

Eksplorasi Bakteri Diazotrof dari Rizosfer Tanaman Bawah Merah (*Allium ascalonicum* L.) di Brebes, Jawa Tengah

Dwi Ayu Lutfiani Amalia¹, Oedjijono¹, Purwanto²

¹Fakultas Biologi, Universitas Jenderal Soedirman

²Jurusan Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Jenderal Soedirman
Jalan dr. Suparno 63 Purwokerto 53122
email: oedjijono@unsoed.ac.id

Rekam Jejak Artikel:

Diterima : 08/11/2020
Disetujui : 22/12/2020

Abstract

This study aims to explore the diazotroph bacteria that are able to produce nitrogen and produce the IAA hormone by selecting it from the rhizosphere of the shallots plant in Brebes, Central Java. The research design used was a survey method. This research consisted of taking samples of shallot rooting soil in Brebes, Central Java, isolation of soil bacteria in Yeast Mannitol Agar, Ashby, and Caceres medium, IAA production test of nitrogen-fixing quantitative test using Kjeldahl analysis, and bacterial characterization. A total of nine diazotroph bacterial isolates capable of producing IAA were successfully isolated. The nine isolates were able to produce IAA with concentrations between 305-3.51 ppm, with LAR3 isolates as the highest IAA producer. The results of total nitrogen levels by the Kjeldahl method of the 6 best isolates producing IAA, were able to produce concentrations ranging from 3.15 to 88.55 ppm. LAR5 isolates was the highest nitrogen producer. Identification results showed that the nine bacterial isolates obtained were included in 3 different bacterial groups, four isolates including species belonging to the genus *Rhizobium* (isolates LAR3, LAR5, LBR1, and LCR3), three isolates including species belonging to the genus *Azospirillum* (isolates LAA4, LAA5, and LCA1), and two isolates including species belonging to the genus *Azotobacter* (isolates LBZ2 and LBZ2).

Key Words : *Diazotrof bacteria, IAA, Nitrogen fixation, Shallots.*

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mengeksplorasi bakteri diazotrof yang mampu menambat nitrogen dan menghasilkan hormon IAA dengan cara menyeleksi dari rizosfer tanaman bawang merah di Brebes, Jawa Tengah. Penelitian ini terdiri dari pengambilan sampel tanah perakaran bawang merah di Brebes, Jawa Tengah, isolasi bakteri tanah pada medium Yeast Mannitol Agar+*Congo red*, Ashby, dan Caceres, uji produksi IAA metode Salkowski, uji kemampuan penambatan nitrogen metode Kjeldahl, dan identifikasi bakteri. Sebanyak sembilan isolat bakteri diazotrof yang mampu menghasilkan IAA telah berhasil diisolasi. Kesembilan isolat tersebut mampu menghasilkan IAA dengan konsentrasi antara 3,05-3,51 ppm, dengan isolat LAR3 sebagai penghasil IAA tertinggi. Hasil perhitungan kemampuan menambat nitrogen bebas dengan metode Kjeldahl menunjukkan bahwa 6 isolat penghasil IAA terbaik mampu menghasilkan nitrogen total dengan konsentrasi berkisar antara 3,15-88,55 ppm. Isolat LAR5 merupakan penghasil nitrogen tertinggi. Hasil identifikasi menunjukkan kesembilan isolat bakteri yang didapatkan termasuk dalam 3 kelompok bakteri yang berbeda, yaitu empat isolat termasuk spesies anggota genus *Rhizobium* (isolat LAR3, LAR5, LBR1, dan LCR3), tiga isolat adalah spesies anggota genus *Azospirillum* (isolat LAA4, LAA5, dan LCA1), dan dua isolat termasuk spesies anggota genus *Azotobacter* (isolat LBZ2 dan LBZ3).

Kata Kunci : *Bakteri Diazotrof, IAA, Fiksasi Nitrogen, Bawang Merah.*

PENDAHULUAN

Bawang merah merupakan komoditas sayuran penting di Indonesia, tanaman ini biasa tumbuh di tanah Entisol (Alluvial). Tanah jenis Entisol atau Alluvial merupakan tanah dengan protoplasma, molekul klorofil, asam nukleat, dan asam amino (Nasikah, 2007). Udara mengandung

kadar bahan organik dan N-total yang tergolong sangat rendah (Firmansyah *et al.*, 2015). Nitrogen merupakan salah satu unsur hara utama yang dibutuhkan oleh tanaman dalam jumlah besar dan bermanfaat bagi tanaman sebagai penyusun sekitar 78% N, tetapi tanaman tidak dapat menggunakan secara langsung, sehingga pupuk N

selalu ditambahkan sebagai input produksi tanaman (Hindersah & Simarmata, 2004). Petani menggunakan sumber nitrogen tambahan ke dalam tanah dalam bentuk pupuk anorganik, seperti urea, ZA, dan NPK. Hal ini mendorong pemakaian pupuk anorganik terus meningkat (Nasikah, 2007).

Penggunaan pupuk bersubsidi untuk mencukupi kebutuhan nitrogen setiap tahunnya mengalami peningkatan, yaitu setiap tahun naik sebesar 6,11%. Kebutuhan pupuk urea bersubsidi tahun 2010 sebesar Rp. 6.791.811 triliun, meningkat menjadi Rp. 9.178.602 triliun pada tahun 2015 (APPI, 2015). Peningkatan tersebut berdampak meningkatnya anggaran subsidi pupuk setiap tahunnya, namun hasil panen yang didapat tidak sebanding dengan pemupukan yang telah diberikan. Menurut Saragih *et al.* (2013), pemberian pupuk urea dosis 285 kg urea/ha mampu meningkatkan bobot kering berangkasan, namun nitrogen yang diserap hanya 7,74 kg urea/ha. Menurut Danapriatna (2010), sebagian nitrogen dari pupuk urea yang diaplikasikan hilang melalui beberapa mekanisme termasuk volatilisasi amonia, denitrifikasi, dan pencucian, dan mengakibatkan munculnya masalah polusi terhadap lingkungan. Upaya dalam pengurangan penggunaan pupuk anorganik terus ditingkatkan, salah satunya adalah pemanfaatan bakteri diazotrof dalam penggunaan pupuk hayati (Panjaitan *et al.*, 2015).

Bakteri diazotrof merupakan bakteri yang mampu menambat N udara (Widyawati *et al.*, 2014). Bakteri tersebut juga mampu memberikan efek menguntungkan bagi pertumbuhan tanaman atau disebut sebagai *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR) melalui kemampuan penghasil hormon tanaman (*indoleacetic acid*, asam giberelat, sitokinin), pelarutan fosfat anorganik, pengurangan etilen, pengendalian patogen, produksi siderofor, dan produksi β -1,3, glukukanase (Tilak *et al.*, 2010). Beberapa contoh

bakteri diazotrof adalah *Azotobacter*, *Azospirillum*, dan *Rhizobium*. Inokulasi *Rhizobium* pada tanaman padi dapat meningkatkan panjang akar total dan produksi biomassa (Islam *et al.*, 2019; Purwanto *et al.*, 2017).

Tujuan dari penelitian ini adalah (1) mengisolasi bakteri diazotrof dari rizosfer bawang merah (*Allium ascalonicum* L.); (2) mengetahui kemampuan isolat bakteri diazotrof dari rizosfer bawang merah dalam menghasilkan hormon IAA dan menambat nitrogen secara kuantitatif; dan (3) mengetahui identitas bakteri diazotrof dari rizosfer bawang merah yang mampu menghasilkan IAA.

MATERI DAN METODE

Pengambilan Sampel Rizosfer

Sampel tanah rizosfer berasal dari lahan pertanian bawang merah di Brebes. Sampel tanah diambil dari 3 lokasi berbeda yaitu desa Larangan, Dukuhturi, dan Karangbale Kecamatan Larangan, Kabupaten Brebes, Jawa Tengah. Tanah diambil dengan mencabut tanaman bawang merah, kemudian sampel tanah yang akan digunakan adalah tanah pada sisa akar dan dimasukkan ke dalam plastik. Nilai pH dan kelembaban tanah diukur menggunakan *soil tester*, pengukuran suhu tanah menggunakan termometer, pengukuran dilakukan secara *in situ*.

Isolasi Bakteri (modifikasi dari Oedjijono *et al.*, 2014)

Sebanyak 10 g sampel tanah dicampurkan dengan 90 mL akuades steril, kemudian dilakukan pengenceran bertingkat dengan cara mengambil sebanyak 1 mL dicampurkan dengan akuades steril 9 mL dan didapatkan pengenceran 10^{-2} , selanjutnya dilakukan pengenceran bertingkat sampai dengan 10^{-6} . Sebanyak 0,1 mL dari dua pengenceran terakhir diinokulasikan pada medium Caceres, medium YMA+ *congo red*, dan medium Asbhy secara *spread plate* dan masing-masing media

diinkubasi selama 2-4 x 24 jam suhu ruang. Isolat yang tumbuh dan berbeda dilakukan pemurnian, kemudian disimpan dalam medium agar miring.

Pembuatan Kurva Standar IAA

Larutan standar IAA konsentrasi 0, 2, 4, 6, 8, dan 10 mg/L dibuat dengan cara dilarutkan dengan metanol. Sebanyak 0,5 mL larutan IAA dari masing-masing konsentrasi tersebut dicampurkan reagen Salkowski 1,5 mL (150 mL H₂SO₄, 250 mL akuades dan 7,5 mL FeCl₃ 6 H₂O) dan diinkubasi di ruang gelap selama 30 menit. Larutan selanjutnya diukur absorbansinya pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 530 nm. Nilai absorbansi dari setiap konsentrasi dibuat kurva regresi untuk mendapatkan kurva standar dan persamaan IAA.

Uji Kemampuan Isolat Bakteri Diazotrof dalam Menghasilkan IAA (modifikasi dari Reetha *et al.*, 2014)

Uji Produksi IAA dilakukan dengan menumbuhkan isolat bakteri pada 10 mL medium NB+ *L-Triptofan* 2%, diinkubasi 1 x 24 jam. Larutan kemudian disentrifugasi pada sentrifuse dengan kecepatan 4.500 rpm (RCF_{xg} 2422) selama 10 menit. Sebanyak 0,5 mL supernatan diambil dan ditambahkan ke dalamnya 1,5 mL reagen Salkowski, kemudian diinkubasi pada ruang gelap selama 30 menit. Larutan selanjutnya diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 530 nm. Nilai absorbansi dari setiap sampel kemudian dimasukkan ke dalam persamaan IAA, sehingga diperoleh konsentrasi IAA isolat.

Uji Kemampuan Bakteri Diazotrof dalam Menambat N₂ (Oedijiono *et al.*, 2014)

Kadar N₂ yang mampu ditambat oleh bakteri diazotrof diukur dengan menggunakan metode Kjeldahl. Sebanyak 2 isolat dari masing-masing genus ditumbuhkan dalam medium selektif NfB semipadat untuk isolat LAA4 dan LAA5, medium

YMA untuk isolat LAR3 dan LARH5, dan medium Asbhy untuk isolat LAZ2 dan LAZ3. Masing-masing kultur diinkubasi selama 10-20 hari pada suhu ruang. Kultur bakteri yang tumbuh dimasukkan ke dalam labu Kjeldahl yang berisi campuran garam (perbandingan yang digunakan 40: 2,5: 1,5 dari K₂SO₄, CuSO₄ dan logam selenium), kemudian 3 mL asam sulfat pekat ditambahkan ke dalam labu Kjeldahl. Labu kemudian dipanaskan di lemari asam pada *Digester* pada suhu 420°C selama 20 menit. Setelah melalui proses tersebut, labu kemudian didinginkan dengan ditambahkan akuades mencapai volume akhir 50 mL. Sebanyak 20 mL sampel digesti dituangkan ke dalam tabung destilasi kemudian dimasukkan pada alat destilasi. Labu Erlenmeyer 250 mL yang berisi 20 mL asam borat 4% dan 6 tetes *Conway reagen* (1000mg *methyl red*, 150 mg *bromcresol green*, 200ml etanol 96%) ditempatkan di bawah kondensor peralatan destilasi dan ujung outlet kondensor berada di bawah larutan. Destilasi dilakukan dengan menggunakan unit destilasi Semiotomatis, kemudian sebanyak 30 mL NaOH 40% dan 100 mL akuades secara otomatis dituangkan melalui peralatan pada destilator. Larutan yang mengandung NH₃, asam borat dan indikator campuran pada Erlenmeyer 250mL dititrasi dengan 0,05 N HCl menggunakan Autotitrator. Jumlah konsentrasi N₂ pada sampel dapat dihitung melalui persamaan:

$$N \text{ total (ppm)} = \frac{a - b \times N \times 14 \times 1000000}{c \text{ (g)} \times 1000}$$

Keterangan:

a : Sampel Titer

b : Titer Blanko

c : Berat Sampel

N : Normalitas HCl

Pengamatan Makromorfologi Koloni Bakteri

Karakter makromorfologi yang diamati antara lain bentuk koloni, ukuran koloni, tepi

koloni, warna koloni, elevasi dan permukaan koloni pada medium selektif.

Pengamatan Mikromorfologi Bakteri (modifikasi Ramadhaniah, 2013)

Pengamatan mikromorfologi dilakukan dengan pewarnaan Gram. Sebanyak satu ose kultur diulas di *object glass*. Inokulum difiksasi dengan melewati sampel yang berada di *object glass* di atas api. Pewarna karbol *Crystal violet* ditetaskan di atas *glass* dan didiamkan selama ± 1 menit kemudian dicuci dengan akuades mengalir dan dikeringkan. *Lugol's iodine* kemudian ditetaskan di atas *object glass* dan didiamkan selama 40-60 detik, cuci dengan akuades dan keringkan. Larutan alkohol 96% ditetaskan pada *object glass* selama 1 menit, kemudian dicuci dengan akuades mengalir dan dikeringanginkan. Larutan safranin ditetaskan di atas *object glass* dan didiamkan selama ± 45 detik kemudian dicuci dengan akuades mengalir dan dikeringanginkan. Hasil pewarnaan Gram diamati pada mikroskop. Sel bakteri Gram positif akan terwarnai menjadi ungu, sedangkan Gram negatif terwarnai menjadi merah. Pengamatan karakter Gram dan bentuk sel bakteri diamati menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 10x100.

Uji Motilitas (modifikasi Sirois 2014, 2008)

Disiapkan tusuk steril dan medium SIM A, kemudian ambil sebanyak satu ose koloni tunggal dengan tusuk steril secara aseptis dan diinokulasikan ke dalam medium SIM A secara tegak lurus, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang.

Uji Pengaruh Suhu (modifikasi Adiguzel *et al.*, 2011)

Pengujian pengaruh suhu dilakukan dengan cara koloni pada media miring diambil sebanyak 1 ose, kemudian diinokulasikan pada medium NB. Kultur bakteri diinkubasi pada suhu ruang, 37°C, dan 50°C. Inkubasi dilakukan selama 1 x 24 jam. Hasil diinterpretasikan positif apabila medium

menjadi keruh dan negatif apabila tidak ada perubahan pada medium (tetap bening).

Uji Pengaruh pH (modifikasi Adiguzel *et al.*, 2011)

Pengujian pH dilakukan dengan cara mengambil sebanyak 1 ose isolat pada medium NA miring, kemudian dinokulasikan ke dalam medium NB dengan pH 4, 7 dan 9. Kultur bakteri kemudian diinkubasi selama 1 x 24 jam. Hasil diinterpretasikan positif apabila medium menjadi keruh dan negatif apabila tidak ada perubahan pada medium (tetap bening).

Uji Salinitas (modifikasi Adiguzel *et al.*, 2011)

Pengujian salinitas dilakukan dengan cara mengambil sebanyak 1 ose isolat pada medium NA miring, kemudian dinokulasikan ke dalam medium NB dengan penambahan NaCl 3%, 5% dan 7%. Kultur bakteri diinkubasi selama 1 x 24 jam. Hasil diinterpretasikan positif apabila medium menjadi keruh dan negatif apabila tidak ada perubahan pada medium (tetap bening).

Uji Oksidase (modifikasi Ramadhaniah, 2013)

Koloni pada medium miring diulaskan pada kertas saring diatas *object glass*. Isolat bakteri ditetesi reagen *tetramethyl-p-phenylenediamine-dihydricloride*. Hasil diinterpretasikan positif apabila di bawah koloni berwarna biru kehitaman dan interpretasi negatif apabila tidak berubah warna.

Uji Katalase (Brown, 2007)

Koloni pada media miring diulaskan pada *object glass*, kemudian isolat bakteri ditetesi reagen H₂O₂. Interpretasi positif apabila terbentuk gelembung gas dan interpretasi negatif apabila tidak terbentuk gelembung gas.

Uji Produksi Asam Dari Karbohidrat (Lay, 1994)

Koloni pada media miring diambil sebanyak 1 ose. Selanjutnya, isolat bakteri diinokulasikan pada medium basal dengan ditambahkan gula dengan konsentrasi 5% yang diberi reagen *phenol*

red dengan sumber gula dari glukosa, laktosa, dan sukrosa. Kultur bakteri masing-masing diinkubasi selama 1 x 24 jam pada suhu ruang. Hasil diinterpretasikan positif apabila medium menjadi kuning dan negatif apabila tidak ada perubahan pada medium.

Uji Oksidatif Fermentatif (OF) (Lay 1994)

Isolat diambil dengan tusuk steril dari medium agar miring, kemudian isolat diinokulasikan secara aseptis pada medium OF dengan *stab inoculation*. Sebagian dari medium OF yang sudah inokulasikan isolat bakteri ditetesi dengan paraffin. Semua kultur bakteri diinkubasi selama 2 x 24 jam pada suhu ruang. Setelah diinkubasi isolat diamati apabila bakteri fermentatif maka medium yang sudah diberi parafin akan berubah menjadi warna kuning. Apabila bakteri termasuk dalam sifat oksidatif, maka medium yang tidak ditutup parafin akan menjadi warna kuning. Apabila bakteri bersifat oksidatif fermentatif baik di medium yang ditutup oleh parafin dan yang tidak akan berubah menjadi warna kuning.

Uji Penggunaan Karbohidrat Sebagai Satu-satunya Sumber Karbon untuk Pertumbuhan Bakteri Diazotrof (Lay, 1994)

Koloni pada media miring diambil sebanyak 1 ose, kemudian isolat bakteri diinokulasikan pada medium basal dengan ditambahkan gula dengan konsentrasi 5% dengan sumber gula dari glukosa, laktosa, maltosa dan sukrosa. Kultur bakteri diinkubasi selama 1 x 24 jam pada suhu ruang. Hasil positif apabila media menjadi keruh dan negatif apabila tidak ada perubahan pada media.

Analisis Data

Data dianalisis secara deskriptif. Uji kemampuan bakteri diazotrof dalam menghasilkan

IAA dengan metode Salkowski dan uji kemampuan bakteri diazotrof dalam menambat N₂ menggunakan metode Kjeldahl disajikan dalam bentuk tabel. Penentuan identitas bakteri dilakukan dengan mengidentifikasi hasil pengamatan morfologi, fisiologi, dan biokimiawi berdasarkan *Bergeys Manual of Determinative Bacteriology Second Edition*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi Bakteri Diazotrof

Hasil pengukuran nilai pH tanah pada rizosfer tanaman bawang merah (*Allium ascalonicum* L) di kecamatan Larangan, Kabupaten Brebes pada 3 lokasi pengambilan sampel, berkisar antar 6-6,1 (Tabel 1.). Menurut Firmansyah *et al.* (2015), tanah pertanian bawang merah di Brebes memiliki pH mulai dari asam sampai dengan alkalis (pH 5,6-8,5). Suhu tanah pada ketiga lokasi sampel 32,5-34,2°C, dengan kelembaban tanah pada ketiga lokasi sampel dalam rentang 54%-64% (Tabel 1.). Jenis tanah lahan pertanian bawang merah Brebes merupakan tanah jenis Alluvial (Entisol) dan berstektur liat (Sumarni *et al.*, 2012). Reaksi tanah (pH), kelembaban, suhu, aerasi, drainase yang baik, kandungan bahan organik, serta kondisi perakaran tumbuhan menentukan sebaran bakteri penambat N₂ (Agustian *et al.*, 2012). Bakteri penambat nitrogen dapat tumbuh dalam rentang pH 4,5-8,5, dan kelembaban tanah antara 50%-65% (Holt *et al.*, 1994). Menurut Simanungkalit *et al.* (2006), suhu tanah yang baik untuk pertumbuhan bakteri diazotrof dalam rentang 25-35°C. Kondisi lingkungan tempat pengambilan sampel tanah cenderung baik untuk pertumbuhan bakteri diazotrof.

Tabel 1. Hasil Pengukuran Suhu, pH dan Kelembaban Tanah Rizosfer Bawang Merah

Lokasi	Suhu (°C)	pH	Kelembaban(%)
Dukuhturi	32,8	6,0	64
Larangan	32,5	6,0	63
Karanggale	34,2	6,1	54

Isolasi bakteri diazotrof dilakukan dengan menumbuhkan sampel tanah rizosfer tanaman bawang merah (*Allium ascalonicum* L.) pada medium bebas nitrogen, yaitu YMA+congo red untuk menumbuhkan bakteri Rhizobium (Rao, 1994), medium Caceres untuk menumbuhkan bakteri Azospirillum (Caceres, 1982), dan medium Asbhy untuk menumbuhkan bakteri Azotobacter (Rao, 1994). Ketiga genera tersebut merupakan kelompok jenis bakteri diazotrof. Hasil isolasi dari ketiga lokasi sampling didapatkan sebanyak 28 isolat (Tabel 2.), yang diberi kode sesuai lokasi sampling dan media perumbuhan. Sebanyak 14 isolat yang diperoleh dari medium YMA diberi kode isolat LAR1, LAR2, LAR3, LAR4, LAR5, LAR6 LBR1, LBR2, LBR3, LBR4, LCR1, LCR2, LCR3, dan LCR4. Isolat yang tumbuh pada medium YMA+ congo red memiliki karakteristik warna koloni putih susu atau merah muda, tidak

transparan, bentuk koloni sirkuler, konveks, semi translusen, koloni bakteri lembek atau berlendir pada agar diduga merupakan bakteri dari genus Rhizobium (Surtiningsih *et al.*, 2009). Hasil isolasi dari medium Caceres didapatkan sebanyak 9 isolat dengan kode isolat LAA1, LAA2, LAA3, LAA4, LAA5, LBA1, LBA2, LBA3, dan LCA1. Isolat yang didapatkan pada medium Caceres dengan karakteristik koloni berwarna merah, berbentuk bulat, tepi halus, dan elevasi rata mencirikan spesies anggota genus Azospirillum (Caceres, 1982). Sebanyak 5 isolat didapatkan pada medium Asbhy dan kode isolat LAZ1, LAZ2, LAZ3, LBZ1, dan LCZ1. Isolat yang diperoleh pada medium Asbhy memiliki karakter koloni berwarna bening atau putih, dengan bentuk circular, irregular; elevasi convex, effuse; bentuk tepi undulate, crenate mencirikan spesies anggota genus Azotobacter (Yulitaasary *et al.*, 2017) (Tabel 2.).

Tabel 2. Lokasi Sampel dan Bakteri Dizotrof Hasil Isolasi

Lokasi Pengambilan Sampel	Medium	Kode Isolat	Genus
Dukuhturi	Yeast Manitol Agar	LAR1	Rhizobium
Larangan		LAR2	
		LAR3	
		LAR4	
		LAR5	
		LAR6	
		LBR1	
Karanggale		LBR2	
		LBR3	
		LBR4	
		LCR1	
		LCR2	
		LCR3	
		LCR4	
	Dukuhturi	Caceres	LAA1
LAA2			
LAA3			
LAA4			
LAA5			

Larangan		LBA1	
		LBA2	
		LBA3	
Karanggale		LCA1	
Dukuhturi	Asbhy	LAZ1	
		LAZ2	Azotobacter
		LAZ3	
Larangan		LBZ1	
Karanggale		LCZ1	

Tabel 3. Kemampuan IAA Isolat Bakteri Diazotrof dalam Menghasilkan IAA

No.	Kode Isolat	Konsentrasi IAA (ppm)
1.	LCR3	3,22
2.	LAR5	3,34
3.	LBR1	3,21
4.	LAZ2	3,05
5.	LAZ3	3,05
6.	LCA1	3,16
7.	LAR3	3,51
8.	LAA5	3,21
9.	LAA4	3,35

Pengujian Kemampuan Bakteri Diazotrof dalam menghasilkan IAA

Sebanyak 28 isolat bakteri diazotrof hasil isolasi diuji kemampuannya dalam menghasilkan IAA. Hasil pengukuran produksi IAA menunjukkan sebanyak 9 isolat mampu menghasilkan hormon IAA berkisar antara 3,05-3,51 ppm (Tabel 3.).

Hasil penelitian menunjukkan konsentrasi IAA tertinggi dihasilkan oleh isolat LAR3 sebesar 3,51 ppm. Isolat LAR3 dapat menghasilkan IAA dengan konsentrasi yang lebih tinggi dibandingkan dengan isolat bakteri diazotrof yang diisolasi dari rizosfer tanaman kelapa sawit yaitu 0,097 ppm (Walida *et al.*, 2019). Isolat bakteri *Rhizobium* yang diisolasi dari tanah perkebunan karet, mampu menghasilkan IAA dengan konsentrasi sebesar 2,86 ppm, isolat *Azospirillum* sebesar 0,0429 ppm, dan isolat *Azotobacter* sebesar 0,0517 ppm (Widawati, 2015). Konsentrasi IAA yang dihasilkan oleh kesembilan isolat bakteri diazotrof dari rizosfer tanaman bawang merah lebih tinggi dibandingkan dengan yang dilaporkan oleh Widawati (2015).

Kemampuan Bakteri Diazotrof dalam Menambat N₂

Pengukuran kemampuan fiksasi N₂ isolat bakteri diazotrof didasarkan pada N- total menurut

metode Kjeldahl. Dua isolat terbaik dari masing-masing anggota genus bakteri diazotrof dipilih untuk pengujian kemampuan penambatan N₂. Menurut Wiyantoko *et al.* (2017), penentuan kemampuan penambatan N₂ menggunakan metode Kjeldahl dihitung berdasarkan N total yang terdiri atas nitrat (NO³⁻) amonium (NH⁴⁺) dan NH₃. Prinsip metode ini adalah sampel padat dihidrolisis dengan asam sulfat membentuk senyawa amonium sulfat. Senyawa nitrat dengan asam salisilat membentuk nitrosalisilat, kemudian akan direduksi dengan natrium tiosulfat dan akan terbentuk senyawa amonium. Produk hasil destruksi berupa senyawa amonium yang kemudian didestilasi dalam suasana alkali dan ditampung dengan asam borat. Hasil destilasi yang dihasilkan berwarna hijau dan selanjutnya hasil destilasi dititrasi sampai berubah warna merah muda. Banyaknya N yang diperoleh berdasarkan nilai titrasi dengan HCl sebagai titer.

Hasil pengukuran N total bakteri isolat diazotrof dari rizosfer tanah bawang merah (LAA4, LAA5, LAZ2, LAZ3, LAR3, LAR5) berkisar antar 3,50-88,55 ppm. Kemampuan penambatan N₂ *Rhizobium* lebih tinggi daripada *Azotobacter* dan *Azospirillum* (Tabel 4.). Isolat LARH5

menghasilkan nitrogen lebih tinggi dibandingkan dengan hasil penelitian Ummah *et al.* (2019) terhadap bakteri yang diisolasi dari tanah pertanian tanaman bawang merah yaitu sebesar 4,55 ppm dengan waktu inkubasi selama 2 hari. Menurut Raffi & Charyulu (2012), berdasarkan hasil penelitiannya pada *Azospirillum* spp. yang diisolasi dari rizosfer dan non rizosfer tanah sereal, menghasilkan nitrogen dengan rentang 2,95 sampai 12,4 ppm dengan waktu inkubasi selama 45 hari.

Tabel 4. Kemampuan Bakteri Diazotrof dalam Menambat N₂

No.	Kode Isolat	Konsentrasi N total (ppm)
1.	LAA4	3,50
2.	LAA5	6,65
3.	LAZ2	14,00
4.	LAZ3	7,00
5.	LAR3	87,15
6.	LAR5	88,55

Kelompok bakteri diazotrof mampu menstimulasi pertumbuhan tanaman karena bakteri yang dikonsorsiumkan mempunyai hubungan sinergis yang baik dalam penambatan N dan pelarutan P, sehingga mampu meningkatkan ketersediaan hara atau memproduksi fitohormon pemacu tumbuh tanaman yang meningkatkan pertumbuhan serta produktivitas tanaman (Halmedan *et al.*, 2017). Fiksasi nitrogen oleh bakteri yang mampu menambat N₂, yaitu bakteri yang hidup bebas atau bersimbiosis pada tanaman legum. Fiksasi Nitrogen melibatkan ATP dan proses reduksi ekivalen yang berasal dari metabolisme primer. Semua reaksi yang terjadi dikatalisis oleh nitrogenase. Nitrogenase merupakan enzim kompleks yang terlibat dalam proses fiksasi nitrogen. Nitrogenase berperan dalam pengubahan bentuk nitrogen bebas di udara menjadi amonia (NH₃) (Susilowati & Setyowati, 2016). Purwanto *et al.* (2017) menyebutkan bahwa inokulasi bakteri diazotrof pada tanaman padi dapat meningkatkan panjang akar total dan produksi biomassa. Bakteri diazotrof yang berasal dari rizosfer tanaman padi yang dilaporkan memiliki aktivitas nitrogenase dalam rentang 0,04-0,07 µM.

Menurut Allito *et al.* (2020) isolat bakteri *Rhizobium* yang diisolasi dari tanaman legum mampu menambat N₂ sebesar 85,5-87,5 ppm. Menurut penelitian yang dilakukan Ricard *et al.* (2018), isolat bakteri kelompok genus *Azotobacter* yang berasal dari rizosfer tanaman jagung mampu menambat N₂ sebesar 3 ppm. Kemampuan keenam isolat dalam memfiksasi N₂ lebih tinggi dari yang dilaporkan Raffi & Charyulu (2012), Ricard *et al.* (2018); Allito *et al.* (2020).

Identifikasi Bakteri Diazotrof

Hasil pengamatan isolat bakteri diazotrof asal rizosfer tanah bawang merah (LAA4, LAA5, LCA1) yang ditumbuhkan pada medium Caceres yaitu sebagian besar koloni berwarna merah. Medium Caceres merupakan medium selektif bagi *Azospirillum* yang ditandai dengan koloni berwarna merah. Koloni bakteri yang tumbuh pada medium Caceres juga memiliki bentuk bulat (*circular*) dan tidak teratur (*irregular*), elevasi rata (*flat*) dan timbul (*raised*), serta memiliki tepi (*margin*) *entire* (Tabel 5.). Koloni bakteri *Azospirillum* berbentuk bulat, tepi halus, dan memiliki elevasi rata (Caceres, 1982). Beberapa strain memiliki elevasi datar dan timbul (Pangestika *et al.*, 2017).

Hasil pengamatan mikromorfologi berbentuk batang, sifat Gram negatif, motil dan *nonmotil* (Tabel 5.). Menurut Hot *et al.* (1994); Cowan *et al.* (1993), bakteri dari anggota genus *Azospirillum* sel berbentuk vibroid atau batang, sel bersifat Gram negatif. Spesies anggota *Azospirillum* memiliki *flagella* sehingga motil, namun dalam kondisi yang tidak memungkinkan dapat bersifat *non motil*. Oedjijono *et al.* (2014),

juga menyebutkan bahwa *Azospirillum* merupakan bakteri yang hidup bebas di perakaran dan mampu memfiksasi nitrogen. Sel-selnya berbentuk batang dan vibroid, Gram negatif, motil, membentuk pelikel pada semisolid NfB.

Uji fisiologi yang dilakukan pada bakteri diazotrof yang diperoleh dari medium Caceres meliputi uji pengaruh suhu, uji pengaruh pH, dan uji ketahanan terhadap salinitas. Hasil pengamatan pada pengaruh suhu terhadap pertumbuhan bakteri menunjukkan bahwa bakteri mampu tumbuh pada suhu ruang dan 37°C, sedangkan pada suhu 50°C tidak mampu tumbuh. Ketiga isolat tersebut hanya mampu tumbuh pada pH 4 dan 7. Pengujian perlakuan pada medium yang diberi salinitas berbeda, menunjukkan bahwa semua isoat bakteri mampu tumbuh pada konsentrasi NaCl 3%, namun isolat LAA4 dan LAA5 mampu tumbuh pada medium dengan konsentrasi NaCl 5%(Tabel 5.). Menurut Rasool *et al.* (2015), *Azospirillum* memiliki pertumbuhan optimum pada suhu 30°C dengan kisaran pH 6-7. Santoso *et al.* (2019), menyebutkan bahwa suhu pertumbuhan *Azospirillum* yaitu 27-29°C, dengan pH 6,9-7, dan konsentrasi NaCl sebesar 3%.

Pengujian biokimia terhadap isolat yang didapatkan dari medium Caceres meliputi uji oksidase, uji katalase, uji produksi asam dari karbohidrat, uji oksidatif-fermentatif. Hasil pengamatan menunjukkan ketiga isolat positif oksidase. Isolat LAA4 dan LCA1 bersifat fermentatif, dan hanya isolat LAA5 yang bersifat oksidatif-fermentatif. Ketiga isolat mampu mengubah asam pada medium yang mengandung glukosa. Isolat LAA4 dan LCA1 mampu menghasilkan asam pada medium yang mengandung sukrosa, dan hanya isolat LAA4 yang mampu menghasilkan asam dari medium dengan penambahan laktosa. Pengamatan uji katalase menunjukkan ketiga isolat negatif untuk uji katalase (Tabel 5.). Kelompok bakteri *Azospirillum*

memiliki kemampuan menghasilkan enzim katalase ditandai dengan positif pada uji katalase, namun beberapa isolat negatif pada uji katalase, sedangkan beberapa isolat mampu menghasilkan enzim oksidase dan beberapa negatif pada saat uji oksidase (Pangestika, *et al.*, 2017. Menurut Hot *et al.* (1994) *Azospirillum* mampu mengubah asam pada medium yang mengandung maltosa, laktosa, D-mannosa, Sitrat, laktat, D-sorbitol, D-ribose.

Berdasarkan pengamatan uji gula sebagai sumber karbon satu-satunya menunjukkan ketiga isolat (LAA4, LAA5, dan LCA1) mampu tumbuh pada medium yang mengandung glukosa sebagai sumber karbon. Isolat LAA4 dan LCA1 mampu tumbuh pada medium basal dengan sumber karbon sukrosa dan maltosa. Isolat LAA5 dan LCA1 dapat tumbuh pada medium basal dengan sumber karbon dari laktosa (Tabel 5.). *Azospirillum agricola* sp. nov. dapat menggunakan sumber karbon yang berasal dari gula seperti arabinosa, fruktosa, galaktosa, asam piruvat, asam suksinat, asam asetat, asam sitrat, dan glukosa 6-fosfat (Lin *et al.*, 2016). Beberapa isolat mampu menggunakan glukosa, laktosa, dan sukrosa sebagai sumber karbon, sebagian ada yang hanya dapat menggunakan glukosa sebagai sumber karbon. Menurut Trivendi *et al.* (2010), penggunaan jenis gula sebagai sumber karbon dipengaruhi oleh aktivitas enzimatik di dalam sel. Mikroorganisme tidak semua dapat menggunakan semua jenis gula sebagai sumber karbon, karena keterbatasan aktivitas enzim. Keterbatasan dalam menggunakan jenis gula tertentu sebagai sumber karbon dapat digunakan sebagai kunci melakukan identifikasi terhadap jenis tertentu

Hasil pengamatan bakteri diazotrof asal rizosfer tanah pertanian bawang merah (LAZ2 dan LAZ3) asal rizosfer tanah pertanian bawang merah yang didapatkan dari medium Asbhy menunjukkan koloni berwarna putih bening. Koloni bakteri *Azotobacter* sebagian koloni berwarna bening,

berbentuk bulat (*circuler*), memiliki elevasi *convex* dan datar (*flat*), tepi (*margin*) rata (*entire*) dan berukuran kecil serta *punctiform*. Kelompok bakteri *Azotobacter* memiliki koloni yang berwarna putih atau bening saat ditumbuhkan di media Asbhy (Islam *et al.*, 2019). Hal yang sama dijelaskan bahwa koloni *Azotobacter* dapat berwarna putih, bening, keruh, dan coklat (Wedastri, *et al.* 2002). Menurut hasil penelitian Santoso *et al.* (2019), menunjukkan karakter morfologis koloni *Azotobacter* berbentuk bulat, tepian tidak rata, elevasi konveks.

Hasil pengamatan morfologi sel memiliki bentuk bulat (*coccus*) dan Gram negatif, dan bersifat motil (Tabel 5.). Menurut Holt *et al.* (1994) dan Cowan *et al.* (1993), anggota genus *Azotobacter* memiliki sel berbentuk ovoid, batang maupun kokus, bakteri bersifat Gram negatif. Kelompok bakteri *Azotobacter* bersifat motil karena memiliki flagella, namun pada beberapa jenis lain tidak memiliki flagella sehingga nonmotil. Hal yang sama juga dilaporkan oleh Rahmi (2014), *Azotobacter* merupakan bakteri yang bersifat motil yang bergerak menggunakan flagel, dengan kecepatan pergerakan yang berbeda-beda.

Hasil pengamatan pada uji fisiologi pada bakteri diazotrof yang diperoleh dari medium Asbhy (LAZ2 dan LAZ3). Kedua isolat bakteri dapat tumbuh pada suhu ruang dan suhu 37°C, positif pada pH medium 4 dan 7, dan mampu tumbuh pada medium dengan konsentrasi NaCl 3% (Tabel 5.). Hal ini sesuai dengan pernyataan Packialakshmi & Aliya (2014), bakteri genus *Azotobacter* mampu tumbuh pada suhu 28°C dan 30°C, dan dapat tumbuh dengan baik pada pH 7,5 dan 7,45. Menurut penelitian yang dilakukan Agustian *et al.* (2012), genus *Azotobacter* tumbuh optimum pada pH 7, namun pada pH 4 masih dapat tumbuh. Kelompok anggota *Azotobacter* mampu tumbuh pada NaCl 3%, sehingga bakteri ini

mampu hidup dikondisi salin. Holt *et al.* (1994) dalam *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* menyebutkan bahwa, anggota *Azotobacter* dapat tumbuh pada rentang pH 4,8-8,5, dan memiliki pH optimum untuk fiksasi nitrogen antara 7,0-7,5.

Hasil pengamatan biokimia pada isolat yang didapat dari medium Asbhy, Kedua positif pada uji katalase, isolat mampu memproduksi asam dari sumber glukosa, dan bersifat fermentatif. Uji nutrisi yang dilakukan menunjukkan bakteri mampu menggunakan glukosa sebagai sumber karbon satu-satunya (Tabel 5.). Menurut Agisti *et al.* (2014), karakter kunci dari genus *Azotobacter* adalah sel berbentuk coccoid, oksidase negatif, katalase positif dan membentuk kista yang merupakan mekanisme melindungi dari keadaan lingkungan yang ekstrim. Holt *et al.* (1994) dalam *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* menyebutkan, *Azotobacter* mampu menggunakan glukosa sebagai sumber karbon satu-satunya, serta mampu memfermentasikan glukosa, sukrosa dan laktosa.

Hasil pengamatan morfologi isolat bakteri diazotrof asal rizosfer tanah pertanian Bawang merah di Brebes (LAR3, LAR5, LBR1, dan LCR3) yang diperoleh dari medium YMA + *congo red* menunjukkan isolat bakteri memiliki koloni berwarna merah muda dan putih, memiliki bentuk *Circuler* dan *irregular*, berbentuk kecil dan ada yang besar, elevasi *raised*, *convex*, *flat* dan *umbonate*, serta memiliki tepi *entire* dan *raised* (Tabel 5.). Menurut Sari *et al.* (2018), isolat *Rhizobium* yang ditumbuhkan di medium YMA+ *congo red* memiliki warna pink, atau putih karena bakteri *Rhizobium* tidak dapat menyerap warna merah. Surtiningsih *et al.* (2009), menjelaskan karakteristik bakteri *Rhizobium* secara makroskopis adalah warna koloni putih susu, tidak transparan, bentuk koloni sirkuler, konveks, semitranslusen, diameter 2 - 4 mm dalam waktu

3 - 5 hari pada agar YMA+congo red. Hal ini sesuai dengan penjelasan Holt *et al.* (1994) dalam *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, kelompok *Rhizobium* koloni berbentuk *circular*, *convex*, putih, semi *translucent* atau *opaque*, *raised*.

Hasil pengamatan mikromorfologi bakteri diazotrof yang didapat pada medium YMA+congo red bersifat Gram negatif, berbentuk batang, dan motil (Tabel 5.). Karakter mikroskopis sel bakteri *Rhizobium* berbentuk batang, aerobik, Gram negatif dengan ukuran 0,5 - 0,9 x 1,2 - 3 μm , bersifat motil pada media cair, umumnya memiliki satu flagella polar atau subpolar (Surtiningsih *et al.*, 2009). Menurut Holt *et al.* (1994) dalam *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, anggota genus *Rhizobium* berbentuk batang, motil dengan flagella. Menurut Dutta & Podile (2010), sifat motil penting bagi bakteri PGPR dikarenakan motilitas bakteri berperan dalam kolonisasi akar.

Hasil pengamatan uji fisiologi pada isolat bakteri yang diperoleh dari medium YMA+congo red dapat tumbuh suhu ruang dan 37°C, medium dengan pH 4 dan 7, dan mampu tumbuh pada medium dengan NaCl 3% dan 5% (Tabel 5.). Menurut Holt *et al.* (1994), Kelompok bakteri *Rhizobium* memiliki suhu optimum dalam rentang 4°C-40°C, namun optimum pada kisaran 30°C. Genus *Rhizobium* mampu tumbuh pada rentang pH 4-10. Hal ini sesuai dengan pernyataan Nasikah (2007), bahwa suhu optimal untuk *Rhizobium* berkisar 18°C - 26°C, minimal 3°C dan maksimal 45°C. Sedangkan kisaran pH optimal untuk *Rhizobium* adalah sedikit di bawah netral hingga agak alkali, kendati demikian pada pH 5,0 beberapa strain *Rhizobium* masih dapat bertahan hidup.

Hasil pengamatan uji biokimia pada isolat yang didapat di medium YMA+congo red menunjukkan positif pada katalase, keempat isolat mampu memproduksi asam dari sumber karbon

glukosa. Isolat bakteri diazotrof LAR3, LAR5, LCR3 mampu mereduksi asam dari sumber gula jenis sukrosa. LAR3 dan LAR5 mampu memproduksi asam dari laktosa. Hasil uji fermentatif dan oksidatif, menunjukkan isolat LAR5, LBR1, dan LCR3 bersifat oksidatif-fermentatif. Isolat LAR3 bersifat fermentatif. Pengamatan uji oksidase menunjukkan keempat isolat negatif (Tabel 5.). Enzim katalase berfungsi untuk menguraikan hidrogen peroksida yang bersifat racun bagi sel dan menghasilkan gas oksigen dan air sesuai reaksi (Pelczar & Chan 2008).

Hasil uji nutrisi yang diamati yaitu uji karbohidrat sebagai sumber satu-satunya karbon. Isolat bakteri diazotrof LAR3 dan LCR3 mampu menjadikan glukosa, laktosa, sukrosa, dan maltosa sebagai sumber karbon satu-satunya. Isolat bakteri diazotrof LBR1 mampu menjadikan laktosa, sukrosa, dan maltosa sebagai sumber karbon satu-satunya, LAR3 hanya mampu menjadikan glukosa sebagai sumber karbon satu-satunya. (Tabel 5.). Menurut de Lajudie *et al.* (1994) dalam *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, *Rhizobium* menggunakan glukosa, laktosa, sukrosa, maltosa, malonat, arginin, glukonat sebagai sumber karbon. Sari & Retno (2015), menjelaskan *Rhizobium* bersifat kemoorganotropik, yaitu dapat menggunakan berbagai karbohidrat dan garam-garam asam organik sebagai sumber karbonnya.

Berdasarkan hasil pengamatan terhadap karakter morfologi, fisiologi, biokimia, dan nutrisi serta mengacu kepada *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* bahwa isolat LAA4, LA5, LCA1 termasuk spesies anggota genus *Azospirillum*, kemudian isolat LAZ2 dan LAZ3 termasuk spesies anggota genus *Azotobacter*, dan isolat LAR3, LAR5, LBR1, LCR3 merupakan spesies anggota genus *Rhizobium*.

Tabel 5. Hasil Karakterisasi Isolat Bakteri Diazotrof

Karakter	Isolat								
	LAA4	LAA5	LCA1	LAZ2	LAZ3	LAR5	LAR3	LBR1	LCR3
Morfologi Koloni									
Ukuran koloni	<i>Small</i>	<i>Moderate</i>	<i>Moderate</i>	<i>Small</i>	<i>Punctiform</i>	<i>Small</i>	<i>Small</i>	<i>Small</i>	<i>Large</i>
Bentuk koloni	<i>Circuler</i>	<i>Circuler</i>	<i>Irregular</i>	<i>Circuler</i>	<i>Circuler</i>	<i>Circuler</i>	<i>Circular</i>	<i>Irregularr</i>	<i>Irregular</i>
Elevasi koloni	<i>Flat</i>	<i>Raised</i>	<i>Flat</i>	<i>Convex</i>	<i>Flat</i>	<i>Raised</i>	<i>Convex</i>	<i>Flat</i>	<i>Umbonate</i>
Margin koloni	<i>Entire</i>	<i>Entire</i>	<i>Entire</i>	<i>Entire</i>	<i>Entire</i>	<i>Entire</i>	<i>Entire</i>	<i>Entire</i>	<i>Raised</i>
Warna koloni	Merah	Merah	Merah	Putih	Putih	Pink	Pink	Pink	Pink
Permukaan koloni	Mengkilap	Mengkilap	Mengkilap	Mengkilap	Mengkilap	Mengkilap	Mengkilap	Mengkilap	Mengkilap
Morfologi Sel									
Bentuk bakteri	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio</i>	<i>Coccus</i>	<i>Coccus</i>	<i>Basil</i>	<i>Basil</i>	<i>Basil</i>	<i>Basil</i>
Gram	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Motilitas	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Uji Fisiologi									
Suhu (°C)									
SR	+	+	+	+	+	+	+	+	+
37 oC	+	+	+	+	+	+	+	+	+
50 °C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pH									
4	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salinitas (%)									
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	-	-	-	+	+	-	+
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Uji Biokimia									
Oksidase	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Katalase	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Glukosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sukrosa	-	+	+	-	-	+	+	-	+
Laktosa	-	+	-	-	-	+	+	-	-
Oksidatif	-	+	-	-	-	-	+	+	+
Fermentatif	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Uji Nutrisional									
Glukosa	+	+	+	+	-	+	+	-	+
Laktosa	-	+	+	-	-	-	+	+	+
Sukrosa	+	-	+	-	-	-	+	+	+
Maltosa	+	-	+	-	-	-	+	+	+

SIMPULAN

Berdasarkan hasil dan pembahasan di atas, dapat disimpulkan bahwa sebanyak 28 isolat bakteri diazotrof dari rizosfer bawang merah (*Allium ascalonicum* L.) Brebes, Jawa Tengah berhasil diisolasi. Sembilan dari 28 isolat bakteri diazotrof (LAA4, LAA5, LCA1, LAR3, LAR5, LBR1, LCR3, LAZ2, dan LAZ3) mampu menghasilkan hormon IAA berkisar antara

3,05-3,51 ppm, dengan isolat LAR3 sebagai penghasil IAA tertinggi. Sebanyak enam isolat bakteri diazotrof penghasil IAA terbaik (LAA4, LAA5, LAR3, LAR5, LAZ2, dan LAZ3) mampu menambat nitrogen berkisar antara 3,50-88,55 ppm, dengan isolat LAR5 sebagai penghasil nitrogen tertinggi. Isolat bakteri diazotrof LAA4, LAA5, dan LCA1 diidentifikasi sebagai spesies anggota genus *Azospirillum*, isolat bakteri

diazotrof LAZ2 dan LAZ3 merupakan spesies anggota genus *Azotobacter*, isolat bakteri diazotrof LAR3, LAR5, LBR1, dan LCR3 merupakan spesies anggota genus *Rhizobium*.

DAFTAR PUSTAKA

- Adiguzel, A., Bektas, K. I., Sahin, F. & B. Özlem., 2011. Molecular Diversity Of Thermophilic Bacteria Isolats Adiguzel From Pasinler Hot Spring (Erzurum, Turkey). *Turkish Journal of Biology*, 35 (3) : 267–274.
- Agisti, A., Nur, H. A., & Tutik, N. Hidayati, 2014. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Penambat Nitrogen Non Simbiotik pada Lahan Restorasi dengan Metode Legume Cover Crop (LCC) di Daerah Pasirian Lumajang Jawa Timur. *Jurnal Sains Dan Seni Pomits*, 3 (2) : 36-39.
- Agustian, R. Syafei, & L. Maria., 2012. Keragaman Bakteri Penambat N Pada Rhizosfir *Titonia* (*Tithonia diversifolia*) Yang Tumbuh Pada Tanah Masam Ultisol. *Jurnal Solum*, 9 (2) : 98-105.
- Allito, Bunkura B., Nana Ensui-Mensah, & Vincent L., 2020. Legume-Rhizobium Strain Specificity Enhances Nutrition and Nitrogen Fixation in Faba Bean (*Vicia faba* L.). *Journal Agronomy*, 10 (82) : 1-21.
- APPI., 2015. Kebutuhan pupuk urea 2006–2015. http://www.appi.or.id/images/statistic/KEBUTUHAN_PUPUK_UREA_2006-_2015.xls. Diunduh tanggal 15 Mei 2019.
- Atlas, R., Brown, A., Dobra, K. & Miller, L., 1984. *Experimental Microbiology*. New York: Macmillan Publishing Company.
- Bergey, D. H., & Boone, D., 2009. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 2nd Edition. New York: Springer Sciences-Business Media.
- Brown, A. E., 2007. *Microbiological Applications*. New York : Higher Education.
- Cowan, ST, Steel, KJ, Barrow, GI, & Feltham, RKA., 1993. *Cowan and Steel's Manual for The Identification of Medical Bacteria*. 3rd Edition. Australia: Cambridge University Press.
- Danapriatna, N., 2010. Biokimia Penambatan Nitrogen oleh Bakteri Non Simbiotik. *Jurnal Agribisnis & Pengembangan Wilayah*, 1 (2): 1 –10.
- de Lajudie, P., A. Willems, B. Pot, D. Dewettinck, G. Maestroujan, M.Neyra, M.D. Collins, B. Dreyfus, K. Kersters and M. Gillis., 1994. Polyphasic taxonomy of rhizobia: emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. *International Journal. Systematic Bacteriology*, 44 : 733.
- Firmansyah, I., Liferdi, Khaririyatun, N., & Yufdy, MP., 2015. Pertumbuhan dan Hasil Bawang Merah dengan Aplikasi Pupuk Organik dan Pupuk Hayati pada Tanah Alluvial (*The Growth and Yield of Shallots with Organic Fertilizers and Biofertilizers Application in Alluvial Soil*). *Jurnal Hortikultura*, 25 (2): 133-144.
- Halmedan, J., Yogi S., Sudiarso., 2017. Respon Tanaman Jagung Manis (*Zea mays saccharata*) Terhadap Aplikasi Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) Dan Pupuk Kandang Ayam. *Jurnal Produksi Tanaman*, 5(12).
- Hindersah, R. & Simarmata T., 2004. Kontribusi rizobakteri *Azotobacter* Dalam Meningkatkan Kesehatan Tanah Melalui Fiksasi N₂ Dan Produksi Fitohormon Di Rizosfer. *Jurnal Nature Indo*, 6 : 127–133
- 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.
- Islam, H., Nelvia, N., & Zul, D., 2019. Isolasi Dan Uji Potensi Bakteri Diazotrof Non Simbiotik Asal Tanah Kebun Kelapa Sawit Dengan Aplikasi Tandan Kosong Dan Limbah Cair Pabrik Kelapa Sawit. *Jurnal Agroteknologi*, 9(2) : 35-40.
- Lay, B. W., 1994. *Analisis Mikroba di Laboratorium*. Jakarta: PT Raja Grafindo Persada.
- Nasikah., 2007. *Pengaruh Inokulasi Rhizobium Dan Waktu Pemberian Pupuk N (Urea) Terhadap Pertumbuhan Dan Hasil Kedelai Di Lahan Sawah Setelah Kedelai (Glycine max L. Merri)*. Skripsi. Malang: Fakultas Sains dan Teknologi. Universitas Islam Negeri Malang, Malang.
- Oedjijono, E. S., Soetarto, S., & Moeljopawiro, S., 2014. Promising plant growth promoting rhizobacteria of *Azospirillum* spp. isolats from iron sand soils, Purworejo coast, central Java, Indonesia. *Advances in Applied. Science Research.*, 5 : 302-308.
- Packialakshmi, N. & Aliya, R. T., 2014. Comparative Study of Vermicast and

- Charcoal Used as a Carrier Inoculums to the Biofertilizer Preparation. *BMR journals*, 1 (1) : 1-6.
- Pangestika, R., Oedjijono, Lestanto, U. W., 2017. Populasi *Azospirillum* spp. Pada Rhizosfer Ilalang (*Imperata cylindrica* (L.) Beauv.) yang Tumbuh Di Lingkungan Berbeda. *Journals Science Pharmacy*, 3 (2) : 21-28.
- Panjaitan, A., Anas, I., Widyastuti, R., & Widayati, W. E., 2015. Kemampuan Bakteri Diazotrof Endofit Untuk Meningkatkan Pertumbuhan Vegetatif Bibit Kelapa Sawit (*Elaeis guineensis* jacq). *Jurnal Ilmu Tanah dan Lingkungan*, 17(1) : 1-7.
- Purwanto, Yuyun, Y., Sumadi & Tualar, S., 2017. Nitrogenase Activity and IAA Production of Indigenous Diazotroph and Its Effect on Rice Seedling Growth. *AGRIVITA Journal of Agricultural Science*, 39(1) : 31-37
- Raffi, MMD., Charyulu, PBBN., 2012. Nitrogen Fixation by the Native *Azotospirillum* spp. Isolat from Rhizosphere and NonRhizosphere of Foxtail Millet. *Asian Journal Biological and Life Science*, 1 (3) : 213-218.
- Rahmi., 2014. Kajian Efektifitas Mikroba *Azotobacter* sp. Sebagai Pemacu Pertumbuhan Tanaman Kakao (*Theobroma cacao* L.). *Jurnal Galung Tropika*, 3 (2) : 44-53.
- Ramadhaniah, F. A., 2013. *Keragaman Bakteri Endofit pada Kultivar Nanas (Ananas comosus* (L.) Merr) *Leor dan Duri di Kabupaten Subang*. Skripsi. Bandung : Universitas Pendidikan Indonesia.
- Rasool, L., A. asghari, A. Jamil and S.U. Rehman., 2015. Identification of *Azospirillum* Species from Wheat Rhizosphere. *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 25(4) : 1081-1086.
- Reetha, S., Bhuvaneswari, G., Thamizhiniyan, P. & Mycin, T. R., 2014. Isolation of indole acetic acid (IAA) producing rhizobacteria of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* and enhance growth of onion (*Allium cepa* L.). *International Journal of Current Microbiology and Applied Science*, 3(2) : 568-574.
- Ricard, Patrick O., Abimbola O. A., Adenlyl A. O., 2018. Screening of bacteria isolatd from the rhizosfer of maize plant (*Zea mays* L.) form ammonia production and nitrogen fixation. *African Journal of Microbiology Research*, 12 (34) : 829-834.
- Santoso, K., Rahmawati, Rafdinal., 2019. Eksplorasi Bakteri Penambat Nitrogen dari Tanah Hutan Mangrove Sungai Peniti, Kabupaten Mempawah. *Jurnal Protobiont*, 8 (1) : 52-58.
- Saragih, D., Herawati H., & Niar Nurmauli., 2013. Pengaruh Dosis Dan Waktu Aplikasi Pupuk Urea Dalam Meningkatkan Pertumbuhan Dan Hasil Jagung (*Zea Mays*, L.) Pioneer 27. *Jurnal Agrotek Tropika*, 1 (1): 50-54.
- Sari, E., Anggi, Nico F., Zulvia, Intan S., & Eman S., 2018. Isolasi Dan Karakterisasi Rhizobium Dari *Glycine max* L. Dan *Mimosa pudica* Linn. *Jurnal Penelitian Biologi*, 3 (2) : 55-62.
- Sari, Ramdana, & Retno P., 2015. Rhizobium: Pemanfaatannya Sebagai Bakteri Penambat Nitrogen. *Info Teknis Ebotani*, 12 (1) : 51-64.
- Simanungkalit, R., D., M., Rasti S., Ratin Dewi H., & Edi H., 2006. *Bakteri Penambat Nitrogen.*, Dalam buku *Pupuk Organik dan Pupuk Hayati*. Balai Litbang Sumberdaya Lahan Pertanian. Badan Litbang Pertanian.
- Surtiningsih, T., Farida, & T. Nurhariyati., 2009. Biofertilisasi Bakteri Rhizobium pada Tanaman Kedelai (*Glycine max*(L) Merr.). *Berk. Penel. Hayati*, 15 : 31–35.
- Susilowati, Dwi N., & Setyowati, M., 2016, Analisis Aktivitas Nitrogenase Dan Gen nifH Isolat Bakteri Rhizosfer Tanaman Padi dari Lahan Sawah Pesisir Jawa Barat. *Journal of Biology*, 9 (2) : 126-137.
- Tilak K.V.B.R., K.K. Pal, R. Dey., 2010. *Microbes for sustainable agriculture*, I.K. New Delhi, India: International Publishing House Pvt. Ltd.
- Trivendi, P.C., Pandey, S., & Bhadauri., 2010. *Text Book of Microbiology*. Jaipur India : Aavishkar Publisher Distributors.
- Ummah, R., Mahanani, T. S., Pramita, Y., 2019. Potensi Isolat Bakteri Endofit Akar Tanaman Bawang Merah (*Allium ascalonicum*) sebagai Penambat Nitrogen. *Jurnal LenteraBio*, 8 (2) : 143-149.
- Walida, H., Fitra, S. H., Miranda, H., Febri, F. Y., 2019. Isolasi Dan Identifikasi Bakteri Penghasil Iaa Dan Pelarut Fosfat Dari Rhizosfer Tanaman Kelapa Sawit. *Jurnal Biologi Lingkungan, Industri, dan Kesehatan*, 6 (2) : 1-7.
- Wedastri, S. 2002., Isolasi dan Seleksi *Azotobacter* spp. Penghasil Faktor Tumbuh dan

- Penambat Nitrogen dari Tanah Masam. *J. Ilmu Tanah dan lingkungan*, 3 : 45-51
- Widiawati, S., 2015. Isolasi dan Aktivitas Plant Growth Promoting Rhizobacteria dari Tanah Perkebunan Karet, Lampung. *Jurnal Berita Biologi*, 14 (1) : 77-88.
- Wiyantoko, B., P. Kurniawati, T. E., Purbaningtyas., 2017. Pengujian Nitrogen Total, Kandungan Air Dan Cemaran Logam Timbal Pada Pupuk Anorganik Nitrogen Phospor Kalium (NPK) Padat . *Jurnal Sains dan Teknologi*, 6 (1) : 51-60.
- Yulitaasary, A. T., Asyiah, I. N., & Iqbal, M., 2017. Isolasi Dan Identifikasi Azotobacter Dari Rhizosfer Tanaman Kopi (*Coffea Canephora*) Yang Terserang Nematoda Parasit *Pratylenchus Coffeae*. *Saintifika*, 19(2) : 13-23