TUMBUH DI		
Nutrient Broth	NEGATIF	NEGATIF
BSA	POSITIF	POSITIF
TSI	NEGATIF	NEGATIF
CITRAT	NEGATIF	NEGATIF
INDOL	NEGATIF	NEGATIF
VP	POSITIF	POSITIF
KARAKTERISTIK		
NaCl 7%	NEGATIF	NEGATIF
Motilitas	POSITIF	POSITIF
Starch hydrolysis	NEGATIF	NEGATIF
Casein hydrolysis	NEGATIF	NEGATIF
PENICILLIN	POSITIF	POSITIF
BETA-HEMOLISA	NEGATIF	NEGATIF
Katalase	POSITIF	POSITIF
Oksidase	POSITIF	POSITIF
Reduksi Nitrat	NEGATIF	NEGATIF
Reduksi Methylene Blue	NEGATIF	NEGATIF
DX. LAB.	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	<i>Rhizobium leguminosarum</i>

Berdasarkan hasil pewarnaan gram selanjutnya akan dilakukan identifikasi sampai tingkat spesies dengan menggunakan *Kit Microbact 12B* terhadap 2 perwakilan sampel yang akan diujikan yaitu BA4 dan BA5. Hal ini dikarenakan dari semua isolat yang telah di uji mempunyai ciri-ciri bentuk sel, pewarnaan gram negatif, jadi untuk pengujian *microbact 12B* perwakilan 2 sampel yang akan diujikan. Identifikasi dengan menggunakan *microbact 12B* dan didapatkan hasil bakteri *Rhizobium leguminosarum*.

Dibawah ini merupakan klasifikasi bakteri *Rhizobium leguminosarum* (Holt, 2000): Kingdom: Bacteria, Phylum: Proteobacteria, Class: Alphaproteobacteria, Order: Rhizobiales, Family: Rhizobiaceae, Genus: *Rhizobium*, Spesies: *Rhizobium leguminosarum*

4.3.1 Uji Fermentasi Gula

Berdasarkan hasil identifikasi bakteri *Rhizobium* dengan uji biokimia yang dilakukan dengan menggunakan test *Microbact 12B*, maka isolat bakteri BA4 dan BA5 kedalam spesies *Rhizobium leguminosarum*. Fermentasi gula-gula dihasilkan nilai positif (glukosa, mannitol, dan sukrosa), sedangkan pada xylosa, laktosa, maltosa, dan arabinosa bernilai negatif (Tabel 4.3). Pada umumnya bakteri menggunakan sumber karbon yaitu gula yang paling sederhana untuk fermentasi. Tidak tersedianya sumber gula sederhana membuat bakteri memanfaatkan sumber gula yang lebih kompleks untuk difermentasi (Yousef dan Clastrom, 2003). Hal tersebut dapat terlihat dari kemampuan keempat isolat yang mampu

memfermentasi beberapa gula kompleks. Komponen gula yang dapat difermentasi oleh isolat tersebut adalah glukosa, mannitol, dan sukrosa.

4.3.2 Uji pH

Uji pH 4% bernilai negatif, sedangkan pada pH 5%, 6%, dan 7% menunjukkan nilai positif menunjukkan bakteri tersebut mampu hidup dalam pH 5%-7%.(4%, 5%, 6%, dan 7%) pH media secara tidak langsung juga berhubungan dengan pH tanah dikarenakan sebagai tempat hidup bakteri tersebut. Pada pH tanah yang rendah tidak memungkinkan sel-sel rhizobial untuk bertahan hidup dalam jumlah yang memadai dalam keadaan hidup bebas (Deka dan Azad, 2006).

4.3.3 Uji Suhu Pertumbuhan

Kemudian dalam suhu pertumbuhan pada kisaran suhu 25⁰C – 35⁰C dapat tumbuh optimal, sedangkan pada suhu 37⁰C, 40 ⁰C, dan 45⁰C bernilai negatif. Untuk pertumbuhan optimum dibutuhkan temperatur 25-30° C, pH 6-7 (kecuali galur-galur dari tanah masam). Bakteri *Rhizobium leguminosarum* bersifat kemoorganotropik, yaitu dapat menggunakan berbagai karbohidrat dan garam-garam asam organik sebagai sumber karbonnya (Holl,1975).

4.3.4 Media pertumbuhan

Untuk uji pertumbuhan pada media (*Nutrient Broth*, Bismut Sulfit Agar (BSA), Triple Sugar Iron (TSI), citrat, indol, Voges Proskuer (VP)). Pertumbuhan isolat BA4 dan BA5 pada media NB, TSI, citrat, dan indol tidak mampu tumbuh di dalam media tersebut (negatif), pada media pertumbuhan BSA, dan VP bakteri

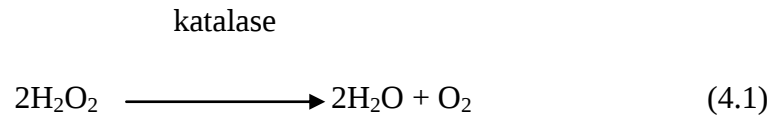
ini dapat tumbuh. Bakteri *Rhizobium* dapat hidup pada media tertentu yang banyak mengandung zat tertentu seperti media YMA. Bakteri *Rhizobium* bersifat motil pada media cair (Holl,1975).

4.3.5 Uji Karakteristik

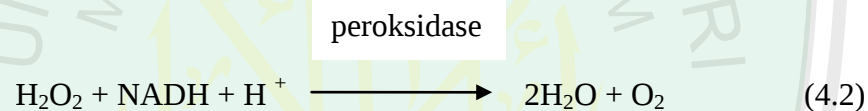
uji karakteristik (NaCl 7%, motilitas, starch hydrolysis, casein hydrolysis, penicillin, beta-hemolisa, katalase, oksidase, reduksi nitrat, dan reduksi methylene blue). Evaluasi hasil identifikasi dapat dilihat melalui sumur-sumur *microbact* apakah positif atau negatif dengan cara membandingkan dengan tabel warna dan hasilnya ditulis pada formulir *Patient Record*. Nama spesies bakteri dilihat dengan *Microbact Software* berdasarkan angka *oktal* yang didapat.

Sedangkan untuk karakteristik isolat, didapatkan hasil dengan katalase positif, motilitas positif, oksidase positif, reduksi nitrat negatif, reduksi methylene blue negatif, Starch hydrolysis negatif, casein hydrolysis negatif, penicillin sensitif, dan beta-hemolisa negatif.

Berdasarkan hasil uji karakteristik bakteri *Rhizobium leguminosarum* positif terhadap uji katalase, yaitu bakteri tersebut mempunyai kemampuan untuk menghasilkan enzim katalase. Uji katalase dilakukan pada isolat untuk mengetahui kemampuan isolat dalam menghasilkan enzim katalase serta toleransi isolat terhadap oksigen. Enzim katalase merupakan enzim yang mampu mengkatalis langsung konversi hidrogen peroksida (H_2O_2) yang toksik bagi sel menjadi air dan oksigen (BSC14424, 2000).



Berbeda dengan enzim katalase yang secara langsung mengkatalisis H_2O_2 dan O_2 , enzim peroksidase membutuhkan reduktan seperti NADH untuk mengkatalisis H_2O_2 menjadi H_2O . Berikut merupakan persamaan reaksi kimia yang dihasilkan oleh katalisis enzim peroksidase terhadap H_2O_2 (Brooks, dkk, 2005; Garbutt, 1997):



Uji katalase dilakukan dengan meneteskan 1-2 H_2O_2 pada kultur bakteri yang berumur 24 jam. Reaksi positif uji katalase ditunjukkan dengan membentuk gelembung-gelembung, yang berarti ada pembentukan gas O_2 , sehingga reaksi uji katalase terbentuk gelembung udara yang berarti terbentuk gas.

Hasil uji katalase pada bakteri *Rhizobium* pada akar tanaman *alfafa* menunjukkan hasil positif, yang ditunjukkan dengan dihasilkannya gas oksigen setelah penetesan H_2O_2 pada isolat, sehingga semua isolat yang ditemukan memiliki karakter aerob. Semua rhizobia adalah bakteri aerobik yang bertahan secara saprofit di dalam tanah sampai mereka menginfeksi bulu akar (Salisbury dan Ross, 1995).

Hasil pewarnaan endospora negatif. Pewarnaan endospora dilakukan untuk mengetahui adanya pembentukan endospora oleh bakteri. Endospora dihasilkan oleh bakteri yang mampu bertahan dari faktor lingkungan yang kurang menguntungkan seperti panas, asam dan asin untuk jangka waktu yang lama, sehingga kondisi lingkungan kembali cocok bagi perkembangannya (Travis, 2007). Hasil pewarnaan endospora pada kelima isolat dari akar tanaman *alfafa* menunjukkan hasil negatif. Hal ini menunjukkan bahwa kelima isolat bakteri yang diisolasi dari akar tanaman *alfafa* adalah bakteri rhizobium.

Endospora merupakan bentuk dorman dari sel vegetatif, sehingga metabolismenya bersifat inaktif yang mampu bertahan dalam tekanan fisik dan kimia seperti panas, kering, dingin, radiasi, dan bahan kimia. Tujuan dilakukan pewarnaan endospora adalah membedakan endospora dengan sel vegetatif, sehingga perbedaan tampak jelas. Endospora tetap dapat dilihat dibawah mikroskop meskipun tanpa pewarnaan dan tampak sebagai bulatan transparan dan sangat refraktil. Namun jika dengan pewarnaan sederhana, endospora sulit dibedakan dengan bahan inklusi (kedua-duanya transparan, sel vegetatif berwarna), sehingga diperlukan teknik pewarnaan endospora (Itis, 2008).

Uji karakteristik biokimia bakteri *Rhizobium leguminosarum* pada uji *Voges Proskauer* (VP) menunjukkan hasil positif dan *Indiol* negatif, yang berarti bakteri tidak dapat menghasilkan indiol yang tampak seperti cincin merah pada reaksi deaminasi serta asam piruvat yang dapat dimanfaatkan dalam proses fermentasi. Menurut Norman (2005), hasil positif pada uji VP menunjukkan bahwa bakteri mampu mengkonversi glukosa menjadi asetonin dan untuk uji indiol hasil negatif

menunjukkan bahwa bakteri tersebut mampu menghidrolisis triptofan dengan memanfaatkan enzim triptophanase.

Karakteristik bakteri *Rhizobium leguminosarum* secara makroskopis adalah warna koloni putih susu, tidak transparan, bentuk koloni sirkuler, konveks, semi-translusen, diameter 2-4 mm dan dalam waktu 3-5 hari pada akar khamir-manitol-garam mineral. Secara mikroskopis sel bakteri *Rhizobium leguminosarum* berbentuk batang, aerobik, gram negatif dengan ukuran 0,5-0,9x1,2-3 μm , bersifat motil pada media cair. Umumnya memiliki flagela polar atau subpolar. Untuk pertumbuhan optimum dibutuhkan temperatur 25-30° C, pH 6-7 (kecuali galur-galur dari tanah masam). Bakteri *Rhizobium leguminosarum* bersifat kemoorganotropik, yaitu dapat menggunakan berbagai karbohidrat dan garam-garam asam organik sebagai sumber karbonnya (Holl,1975).

Pada penelitian Shahzard (2012) menuliskan bahwa isolasi pada tanaman *alfafa* yang bertugas sebagai penambat nitrogen ditemukan serangkaian tes biokimia dan Gula Fermentasi dua puluh lima (25) sampel diidentifikasi sebagai *Sinorhizobium meliloti*. Hal ini berbeda dengan penelitian yang telah dilakukan. Banyak faktor yang mempengaruhi perbedaan hasil yang ditemukan seperti metode yang digunakan berbeda, parameter penelitian yang berbeda, tanah yang berbeda, letak ketinggian penanaman tanaman *alfafa*, dan masih banyak faktor lain yang mempengaruhi.

Faktor tekanan lingkungan yang tertentu dihadapi oleh nodul legum dan *Rhizobium* dapat mencakup kekurangan fotosintesis, stres air, salinitas, nitrat tanah, suhu, logam berat, dan biokimia. Sebuah kondisi tertentu juga mungkin memiliki lebih dari satu efek, misalnya salinitas dapat bertindak sebagai stres air, yang mempengaruhi laju fotosintesis, atau dapat mempengaruhi metabolisme nodul langsung. Lingkungan yang paling bermasalah untuk rhizobia adalah lahan kritis dengan curah hujan yang rendah, temperatur yang ekstrem, tanah asam status gizi rendah, dan miskin kapasitas penahan air. Populasi *Rhizobium* dan *Bradyrhizobium* spesies bervariasi dalam toleransi terhadap faktor lingkungan utama; akibatnya, penyaringan untuk rhizobium yang toleran terhadap proses biologis (misalnya, N fiksasi) mampu meningkatkan produktivitas pertanian dan meminimalkan kehilangan tanah dan memperbaiki kondisi tanah edafik (Zahran, 1999).