

NICHE Journal of Tropical Biology

Available online: <https://ejournal2.undip.ac.id/index.php/niche>

Karakterisasi bakteri diazotrof dan pengaruhnya terhadap pertumbuhan tanaman kedelai (*Glycine max* L. Merrill)

Characterization of diazotroph bacteria and their effects on soybean plant (*Glycine max* L. Merrill) growth

Luluk Aviyani Dwi Astuti^{a*}, Dwi Agustiyani Muslichah^b, Agung Suprihadi^a,
MG. Isworo Rukmi^a, Nani Mulyani^b, dan Entis Sutisna^b

^aDepartemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro, Jl. Prof. Soedharto, S. H., Tembalang, Semarang, 50275

^bLaboratorium Mikrobiologi Pertanian, Pusat Penelitian Biologi Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Jl. Raya Jakarta-Bogor Km. 46, Cibinong, Bogor, 16911

ABSTRACT

One of the challenges to increased soybean yields is the high demand for nitrogen. The average N uptake reaches up to 219 kg N/ha. So far, the N supply has been obtained from chemicals fertilizers that are not environmental-friendly. Diazotroph bacteria as candidates of biological fertilizers can support the implementation of sustainable agricultural practices and soybean self-sufficiency in Indonesia. The aims of this research were to understand the morphological and physiological characteristics of three diazotroph bacteria from The Agricultural Microbiology Laboratory Research Center of Biology Indonesian Institute of Science (LIPI) (NFB₄, NFB₁₀) and Indonesian Culture Collection (InaCC) (InaCC B₁₄₁₂) and to investigate the effects of each diazotroph bacteria inoculant on soybean plant growth as an exploration effort to the best diazotroph bacteria. The results indicated that NFB₄, NFB₁₀, and InaCC B₁₄₁₂ had quite different colony morphological characteristics, but all of them were Gram-negative, rod-shaped bacteria. Apart from their nitrogen-fixing capability, they also had various capabilities at once, such as ammonia producing, phosphates solubilizing, IAA producing, ACC deaminase producing, and siderophore producing. All of them increased root length and root dry weight of soybean plant significantly ($P \leq 0,05$), they also increased shoot length, shoot dry weight, number of nodules, leaf chlorophyll content, and number of soybean pods, albeit not significantly.

Keywords: diazotroph, nitrogen, soybean.

ABSTRAK

Salah satu tantangan dalam usaha peningkatan hasil panen kedelai adalah kebutuhan nitrogen yang tinggi. Rerata serapan N total tanaman kedelai dapat mencapai 219 kg N/ha. Sejauh ini pasokan N tanaman kedelai didapatkan dari pupuk kimia yang pada kenyataannya tidak ramah lingkungan. Bakteri diazotrof sebagai kandidat pupuk hayati dapat mendukung penerapan praktek agrikultur yang berkelanjutan dan swasembada kedelai di Indonesia. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui karakteristik morfologis dan fisiologis dari 3 isolat bakteri diazotrof koleksi Laboratorium Mikrobiologi Pertanian Pusat Penelitian Biologi Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) (NFB₄, NFB₁₀) dan *Indonesian Culture Collection* (InaCC) (InaCC B₁₄₁₂) serta mengetahui efek pemberian inokulan masing-masing isolat bakteri diazotrof terhadap pertumbuhan tanaman kedelai sebagai upaya eksplorasi isolat bakteri diazotrof terbaik. Hasil penelitian menunjukkan NFB₄, NFB₁₀, dan InaCC B₁₄₁₂ memiliki karakteristik morfologis koloni yang berbeda, namun ketiganya merupakan bakteri Gram negatif dengan sel berbentuk basil. Selain memiliki kemampuan penambat nitrogen, ketiganya memiliki beberapa kemampuan sekaligus, yaitu sebagai penghasil amonia, pelarut fosfat, penghasil IAA, penghasil ACC deaminase, dan penghasil siderofor. Ketiga isolat bakteri diazotrof tersebut dapat meningkatkan panjang dan berat kering akar tanaman kedelai secara signifikan ($P \leq 0,05$), dan dapat meningkatkan panjang tajuk, berat kering tajuk, jumlah bintil akar, klorofil, dan jumlah polong tanaman kedelai walaupun tidak secara signifikan.

Kata kunci: diazotrof, kedelai, nitrogen.

*Penulis korespondensi: luluaviyani@gmail.com

Diterima 31 Desember 2020, Disetujui 1 Februari 2021

Disarankan menyitasi artikel ini sebagai: Astuti et al, *NICHE J Trop Bio* (2021) 4(1) 40-49

I. PENDAHULUAN

Kedelai merupakan komoditas pangan terpenting setelah padi dan jagung. Kedelai memiliki peran penting sebagai sumber protein dan minyak nabati untuk meningkatkan gizi masyarakat. Menurut Anggrainy, dkk., (2018) ketergantungan Indonesia terhadap kedelai impor hingga tahun 2006 sangatlah tinggi yaitu lebih dari 60%, namun berdasarkan data BPS (2018) produktivitas tanaman kedelai di Indonesia pada tahun 2018 justru mengalami penurunan sebesar 4,62% dibandingkan tahun 2017. Data tersebut menunjukkan bahwa telah terjadi ketidakseimbangan antara kebutuhan dengan produktivitas kedelai.

Salah satu tantangan dalam usaha peningkatan hasil panen kedelai adalah kebutuhan akan nitrogen yang tinggi dibandingkan dengan tanaman sereal dan biji-bijian lainnya. Penyerapan unsur nitrogen adalah pendorong utama hasil panen kedelai. Salvagiotti, *et al.*, (2008) menyebutkan terdapat hubungan linear antara hasil panen dengan penyerapan N oleh tanaman kedelai. Rerata serapan N total dapat mencapai 219 kg N.ha⁻¹. Ketersediaan nitrogen yang melimpah di atmosfer tidak dapat digunakan oleh tanaman secara langsung. Bentuk nitrogen yang dapat diambil oleh tanaman dari tanah adalah nitrat (NO₃⁻) dan amonium (NH₄⁺). Kedua bentuk nitrogen tersebut dapat berasal dari pupuk urea atau pupuk NPK pada kenyataannya tidak ramah lingkungan dan Penambatan Nitrogen Hayati (PNH) oleh mikroba tanah. Menurut Rascio & La Rocca (2013) sebesar 80-90% ketersediaan nitrogen bagi tanaman di ekosistem alami berasal dari PNH.

Bakteri diazotrof adalah bakteri yang mampu menambat nitrogen bebas di udara (N₂) dan mengubahnya menjadi amonia (NH₃). Berdasarkan cara penambatan nitrogen, bakteri diazotrof dibagi menjadi dua kelompok, yaitu bakteri non simbiotik dan bakteri simbiotik. Bakteri diazotrof non simbiotik adalah bakteri penambat nitrogen yang hidup bebas bukan pada jaringan tanaman, sedangkan bakteri diazotrof simbiotik adalah bakteri penambat nitrogen yang hidup bersama dalam jaringan akar tanaman polong-polongan atau tanaman lainnya. Simbiosis antara bakteri diazotrof dengan akar tanaman adalah berupa pembentukan bintil akar (Danapriatna, 2010).

Disamping karakteristik bakteri diazotrof sebagai penambat nitrogen, bakteri diazotrof juga dapat memiliki karakteristik seperti pelarut fosfat, produsen hormon IAA, produsen ACC deaminase, dan produsen siderofor (Shin, *et al.*, 2016). Bakteri diazotrof yang diberikan sebagai inokulan pada tanaman kedelai dilaporkan telah berhasil meningkatkan kualitas kedelai (Batista, *et al.*, 2018; de Souza, *et al.*, 2019). Ketika beberapa benih tanaman diinokulasi dengan bakteri diazotrof, terjadi peningkatan perkecambahannya, biomass, kandungan nitrogen dan klorofil (Riggs, *et al.*, 2001; Meena, *et al.*, 2012). Bakteri diazotrof memiliki prospeksi sebagai kandidat pupuk hayati tanaman kedelai yang lebih ramah lingkungan untuk mendukung penerapan agrikultur yang berkelanjutan dan swasembada kedelai di Indonesia.

Laboratorium Mikrobiologi Pertanian Pusat Penelitian Biologi Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) dan *Indonesian Culture Collection* (InaCC) memiliki berbagai koleksi isolat bakteri diazotrof yang belum diketahui karakteristiknya, antara lain isolat NFB₄, NFB₁₀, dan InaCC B₁₄₁₂. Isolat tersebut merupakan sumber plasma nutfah yang dapat diteliti dan berpotensi untuk dikembangkan lebih lanjut. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui karakteristik morfologis dan fisiologis dari ketiga isolat bakteri diazotrof koleksi Laboratorium Mikrobiologi Pertanian Pusat Penelitian Biologi LIPI dan InaCC tersebut, serta mengetahui efek pemberian inokulan masing-masing isolat terhadap pertumbuhan tanaman kedelai sebagai upaya eksplorasi isolat bakteri diazotrof terbaik.

II. MATERI DAN METODE

Karakterisasi Morfologis

Isolat bakteri diazotrof dikarakterisasi secara morfologi berdasarkan metode Harley & Prescott (2002). Bakteri diinokulasikan pada media *Nutrient Agar* (NA) dan diinkubasi selama 3 hari untuk pengamatan morfologi bentuk, warna, dan elevasi koloni dan diinkubasi selama 24 jam untuk pengamatan jenis Gram dan bentuk sel bakteri.

Uji Penambatan Nitrogen

Aktivitas penambatan nitrogen dari isolat bakteri diazotrof diuji secara kualitatif berdasarkan metode Baldani, *et al.*, (2014) yang telah dimodifikasi. Masing-masing isolat diinokulasi gores pada media bebas nitrogen *New Fabio* (NFb) padat yang telah ditambahkan dengan larutan *bromthymolblue* sebagai indikator pH. Sampel diinkubasi pada suhu ruang selama 1 minggu. Aktivitas penambatan nitrogen diindikasikan dengan perubahan warna sampel menjadi biru.

Uji Produksi Amonia

Produksi amonia oleh isolat bakteri diazotrof diuji secara kualitatif berdasarkan metode Agbodjato, *et al.*, (2015) yang telah dimodifikasi. Sebanyak 1 ose bulat dari masing-masing isolat diinokulasikan pada 5 ml kaldu pepton (0.5% (w/v)) pada botol vial. Sampel diinkubasi dan digojok dengan *shaker* dengan kecepatan 120 rpm pada suhu ruang selama 48 jam. Setelah masa inkubasi, sebanyak 0,1 ml reagen *Nessler's* ditambahkan pada suspensi bakteri. Produksi amonia diindikasikan dengan perubahan warna sampel menjadi kuning-coklat.

Uji Pelarutan Fosfat

Aktivitas pelarut fosfat dari isolat bakteri diazotrof diuji secara kualitatif berdasarkan metode Chawngthu, *et al.*, (2020) yang telah dimodifikasi. Masing-masing isolat diinokulasi titik pada bagian tengah media *Pikovskaya* (PK) padat. Sampel diinkubasi pada suhu ruang selama 3 hari. Aktivitas pelarut fosfat diindikasikan dengan munculnya zona bening di sekitar koloni. Diameter total (koloni + zona bening) dan diameter koloni kemudian diukur menggunakan penggaris. Indeks Pelarutan Fosfat (IPF) dihitung berdasarkan rasio diameter total dengan diameter koloni.

$$IPF = \frac{\text{Diameter koloni} + \text{Diameter zona bening}}{\text{Diameter koloni}}$$

Uji Produksi Siderofor

Produksi siderofor oleh isolat bakteri diazotrof diuji secara kualitatif berdasarkan metode Pahari & Mishra (2017) yang telah dimodifikasi. Masing-masing isolat diinokulasi titik pada media *Chrome Azurol Sulfonate* (CAS) padat. Sampel diinkubasi pada suhu ruang selama 5 hari. Produksi siderofor oleh isolat bakteri diazotrof diindikasikan dengan munculnya zona berwarna jingga di sekeliling koloni bakteri. Diameter total zona jingga dan diameter koloni kemudian diukur menggunakan penggaris. Besarnya aktivitas produksi siderofor ditentukan berdasarkan nilai indeks, yaitu rasio antara diameter total zona jingga dengan diameter koloni bakteri.

Uji Produksi IAA

Produksi IAA oleh isolat bakteri diazotrof diuji secara kualitatif berdasarkan metode Kachhap, *et al.*, (2015) yang telah dimodifikasi. Masing-masing isolat diinokulasi gores pada media *Tryptic Soy Agar* (TSA) yang telah ditambahkan dengan larutan triptofan 200 ppm. Sampel diinkubasi pada suhu ruang selama 3 hari. Isolat yang tumbuh ditetesi reagen *Salkowski* kemudian diinkubasi pada tempat gelap selama 30 menit. Produksi IAA oleh isolat bakteri diazotrof diindikasikan dengan munculnya reaksi warna merah pada sampel.

Uji Produksi ACC Deaminase

Produksi ACC deaminase oleh isolat bakteri diazotrof diuji secara kualitatif berdasarkan metode Kushwah, *et al.*, (2015) yang telah dimodifikasi. Masing-masing isolat diinokulasi gores pada media minim garam *Dworkin-Foster* (DF) padat yang diperkaya dengan larutan 3 mmol ACC steril (DF+ACC). Sampel diinkubasi pada suhu ruang selama 1 minggu. Produksi ACC deaminase diindikasikan dengan tumbuhnya isolat pada media DF+ACC.

Uji Biologis pada Tanaman Kedelai

Uji biologis pada tanaman kedelai dilakukan dalam rumah kaca Laboratorium Mikrobiologi Pertanian Pusat Penelitian Biologi LIPI. Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 4 perlakuan masing-masing 5x pengulangan. Perlakuan yang diberikan adalah inokulan dari masing-masing isolat bakteri diazotrof (NFB₄, NFB₁₀, dan InACC B₁₄₁₂) serta perlakuan kontrol tanpa pemberian inokulan bakteri. Isolat bakteri diazotrof ditumbuhkan hingga mencapai kerapatan kultur 10⁸ CFU/ml pada 200 ml media *Nutrient Broth* (NB) berdasarkan hasil perhitungan Angka Lempeng Total (ALT) dan pengukuran Densitas Optik (OD).

Sebelum digunakan, benih kedelai disterilisasi permukaannya dengan cara dicelup ke dalam alkohol 70% selama 1 menit kemudian dibilas dengan akuades steril hingga 3x. Benih kedelai dikecambahkan pada cawan petri besar secara aseptis. Kecambah berumur 48 jam kemudian direndam dalam masing-masing kultur inokulan isolat bakteri diazotrof selama 1 jam sebagai perlakuan awal. Kecambah yang telah direndam dalam kultur inokulan isolat bakteri diazotrof ditanam pada masing-masing ember kecil berisi media tanam berupa pasir steril. Tanaman disiram secara rutin sekali

sehari dengan larutan nutrisi bebas nitrogen. Kultur inokulan bakteri dengan kerapatan yang sama diberikan kembali pada masing-masing pot perlakuan sebanyak 10 ml dengan cara disiramkan pada hari ke-7, ke-14, dan ke-21 setelah tanam.

Setelah 45 hari, tanaman kedelai dipanen dan diamati parameter pertumbuhannya. Parameter yang diamati yaitu, panjang tajuk, panjang akar, berat kering tajuk, berat kering akar, jumlah bintil akar, kandungan klorofil daun, dan jumlah polong. Panjang tajuk dan akar diukur menggunakan penggaris. Tajuk dan akar dikeringkan dengan oven pada suhu 80°C selama 48 jam. Berat kering ditimbang menggunakan timbangan analitik. Jumlah polong dan bintil akar dihitung secara manual. Kandungan klorofil daun ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) diukur menggunakan klorofil meter SPAD (*Minolta SPAD-502*) dan dihitung berdasarkan rumus (Cerovic, *et al.* 2012):

$$\text{Klorofil} = \frac{99 \times \text{SPAD}}{144 - \text{SPAD}}$$

Analisis Statistik

Data hasil uji biologis pada tanaman kedelai dianalisis secara statistik menggunakan program SPSS (versi 25, *IBM Statistics*). Normalitas data diuji menggunakan uji *Shapiro-Wilk*. Homogenitas data diuji menggunakan uji *Levene*. Uji *Analysis of Variance* (ANOVA) *One-Way* digunakan untuk menentukan efek dari masing-masing perlakuan dan apabila terdapat perbedaan nyata akan dilakukan uji lanjut *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT) dengan $P \leq 0,05$. Uji non parametrik *Kruskal-Wallis* digunakan apabila data tidak memenuhi asumsi normalitas dan atau homogenitas.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik Morfologis dan Fisiologis

Ketiga isolat bakteri diazotrof merupakan bakteri Gram negatif dengan sel berbentuk basil atau batang. Morfologi koloni isolat NFB₁₀ dan InaCC B₁₄₁₂ memiliki kemiripan, yaitu koloni berbentuk bulat namun dengan ukuran yang berbeda, berwarna putih susu, dan memiliki elevasi cembung, sedangkan NFB₄ memiliki morfologi koloni yang berbeda dengan 2 isolat lainnya, yaitu koloni berwarna kuning dan memiliki elevasi timbul. Hasil karakterisasi morfologi dan fisiologi dari ketiga isolat bakteri diazotrof tertera pada Tabel 1.

Tabel 1. Karakteristik morfologis dan fisiologis ketiga isolat bakteri diazotrof

Karakteristik	Isolat Bakteri Diazotrof		
	NFB ₄	NFB ₁₀	InaCC B ₁₄₁₂
Morfologis:			
Bentuk Koloni	Bulat besar	Bulat besar	Bulat kecil
Warna	Kuning	Putih Susu	Putih Susu
Elevasi	Timbul	Cembung	Cembung
Gram	Negatif (-)	Negatif (-)	Negatif (-)
Bentuk Sel	Basil	Basil	Basil
Fisiologis:			
Penambat N	++	++	+
Produksi Amonia	++	+++	+++
Pelarut P (i)	1,68	1,37	1,70
Produksi Siderofor (i)	1,33	2,35	1,67
Produksi IAA	+	++	+
Produksi ACC deaminase	+++	+	+

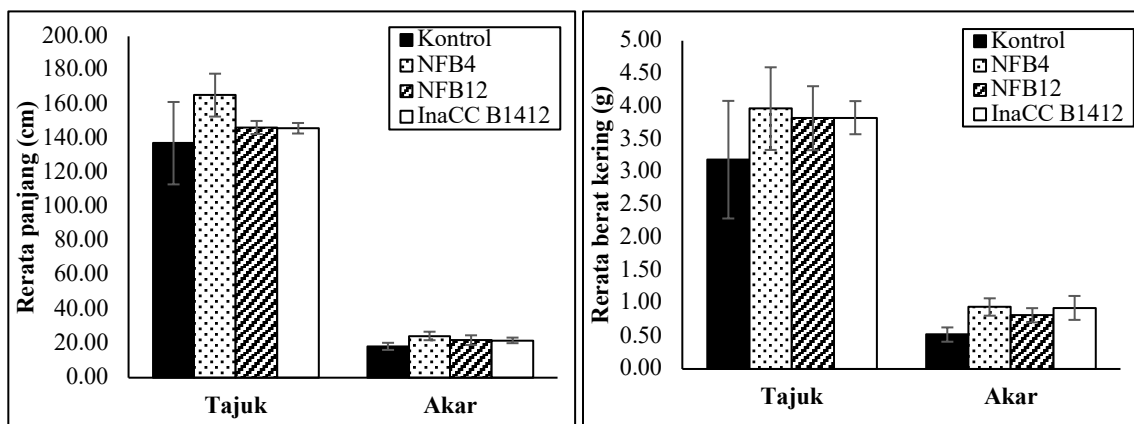
Keterangan: Uji penambat N: (+) media berubah warna menjadi biru muda tipis; (++) biru muda; (+++) biru. Uji produksi amonia: (+) media berubah warna menjadi kuning; (++) kuning-jingga; (+++) jingga. Uji produksi IAA: (+) timbul reaksi warna merah muda tipis; (++) merah muda; (+++) merah. Uji produksi ACC deaminase: (+) inokulum tumbuh tipis di media DF+ACC; (++) cukup tebal; (+++) tebal. (i) = nilai indeks.

Sesuai dengan pernyataan Kaschuk & Hungria (2017) yang menyebutkan bahwa kelompok bakteri diazotrof termasuk dalam kelompok bakteri Gram negatif. Hasil serupa dilaporkan oleh Prayitno & Rolfe (2010), yaitu karakteristik morfologis dari berbagai isolat bakteri diazotrof yang didapatkan dari rhizosfer dan permukaan akar tanaman padi didominasi oleh bakteri berbentuk koloni bulat, berwarna putih, memiliki elevasi cembung, sel berbentuk basil dan termasuk bakteri Gram negatif. Govindarajan, *et al.*, (2007) juga melaporkan hasil isolasi bakteri diazotrof pada tanaman tebu memiliki karakteristik morfologis koloni berbentuk bulat, berwarna putih, ada juga yang berwarna kuning, dan memiliki elevasi cembung, yang kemudian diidentifikasi sebagai spesies dari genus *Pseudomonas*, *Burkholderia*, dan *Klebsiella*.

Efek Isolat Bakteri Diazotrof Terhadap Pertumbuhan Tanaman Kedelai

Ketiga isolat bakteri diazotrof (NFB₄, NFB₁₀, dan InaCC B₁₄₁₂) secara keseluruhan menunjukkan efek positif terhadap pertumbuhan tanaman kedelai. Hasil dapat teramati pada panjang tajuk, panjang akar, berat kering tajuk, berat kering akar, jumlah bintil akar, kandungan klorofil daun, dan jumlah polong tanaman kedelai pada 45 Hari Setelah Tanam (HST). Perlakuan kontrol tanpa isolat bakteri menunjukkan hasil terendah di semua parameter.

Perlakuan NFB₄ menunjukkan panjang tajuk dan akar terpanjang, diikuti oleh perlakuan NFB₁₀ dan InaCC B₁₄₁₂ secara berturut-turut. Perlakuan NFB₄ juga menunjukkan berat kering tajuk dan akar terbesar diikuti oleh perlakuan InaCC B₁₄₁₂ dan NFB₁₀ secara berturut-turut (Gambar 1). Secara statistik non-parametrik *Kruskal-Wallis*, terdapat perbedaan yang nyata pada perlakuan isolat bakteri diazotrof terhadap panjang tajuk tanaman kedelai, namun terdapat perbedaan yang tidak nyata pada perlakuan isolat bakteri diazotrof terhadap berat kering tajuk tanaman kedelai. Secara statistik parametrik ANOVA dan uji *Duncan*, terdapat perbedaan yang nyata dan signifikan ($P \leq 0,05$) pada perlakuan isolat bakteri diazotrof terhadap panjang dan berat kering akar tanaman kedelai (Tabel 2).



Gambar 1. Diagram rerata panjang dan berat kering dari tajuk dan akar tanaman kedelai 45 HST

Tabel 2. Panjang dan Berat Kering dari Tajuk dan Akar Tanaman Kedelai 45 HST

Perlakuan	Panjang Tajuk (cm)*	Panjang Akar (cm)	Berat Kering Tajuk (g)**	Berat Kering Akar (g)
Kontrol	137,40 ± 24,14	18,35 ± 2,08 ^a	3,19 ± 0,90	0,52 ± 0,11 ^a
NFB ₄	165,55 ± 12,57	24,45 ± 2,49 ^b	3,97 ± 0,63	0,94 ± 0,13 ^b
NFB ₁₀	146,60 ± 3,83	22,00 ± 2,83 ^b	3,82 ± 0,49	0,82 ± 0,11 ^b
InaCC B ₁₄₁₂	146,15 ± 3,09	21,85 ± 1,64 ^b	3,83 ± 0,25	0,93 ± 0,18 ^b

Keterangan: Masing-masing nilai menunjukkan rerata ± standar deviasi. Nilai yang diikuti oleh notasi huruf yang berbeda menunjukkan signifikansi secara statistik berdasarkan uji lanjut DMRT (*Duncan's Multiple Range Test*) ($P \leq 0,05$). *Uji non-parametrik *Kruskal-Wallis* menunjukkan hasil yang berbeda nyata. **Uji non-parametrik *Kruskal-Wallis* menunjukkan hasil yang berbeda tidak nyata.

Salah satu faktor yang berhubungan dengan panjang tajuk dan akar tanaman adalah hormon IAA. IAA yang dihasilkan oleh bakteri disebut dengan IAA eksogen. Berdasarkan hasil uji secara *in vitro* kemampuan bakteri dalam menghasilkan IAA, ketiga isolat bakteri mampu menghasilkan IAA. Menurut Glick (2013), IAA secara langsung berperan dalam pemanjangan dan pembelahan sel tanaman kedelai. ACC deaminase yang dihasilkan oleh bakteri juga dapat bekerjasama dengan IAA dalam hal pemanjangan akar.

Selain kemampuan isolat bakteri dalam menghasilkan IAA dan ACC deaminase, semua isolat bakteri memiliki kemampuan produksi siderofor. Kemampuan produksi siderofor mampu mendukung pemanjangan akar. Pahari & Mishra (2017) menyebutkan bahwa siderofor yang dihasilkan oleh bakteri rhizosfer dapat meningkatkan kolonisasi bakteri pada rhizosfer dan berperan penting dalam mineralisasi unsur besi bagi tanaman. Oleh karena itu, perlakuan dengan isolat bakteri memiliki panjang akar yang lebih panjang dibandingkan kontrol. Semakin panjang akar semakin banyak pula permukaan akar yang dapat digunakan untuk menyerap nutrisi pada media tanam sehingga dapat meningkatkan pertumbuhan tanaman.

Pada akar tanaman NFB₄ dan InaCC B₁₄₁₂ dapat ditemukan sejumlah bintil sedangkan pada perlakuan kontrol dan NFB₁₀ sama sekali tidak ditemukan bintil akar (Tabel 3). Perlakuan kontrol tidak mampu menghasilkan bintil karena tidak adanya inokulan bakteri yang diberikan. NFB₄ dan InaCC B₁₄₁₂ diduga tergolong bakteri diazotrof simbiotik dan dapat membentuk bintil akar, sedangkan NFB₁₀ diduga tergolong bakteri diazotrof non simbiotik dan tidak membentuk bintil akar.

Tabel 3. Jumlah Bintil Akar, Kandungan Klorofil, dan Jumlah Polong Tanaman Kedelai 45 HST

Perlakuan	Jumlah Bintil Akar		Kandungan Klorofil ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)**	Jumlah Polong*
	Total	¶		
Kontrol	-		15,65 \pm 2,64	0 \pm 0
NFB ₄	2		21,66 \pm 3,66	2 \pm 2
NFB ₁₀	-		16,02 \pm 2,01	4 \pm 3
InaCC B ₁₄₁₂	6		22,08 \pm 6,06	8 \pm 4

Keterangan: Masing-masing nilai menunjukkan rerata \pm standar deviasi. *Uji non-parametrik *Kruskal-Wallis* menunjukkan hasil yang berbeda nyata. **Uji non-parametrik *Kruskal-Wallis* menunjukkan hasil yang berbeda tidak nyata. ¶Data tidak dianalisis secara statistik.

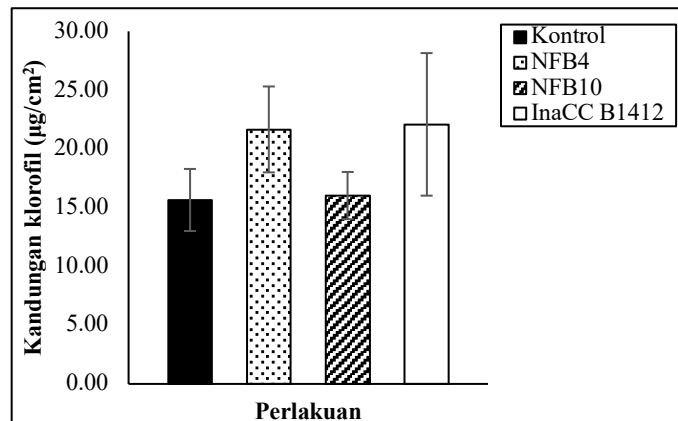
Pembentukan bintil akar juga bergantung pada spesifikasi dan kompatibilitas rhizobia dengan tanaman inang. Dalam proses pembentukan bintil akar, dapat diasumsikan bahwa NFB₄ dan InaCC B₁₄₁₂ lebih spesifik dan kompatibel dengan tanaman kedelai dibandingkan dengan NFB₁₀. Beberapa contoh rhizobia yang secara spesifik berasosiasi tanaman kedelai adalah *Rhizobium japonicum* (Kaschuk & Hungria, 2017) *Bradyrhizobium japonicum* dan *Sinorhizobium fredii* (Masciarelli, et al., 2014; de Souza, et al., 2019). Tanaman kedelai dengan bintil akar memiliki berat kering lebih berat dibandingkan tanaman tanpa bintil akar. Bintil akar dapat menandakan bahwa tanaman dapat menambat nitrogen bebas di udara oleh bantuan bakteri diazotrof.

Unsur N dan P merupakan dua unsur dominan penyusun tubuh makhluk hidup. Menurut Rohmah & Saputro (2016), berat kering merupakan salah satu indikator baik tidaknya pertumbuhan suatu tanaman. Berat kering merupakan akumulasi hasil fotosintat berupa protein, karbohidrat, dan lipid. Kifle & Laing (2016) menyebutkan bahwa efek positif yang didapatkan dari inokulasi bakteri diazotrof pada berat kering tanaman berhubungan dengan kemampuan bakteri diazotrof dalam menambat nitrogen dan melarutkan fosfat. Sharma, et al., (2013) juga menyebutkan bahwa fosfat menyumbang 0,2 hingga 0,8% dari berat kering tanaman. Ketidakterersediaan dan kekurangan unsur fosfat dapat mengurangi ukuran dan menghambat pertumbuhan tanaman.

Kemampuan bakteri dalam menambat nitrogen bebas dari udara, menghasilkan amonia, dan melarutkan fosfat pada media tanam dapat meningkatkan berat kering tajuk dan akar tanaman kedelai. Larutan penyiraman yang digunakan sama sekali tidak mengandung unsur N tetapi mengandung senyawa kalium dihidrogen fosfat (KH₂PO₄). N bebas diudara dan P pada pada larutan penyiraman tidak dapat digunakan secara langsung oleh tanaman kedelai, sehingga tanaman kedelai membutuhkan kehadiran mikroorganisme yang mampu membantunya dalam menambat N bebas dari udara dan melarutkan P dalam media tanam. Perlakuan kontrol tanpa inokulan bakteri kurang optimal dalam menyerap

unsur N dan P sehingga memiliki berat kering tajuk dan akar yang lebih ringan dibandingkan dengan tanaman dengan inokulan bakteri.

Bintil akar yang terbentuk juga dapat memengaruhi kandungan klorofil daun tanaman kedelai. Secara statistik non-parametrik *Kruskal-Wallis*, terdapat perbedaan yang tidak nyata pada perlakuan isolat bakteri diazotrof terhadap kandungan klorofil tanaman kedelai, namun perlakuan kontrol tanpa isolat bakteri menunjukkan kandungan klorofil terendah dibandingkan dengan perlakuan isolat bakteri (Gambar 2 dan Tabel 3).



Gambar 2. Diagram rerata kandungan klorofil daun tanaman kedelai 45 HST

Hasil serupa telah dilaporkan oleh Kifle & Laing (2016), yaitu pemberian bakteri diazotrof dapat meningkatkan kandungan klorofil daun tanaman jagung. Menurut Khaitov (2018) kandungan klorofil dapat menunjukkan keadaan nutrisi pada daun yang berhubungan dengan pertumbuhan dan produktivitas tanaman secara keseluruhan. Klorofil berkaitan langsung dengan proses fotosintesis. Unsur N merupakan salah satu penyusun molekul klorofil. Tanaman yang kekurangan unsur N dapat mengakibatkan tanaman kekurangan klorofil.

Apabila dilihat dari jumlah bintil akar yang ditemukan pada akar tanaman, semakin sedikit bintil yang ditemukan pada perlakuan, semakin rendah kandungan klorofil daun. Pada perlakuan NFB₁₀ yang tidak ditemukan bintil akar sama sekali, memiliki kandungan klorofil paling rendah diantara perlakuan isolat bakteri lainnya. Media tanam pasir yang digunakan merupakan pasir steril dengan sedikit bahkan tanpa mineral. Pasokan mineral hanya didapatkan dari pemberian larutan nutrisi pada saat penyiraman. Tanaman dengan bintil akar dapat mengolah unsur N lebih baik dalam meningkatkan kandungan klorofil daun. Adanya bintil akar mampu meningkatkan proses penambatan N bebas di udara.

Isolat InaCC B₁₄₁₂, NFB₄, NFB₁₀ dengan nilai Indeks Pelarutan Fosfat (IPF) berturut-turut 1,70; 1,68; dan 1,37 (Tabel 1) juga memiliki nilai klorofil dari tinggi ke rendah 22,08 ± 6,06 µg/cm²; 21,66 ± 3,66 µg/cm²; dan 16,02 ± 2,01 µg/cm² (Tabel 3). Hal ini menunjukkan bahwa isolat dengan kemampuan pelarutan fosfat dapat meningkatkan kandungan klorofil tanaman. Unsur P dibutuhkan dalam proses transfer energi yang melibatkan ATP di hampir setiap reaksi metabolisme.

Terdapat beberapa penelitian yang menyatakan bahwa produksi siderofor oleh mikroba rhizosfer dapat meningkatkan pasokan unsur Fe pada tanaman (Kotasthane, *et al.*, 2017; Priyanka, *et al.*, 2017). Siderofor mengikat Fe³⁺ (*ferri*) dan membuatnya tersedia bagi pertumbuhan mikroba itu sendiri dan juga bagi tanaman. Unsur Fe merupakan unsur mikro yang cukup penting dalam biosintesis klorofil dan fotosintesis tanaman. Fe bertindak sebagai kofaktor dari enzim-enzim yang terlibat dalam jalur biosintesis klorofil dan proses fotosintesis. Unsur-unsur seperti N, P, dan Fe yang penting bagi pertumbuhan tanaman mampu disediakan oleh bakteri diazotrof. Ketiga unsur tersebut saling berkaitan satu sama lain.

Pertumbuhan tanaman terbagi menjadi dua fase yaitu, fase vegetatif dan fase generatif (reproduktif). Fase generatif dimulai ketika bunga pertama kali muncul. Pada penelitian, teramati bahwa waktu dimulainya fase generatif adalah saat munculnya bunga pertama kali pada 31 HST (4 MST) diikuti pembentukan polong pertama pada 38 HST (5 MST). Perlakuan kontrol tidak menghasilkan polong, sedangkan pada perlakuan isolat bakteri ditemukan sejumlah polong.

Secara statistik non-parametrik *Kruskal-Wallis*, terdapat perbedaan yang nyata pada perlakuan isolat bakteri diazotrof terhadap pembentukan polong tanaman kedelai. Perlakuan isolat InaCC B₁₄₁₂ memiliki rerata jumlah polong terbanyak diantara perlakuan isolat lainnya (Tabel 3).

Menurut Herawati, *et al.*, (2019) hasil fotosintesis atau fotosintat tanaman kedelai terdistribusi dan terakumulasi pada berbagai organ tanaman yang berbeda pada fase vegetatif dan generatif. Daun memiliki fungsi sebagai sumber (*source*) utama fotosintat, sedangkan polong atau biji berperan sebagai penerima (*sink*) utama fotosintat. Karbon dan nitrogen merupakan asimilat yang ditransfer dari *source* ke *sink*. Hal ini menandakan bahwa tanaman kedelai InaCC B₁₄₁₂ secara efektif mengalokasikan fotosintat pada polong dibandingkan organ tanaman lainnya.

Apabila dihubungkan dengan kemampuan isolat bakteri dalam memproduksi ACC deaminase, InaCC B₁₄₁₂ yang menghasilkan tanaman kedelai dengan berat kering polong terbesar memiliki kemampuan ACC deaminase yang kecil (+) dibandingkan dengan isolat NFB₄ yang memiliki kemampuan menghasilkan ACC deaminase tinggi (+++) secara kualitatif. Ketidakmampuan atau rendahnya kemampuan bakteri dalam menghasilkan ACC deaminase mengakibatkan ACC yang merupakan prekursor etilen pada tanaman tidak didegradasi menjadi α -ketobutirat dan amonia, melainkan tetap diubah menjadi etilen. Glick (2013) menyebutkan bahwa hormon etilen dapat mempercepat distribusi fotosintat dari daun untuk pembentukan polong.

Perlakuan InaCC B₁₄₁₂ dapat menghasilkan banyak polong dan tetap memiliki kandungan klorofil tertinggi (22,08 μ g/cm²). Hal ini berhubungan dengan banyaknya bintil yang ditemukan pada tanaman kedelai InaCC B₁₄₁₂. Sesuai dengan pernyataan Kaschuk, *et al.*, (2010), bahwa kandungan klorofil pada tanaman yang berbintil tetap tinggi hingga masa pembentukan polong. Kesimpulan dari penelitian ini adalah ketiga isolat bakteri diazotrof (NFB₄, NFB₁₀, dan InaCC B₁₄₁₂) mampu meningkatkan pertumbuhan tanaman kedelai, namun dalam upaya peningkatan produktivitas tanaman kedelai, InaCC B₁₄₁₂ dianggap lebih efektif untuk dikembangkan dan diteliti lebih lanjut dibandingkan 2 isolat bakteri diazotrof yang telah diuji lainnya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Laboratorium Mikrobiologi Pertanian Pusat Penelitian Biologi Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Cibinong-Bogor dan Daftar Isian Pelaksanaan Anggaran (DIPA) tahun 2020 yang telah mendanai penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Agbodjato, N. A., P. A. Noumavo, F. B. Moussa, H. Salami, H. Sina, S. Alphonse, H. Bankole, A. Adjanohoun, & L. B. Moussa. (2015). Characterization of potential plant growth promoting rhizobacteria isolated from maize (*Zea mays* L.) in Central and Northern Benin (West Africa). *Appl. Environment. Soil Sci.*, 2015, 1-9. <https://doi.org/10.1155/2015/901656>
- Baldani, J. I., V. M. Reis, S. S. Videira, L. H. Boddey, & V. L. D. Baldani. (2014). The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. *Plant Soil*, 384 (1-2), 413-431. <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2186-6>
- Batista, B. D., P. T., Ferrari, A. Lacava, N. S. Silva-Teixeria, M. L. Bonatelli, S. Tsui, M. Mondin, E. W. Kitajima, J. O. Pereira, J. L. Azevedo, & M. C. Quecine. (2018). Screening of tropicaly derived, multi-trait plant growth-promoting rhizobacteria and evaluation of corn and soybean colonization ability. *Microbiol. Res.* 206: 33-42. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.09.007>
- BPS. (2018). Kementerian Pertanian Republik Indonesia. <https://www.pertanian.go.id/>. Diakses 25 Oktober 2019.
- Cerovic, Z. G., G. Masdoumier, N. B. Ghazlen, & G. Latouche. (2012). A new optical leaf-clip meter for simultaneous non-destructive assessment of leaf chlorophyll and epidermal flavonoids. *Physiol. Plant.*, 146 (3), 251-260. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2012.01639.x>
- Chawngthu, L., R. Hnamte, & R. Lalfakzuala. (2020). Isolation and characterization of rhizospheric phosphate solubilizing bacteria from wetland paddy field of Mizoram, India. *Geomicrobiol. J.*, 37(3), 1-10. <https://doi.org/10.1080/01490451.2019.1709108>
- Danapriatna, N. (2010). Biokimia penambatan nitrogen oleh bakteri non simbiotik. *CEFARS: J. Agribis. Pengemb. Wil.*, 1 (2), 1-10.

- de Souza, G. K., J. Sampaio, L. Longoni, S. Ferreira, S. Alvarenga, & A. Beneduzi. (2019). Soybean inoculants in Brazil: an overview of quality control. *Brazil. J. Microbiol.*, 50 (1), 205-211. <https://doi.org/10.1007/s42770-018-0028-z>
- Glick, B. R. (2013). Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiol. Res.*, 169 (1), 30-39. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.009>
- Govindarajan, M., S. Kwon, & H. Weon. (2007). Isolation, molecular characterization and growth-promoting activities of endophytic sugarcane diazotroph *Klebsiella* sp. GR9. *World J. Microbiol. Biotech.*, 23 (7), 997-1006. <https://doi.org/10.1007/s11274-006-9326-y>
- Harley, J. P., & L. M. Prescott. (2002). *Laboratory Exercises in Microbiology*. New York, USA: McGraw-Hill Publishers.
- Herawati, N., A. R. Aisah, & B. N. Hidayah. (2019). Photosynthate accumulation and distribution on soybean crop during vegetative and generative phases influenced by phosphor and organic fertilizers. *AIP Conference Proceedings*, 2199 (1). <https://doi.org/10.1063/1.5141289>
- Kachhap, S., A. Chaudhary, & S. D. Singh. (2015). Response of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in relation to elevated temperature conditions in groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *The Ecoscan*, 9 (3-4), 771-778.
- Kaschuk, G., & M. Hungria. (2017). Diversity and Importance of Diazotrophic Bacteria to Agricultural Sustainability in the Tropics. In *Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics*, edited by Joao L. de Azevedo and Maria C. Quecine (pp. 269-292). Switzerland: Springer.
- Kaschuk, G., M. Hungria, P. A. Leffelaar, K. E. Giller, & T. W. Kuyper. (2010). Differences in photosynthetic behaviour and leaf senescence of soybean (*Glycine max* [L.] Merrill) dependent on N₂ fixation or nitrate supply. *Plant Biol.*, 12 (1), 60-69. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2009.00211.x>
- Khaitov, B. (2018). Effects of Rhizobium inoculation and magnesium application on growth and nodulation of soybean (*Glycine max* L.). *J. Plant Nutr.*, 41 (16): 2057-2068. <https://doi.org/10.1080/01904167.2018.1485164>
- Kifle, M. H., & M. D. Laing. (2016). Isolation and screening of bacteria for diazotrophic potential and their influence on growth promotion of maize seedlings in greenhouses. *Front. Plant Sci.*, 6, 1225. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01225>
- Kotasthane, A. S., T. Agrawal, N. W. Zaidi, & U. Singh. (2017). Identification of siderophore producing and cyanogenic fluorescent *Pseudomonas* and a simple confrontation assay to identify potential bio-control agent for collar rot of chickpea. *3 Biotech*, 7 (2), 137. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0761-2>
- Kushwah, R., B. Agrawal, & A. S. Kotasthane. (2015). Biochemical and functional characterization of ACC deaminase producing fluorescent *Pseudomonas* inhabiting Chhattisgarh soils. *J. Bio Innov.*, 4 (6), 290-305.
- Masciarelli, O., A. Llanes, & V. Luna. (2014). A new PGPR co-inoculated with *Bradyrhizobium japonicum* enhances soybean nodulation. *Microbiol. Res.*, 169 (7-8), 609-615. <http://doi.org/10.1016/j.micres.2013.10.001>
- Meena, H., G. L. Sharma, S. L. Golada, & H. K. Jain. (2012). Yield and quality of sweet corn (*Zea mays* (L.) ssp. *Saccharata*) as affected by nitrogen levels, *Azotobacter* culture and nitrogen sources. *Res. Crops*, 13 (2), 486-492.
- Pahari, A., & B. B. Mishra. (2017). Characterization of siderophore producing rhizobacteria and its effect on growth performance of different vegetables. *Inter. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.*, 6 (5), 1398-1405. <http://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.605.152>
- Prayitno, J., & B. Rolfe. (2010). Characterization of endophytic diazotroph bacteria isolated from rice. *HAYATI J. Biosci.*, 17 (2), 73-78. <https://doi.org/10.4308/hjb.17.2.73>
- Priyanka, A. T., A. S. Kotasthane, A. Kosharia, R. Kushwah, N. W. Zaidi, & U. S. Singh. (2017). Crop specific plant growth promoting effects of ACCd enzyme and siderophore producing and cyanogenic fluorescent *Pseudomonas*. *3 Biotech*, 7, 27. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0602-3>
- Rascio, N., & N. La Rocca. (2013). Biological Nitrogen Fixation. In *Encyclopedia of Ecology*, (pp. 264-279). Padua, Italy: Elsevier.
- Riggs, P. J., M. K. Chelius, A. Iniguez, S. M. Kaeppler, & E. Triplett. (2001). Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria. *Funct. Plant Biol.*, 28 (9), 829-836. <https://doi.org/10.1071/PP01045>
- Rohmah, E. A., & T. B. Saputro. (2016). Analisis pertumbuhan tanaman kedelai (*Glycine max* L.) varietas Grobogan pada kondisi cekaman genangan. *Jurnal Sains dan Seni ITS*, 5 (2), 2337-3520.

- Salvagiotti, F., K. G. Cassman, J. E. Specht, D. T. Walters, A. Weiss, & A. Dobermann. (2008). Nitrogen uptake, fixation, and response to fertilizer N in soybeans: a review. *Field Crop Res.*, 108 (1), 1-13. <http://doi.org/10.1016/j.fcr.2008.03.001>
- Sharma, S. B., R. Z. Sayyed, M. H. Trivedi, & T. A. Gobi. (2013). Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *Springer Plus*, 2, 587. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-587>
- Shin, W., R. Islam, A. Benson, M. M. Joe, K. Kim, S. Gopal, S. Samaddar, S. Banerjee, & T. Sa. (2016). Role of diazotrophic bacteria in biological nitrogen fixation and plant growth improvement. *Korean J. Soil Sci. Fert.*, 49 (1), 17-29. <http://doi.org/10.7745/KJSSF.2016.49.1.017>