

Kemampuan Bakteri Halotoleran dari Sedimen Mangrove Pantai Logending dalam Pelarutan Fosfat dan Penambatan Nitrogen

The Ability of Halotolerant Bacteria from Mangrove Sediment of Logending Beach in Phosphate Solubilization and Nitrogen Fixation

Adib Ramadani, Oedjijono*, Hendro Pramono, Meyta Pratiwi

Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Biologi, Universitas Jenderal Soedirman

*corresponding author, Email: oedjijono@unsoed.ac.id

Rekam Jejak Artikel:

Diterima : 27/01/2025

Disetujui : 15/03/2025

Abstract

Mangrove environments can be a good source to obtain halotolerant bacteria that have the potential as biological fertilizer agents with the ability to dissolve phosphate and to fix free N₂. The aims of this study were to test the tolerance of bacterial isolates from mangrove sediments to salinity, to test the ability of halotolerant bacteria isolates in phosphate solubilization and nitrogen fixation, and to identify selected halotolerant bacterial isolates. The results showed that of the 43 isolates studied, 29 isolates were tolerant to 5-7% NaCl. Of the 29 isolates, 11 isolates of halotolerant bacteria (>5% NaCl) were known to be able to dissolve phosphate and fix nitrogen with three selected isolates (LG36, LG60, and LG66). The three isolates showed phosphate solubilization efficiencies of 125, 123.72, and 126.92, respectively; and their nitrogen fixing abilities were 38.02 ppm; 28.4 ppm; and 51.93 ppm, respectively. The identity of the three selected isolates indicated that the LG60 isolate belonged to a species member of the genus *Rhizobium*, while the isolates LG36 and LG66 could not yet be identified at the genus level.

Key Words: *halotolerant, mangrove, nitrogen fixation, phosphate solubilization.*

Abstrak

Lingkungan mangrove dapat menjadi sumber yang baik untuk mendapatkan bakteri halotoleran yang berpotensi sebagai agensia pupuk hayati dengan kemampuan melarutkan fosfat dan menambat N₂ bebas. Tujuan penelitian ini adalah menguji toleransi isolat bakteri asal sedimen mangrove terhadap salinitas, menguji kemampuan isolat bakteri halotoleran dalam pelarutan fosfat dan penambatan nitrogen bebas, dan karakterisasi fenetik isolat bakteri halotoleran terpilih. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dari 43 isolat yang diteliti, sebanyak 29 isolat toleran terhadap NaCl 5-7%. Dari 29 isolat, sebanyak 11 isolat bakteri halotoleran (>5% NaCl) diketahui mampu melarutkan fosfat dan menambat nitrogen dengan tiga isolat terpilih (LG36, LG60, dan LG66). Ketiga isolat tersebut menunjukkan efisiensi pelarutan fosfat masing-masing 125, 123,72, dan 126,92; dan kemampuan penambatan nitrogennya berturut-turut 38,02 ppm; 28,4 ppm; dan 51,93 ppm. Identitas ketiga isolat terpilih menunjukkan bahwa isolat LG60 merupakan spesies anggota genus *Rhizobium*, sedangkan isolat LG36 dan LG66 belum dapat diidentifikasi pada level genus.

Kata kunci: *fiksasi nitrogen, halotoleran, mangrove, pelarutan fosfat*

PENDAHULUAN

Bakteri halotoleran adalah bakteri yang toleran terhadap lingkungan salin (Palimirmo *et al.*, 2016). Bakteri tersebut dapat tumbuh pada lingkungan dengan salinitas berkisar antara 1-33% NaCl (Etesami & Beattie, 2018). Daerah pesisir seperti pantai dan mangrove merupakan sumber yang baik untuk mendapatkan mikroba halotoleran yang dapat berperan sebagai *biofertilizer* (Soni *et al.*, 2013). Pramono *et al.* (2021) berhasil mengisolasi sebanyak 99 isolat bakteri dari sedimen mangrove di pantai Logending, Kebumen, dan sebanyak 87 isolat memiliki aktivitas selulolitik. Menurut Bibi *et al.* (2017), ekosistem mangrove terdapat di daerah pasang surut air laut dan organisme yang terdapat di daerah ini dapat mentolerir salinitas, kondisi anaerobik, pasang surut, dan suhu tinggi.

Pertanian di lahan pesisir pantai dan lahan sawah pasang surut dihadapkan pada kendala

salinitas yang cenderung cukup tinggi. Upaya untuk mengatasi permasalahan pertanian di lahan salin dapat melalui penerapan bioteknologi dari aspek mikrobiologi, yaitu dengan memanfaatkan bakteri fungsional yang berpotensi sebagai agensia *biofertilizer* (pupuk hayati) yang dapat membantu memperbaiki kualitas tanah secara biologis (Wijebandara *et al.*, 2009). Kelompok bakteri fungsional tersebut adalah kelompok bakteri pemacu pertumbuhan tanaman (*Plant Growth Promoting Bacteria*/PGPB), khususnya yang memiliki kemampuan sebagai penambat nitrogen, pelarut fosfat, dan atau penghasil fitohormon. Kandidat PGPB sebaiknya berasal dari wilayah setempat (mikroba indigen) atau lingkungan yang memiliki kondisi sama dan mampu berasosiasi dengan tanaman dalam memfasilitasi pertumbuhan di tanah salin (Hayat *et al.*, 2010). Genera bakteri yang

dikenal sebagai agensia peningkat pertumbuhan tanaman antara lain *Rhizobium*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Serratia*, *Acetobacter*, dan *Burkholderia* (Widawati dan Suliasih, 2016).

Bahan organik merupakan sumber hara bagi pertumbuhan tanaman. Unsur hara yang esensial untuk pertumbuhan tanaman di antaranya fosfor (P) dan nitrogen (N). Ketersediaan fosfor dan nitrogen di tanah dapat ditingkatkan oleh mikroorganisme seperti bakteri terutama yang memiliki karakteristik sebagai agensia *biofertilizer* (Astuti et al., 2013). Tanah dengan kandungan kadar garam tinggi merupakan salah satu faktor pembatas bagi pertumbuhan tanaman dan produktivitas pertanian. Tanah dengan kandungan kadar garam tinggi memiliki tingkat konduktivitas listrik tinggi, yang mengakibatkan tekanan osmotik air meningkat dan menyebabkan terjadinya plasmolisis jaringan tanaman (Thohiron & Prasetyo, 2012). Bakteri halotoleran mampu beradaptasi pada lingkungan salin karena dapat mempertahankan keseimbangan osmotik dengan menurunkan konsentrasi garam intraselulernya (Etesami & Beattie, 2018). Bakteri tersebut mengakumulasi berbagai zat terlarut organik di sitoplasma, dan larutan tersebut menghindarkan sel dari plasmolisis di lingkungan asin. Zahir et al. (2019) menyatakan bahwa beberapa spesies bakteri juga memperoleh ion K^+ dan Ca^{++} untuk menjaga keseimbangan ion.

Mikroba peningkat pertumbuhan tanaman memiliki peran penting bagi kesuburan tanah maupun pertumbuhan tanaman. Bakteri pelarut fosfat (BPF) adalah kelompok mikroorganisme tanah yang mampu melarutkan P terfiksasi tanah dan mengubahnya menjadi bentuk tersedia yang dapat diserap tanaman. Mikroba berperan dalam pelarutan P-organik melalui produksi CO_2 dan asam-asam organik sehingga ion $H_2PO_4^-$ atau HPO_4^{2-} bebas dan larut serta tersedia untuk tanaman (Nisa, 2018). Menurut Jones (1998), asam-asam organik melepaskan P ke dalam tanah dengan mengganti P pada permukaan logam (hidro-) oksida melalui reaksi pertukaran ligan, dengan melarutkan (hidro-) oksida yang mengadsorpsi P. dan dengan mengkomplekskan dengan logam dalam larutan, sehingga mencegah pengendapan P dengan logam tersebut. Nitrogen merupakan unsur kimia yang melimpah di udara namun tidak dapat dimanfaatkan secara langsung oleh tumbuhan. Bakteri penambat nitrogen (BPN) adalah bakteri yang dapat mengkonversi molekul N_2 bebas di atmosfer menjadi ion ammonium (NH_4^+) melalui reduksi elektron dan protonasi gas N_2 dengan menggunakan enzim nitrogenase sehingga dapat digunakan oleh tumbuhan (Jumadi, 2015).

Pemanfaatan inokulan bakteri campuran dari anggota genera kelompok PGPR dapat membantu memperbaiki tanah dan berfungsi sebagai amelioran terhadap salinitas (Lugtenberg et al., 2013), dapat berperan sebagai agensia biokontrol dalam

melindungi tanaman dari berbagai organisme dan penyakit pengganggu tanaman (Pliego et al., 2011), meningkatkan pertumbuhan tanaman dengan memenuhi unsur hara (Dodd & Perez-Alfocea, 2012), serta membantu daya tahan tanaman akibat cekaman lingkungan yang ekstrim seperti kontaminasi logam berat (Berg et al., 2013). Aplikasi jamur pelarut fosfat (*Aspergillus* sp.) dan bakteri penambat nitrogen (*Azospirillum* sp., *Azotobacter* sp.) baik secara tunggal maupun campuran dapat memacu pertumbuhan tanaman dan meningkatkan hasil jagung di rumah kaca (Latupapua & Suliasih, 2001). Tanaman yang diinokulasi *Azospirillum* sp. dan campuran *Azotobacter* sp. dan *Aspergillus* sp. mampu menaikkan panen jagung masing-masing sebesar 108,84% dan 105,17% dibandingkan kontrol.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan isolat bakteri halotoleran asal sedimen mangrove pantai Logending, Kebumen dalam melarutkan fosfat dan menambat nitrogen, serta mengetahui identitas isolat bakteri halotoleran terpilih yang memiliki kemampuan tinggi dalam melarutkan fosfat dan menambat nitrogen.

MATERI DAN METODE

Uji toleransi isolat bakteri terhadap salinitas (Mohanta et al., 2020)

Sebanyak 43 isolat bakteri (LG2, LG4, LG6, LG7, LG13, LG14, LG16, LG17, LG19, LG25, LG27, LG28, LG29, LG32, LG33, LG34, LG35, LG36, LG37, LG38, LG39, LG40, LG42, LG45, LG48, LG60, LG61, LG62, LG63, LG64, LG66, LG81, LG92, LG101, LG102, LG108, LG110, LG119, LG135, LG137, LG140, LG142, LG146) asal sedimen mangrove pantai Logending Kebumen diuji toleransinya terhadap salinitas. Sebanyak satu ose isolat bakteri diinokulasikan pada medium NB (*Nutrient Broth*) dengan kadar garam (salinitas) yang berbeda yaitu 0%, 3%, 5%, dan 7% NaCl. Masing-masing perlakuan dilakukan 2 kali pengulangan dan kultur diinkubasi 1x24 jam pada suhu 28°C. Hasil positif ditandai dengan medium menjadi keruh.

Uji kualitatif isolat bakteri dalam melarutkan fosfat (Naher et al., 2013)

Pengujian kemampuan isolat bakteri dalam melarutkan fosfat dilakukan terhadap isolat yang mampu mentoleransi kadar garam lebih dari 5%. Sebanyak satu ose isolat bakteri diinokulasikan secara aseptis dengan metode *dot method inoculation* pada cawan petri berisi medium *Pikovskaya Agar*. Inokulasi dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan pada tiap cawan. Cawan-cawan kultur selanjutnya diinkubasi pada suhu ruang selama 7 hari. Zona jernih yang terbentuk di sekitar koloni bakteri diukur diameternya. Efisiensi pelarutan fosfat (E) diukur berdasarkan rumus:

$$\text{Indeks pelarutan} = \frac{\text{Diameter zona jernih (mm)}}{\text{Diameter koloni (mm)}} \times 100$$

Uji kualitatif isolat bakteri dalam menambat nitrogen bebas (Syed-Ab-Rahman *et al.*, 2018)

Pengujian kemampuan isolat bakteri dalam menambat N₂ bebas secara kualitatif dilakukan terhadap isolat yang mampu mentoleransi kadar garam lebih dari 5%. Sebanyak satu ose isolat bakteri diinokulasikan dengan metode tusuk/*stab inoculation* ke dalam tabung reaksi berisi medium semi padat *nitrogen-free bromothymol blue* (NfB). Tabung diinkubasi pada suhu 28°C selama 4 hari. Kemampuan penambatan nitrogen bebas isolat diindikasikan dengan kemampuan tumbuh pada medium tersebut.

Isolat bakteri yang memiliki nilai efisiensi pelarutan fosfat tinggi dan mampu tumbuh pada medium NfB, selanjutnya diinokulasikan pada: medium Caceres yang merupakan medium selektif untuk *Azospirillum*, medium YEMA (*Yeast Extract Mannitol Agar*) untuk menumbuhkan *Rhizobium*, dan medium Ashby's Mannitol Agar untuk menumbuhkan *Azotobacter*. Cawan-cawan selanjutnya diinkubasi pada suhu 28°C selama 3-4 hari.

Uji kuantitatif isolat bakteri dalam menambat nitrogen bebas (Oedjijono *et al.*, 2014)

Uji kuantitatif penambatan N₂ bebas dilakukan terhadap isolat yang memiliki nilai efisiensi pelarutan fosfat tinggi dan mampu tumbuh pada medium Ashby, medium Caceres, atau medium YMA. Sebanyak 1 mL isolat kultur berumur 2 hari pada medium NfB ke dalam botol berisi 10 mL medium tanpa nitrogen dan diinkubasi selama 10 hari pada suhu ruang. Kultur isolat tersebut selanjutnya didestruksi pada labu Kjeldahl dengan dicampurkan garam (rasio K₂SO₄, CuSO₄ dan logam selenium adalah 40: 2,5: 1,5), selanjutnya 3 mL asam sulfat pekat ditambahkan ke dalam tabung. Tabung selanjutnya diproses dengan Digester pada suhu 420°C selama 20 menit. Tabung tersebut kemudian didinginkan dan ditambahkan akuades sampai volume akhir 50 mL. Sebanyak 20 mL sampel dituangkan ke dalam tabung destilasi dan diletakkan di bawah destilator. Labu erlenmeyer 250 mL berisi 20 mL asam borat 4% dan 6 tetes reagen Conway (1000 mg *methyl red*, 150 mg *bromocresol green*, 200 mL etanol 96%) diletakkan di bawah kondensor peralatan destilasi dan ujung saluran keluar kondensor berada di bawah larutan. Distilasi dilakukan menggunakan unit distilasi Semi Otomatis dan 30 mL NaOH 40% dan 100 mL akuades dituangkan melalui alat distilasi tersebut. Larutan yang mengandung NH₃, asam borat dan indikator campuran dititrasi terhadap 0,05 N HCl menggunakan Autotitrator.

Volume HCl yang dibutuhkan saat proses titrasi digunakan untuk mengetahui kandungan nitrogen total dalam sampel. Perhitungan N total menggunakan rumus:

$$N \text{ total (ppm)} = \frac{(A-B) \times N \text{ HCL} \times 14,008 \text{ (g/mol)} \times 1000000}{\text{massa sampel (g)} \times 1000}$$

Keterangan :

A : Volume titrasi sampel

B : Volume titrasi blanko.

Karakterisasi isolat bakteri halotoleran terpilih

Karakterisasi isolat bakteri halotoleran terpilih dilakukan menggunakan metode konvensional. Pengujian karakter fenetik isolat bakteri meliputi sifat morfologi koloni, morfologi sel (pengamatan gram, bentuk sel, dan motilitas), fisiologis (uji toleransi terhadap suhu dan pH), biokimia (uji katalase, oksidase, amilolitik, proteolitik, oksidatif fermentatif, dan nitrat reduktase), dan nutrisi (uji kemampuan menggunakan karbohidrat sebagai satu-satunya sumber karbon (glukosa, laktosa, maltose, sukrosa, dan arabinosa)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian toleransi isolat bakteri terhadap salinitas menunjukkan bahwa dari 43 isolat yang diuji, sebanyak 39 isolat (LG4, LG6, LG7, LG13, LG14, LG16, LG17, LG19, LG25, LG27, LG28, LG29, LG32, LG33, LG34, LG35, LG36, LG37, LG38, LG39, LG40, LG42, LG45, LG48, LG60, LG61, LG62, LG63, LG64, LG66, LG81, LG92, LG101, LG102, LG108, LG110, LG119, LG137, LG142) toleran terhadap salinitas 3%, 28 isolat (LG6, LG7, LG14, LG16, LG17, LG19, LG25, LG27, LG28, LG29, LG32, LG35, LG36, LG37, LG38, LG39, LG40, LG42, LG45, LG48, LG60, LG62, LG64, LG66, LG92, LG102, LG108, LG110) toleran hingga salinitas 5%, dan 13 isolat bakteri (LG16, LG17, LG35, LG36, LG38, LG45, LG48, LG60, LG64, LG66, LG102, LG108, LG110) mampu tumbuh hingga salinitas 7%. Agu *et al.* (2017) menyatakan bahwa bakteri halotoleran tumbuh paling baik pada suhu 28°C – 37°C pada media yang ditambah dengan 3-5% NaCl. Menurut Karolinoerita dan Annisa (2020), Tanah salin memiliki kandungan NaCl berkisar antara 2-6% yang menyebabkan permasalahan pada sifat fisika, kimia dan biologi tanah dan berakibat tanaman keracunan garam.

Hasil ini membuktikan bahwa sebagian besar isolat yang diuji merupakan bakteri toleran terhadap kadar garam tinggi sebagaimana asal mereka dari lingkungan salin (sedimen mangrove). Pemilihan salinitas 3-7% disesuaikan dengan rentang salinitas pada tanah salin yang optimal untuk bakteri halotoleran tumbuh. Berdasarkan penelitian Zahir *et al.*, (2019), Sebanyak 5 strain bakteri halotoleran dari genus *Azotobacter* mampu tumbuh pada konsentrasi NaCl 6%, namun hanya 2 strain yang dapat mempertahankan pertumbuhannya pada konsentrasi NaCl 10%. Ramadoss *et al.* (2013) mendapatkan delapan puluh empat strain bakteri halotoleran yang diisolasi dari danau garam Sambhar, tanah salin Jaiselmer dan danau Pushkar. Semua isolat bakteri tumbuh dengan baik pada 5% NaCl, tetapi hanya 5

isolat yang menunjukkan pertumbuhan pada konsentrasi 20% NaCl.

Hasil uji toleransi isolat bakteri terhadap salinitas yang bervariasi menunjukkan adanya perbedaan kemampuan yang dimiliki setiap isolat dalam merespon salinitas. Menurut Tufail *et al.* (2021), mekanisme bakteri halotoleran mengatasi salinitas di antaranya adalah melalui konstruksi membran atau dinding sel yang spesifik, mengumpulkan zat terlarut yang kompatibel, menambah kapasitas energi sel, atau memproduksi eksopolisakarida yang membatasi masuknya garam ke dalam sel. Etesami & Beattie (2018) menyatakan bahwa strategi bakteri halotoleran untuk bertahan hidup di lingkungan salin yaitu dengan meminimalkan penyerapan garam melalui sifat komposisi membran sel atau dinding sel, mengatur konsentrasi ion intraseluler dengan memompa ion keluar sel melalui antiporter elektrogenik Na^+/H^+ dan pengangkut ion K^+/Na^+ untuk penyesuaian osmotik, serta memproduksi protein dan enzim yang disesuaikan dengan konsentrasi ion terlarut yang tinggi.

Isolat bakteri yang dapat melarutkan fosfat ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekitar koloni saat ditumbuhkan pada medium agar Pikovskaya. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dari 28 isolat yang toleran salinitas >5%, sebanyak 11 isolat mampu melarutkan fosfat. Hasil pengukuran rata-rata efisiensi pelarutan fosfat dari ke-11 isolat tersebut berkisar antara 108,34 hingga 126,92 (Tabel 1). Kemampuan pelarutan fosfat tinggi ditunjukkan oleh isolat LG66, LG36 dan LG60 dengan rata-rata efisiensi pelarutan fosfat masing-masing 126,92, 125, dan 123,72. Hasil ini mengindikasikan bahwa ketiga isolat tersebut memiliki aktivitas enzim fosfatase dan atau menghasilkan asam-asam organik yang tinggi. Larasati *et al.* (2018) menyatakan bahwa semakin tinggi aktivitas enzim yang dihasilkan bakteri pelarut fosfat, semakin besar zona bening yang dihasilkan. Fosfatase merupakan sekelompok enzim yang mengkatalisis reaksi mineralisasi hidrolitik secara enzimatik dengan pelepasan fosfat tidak terlarut menjadi terlarut. Kannapiran & Ramkumar (2011) mendapatkan indeks pelarutan fosfat bakteri asal pesisir pantai Thondi, India untuk *Flavobacterium* sp., *Micrococcus* sp., *Corynebacterium* sp., *Alcaligenes* sp., *Vibrio* sp., *Enterobacter* sp., *Bacillus* sp., dan *Pseudomonas* sp. berturut-turut sebesar 96,24, 102,85, 103,17, 105,56, 121,80, 125,10, 180,35, dan 228,26. Fatimah *et al.* (2021) melaporkan bahwa kemampuan pelarutan fosfat bakteri asal rhizosfer mangrove di Tuban menghasilkan zona bening berkisar antara 1,02-2,36 mm (IP 102-236).

Menurut Fitriyanti *et al.* (2017), terbentuknya zona bening di sekitar koloni bakteri menunjukkan adanya aktivitas produksi asam organik oleh bakteri yang berikatan dengan ion Ca^+ penyusun senyawa $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ yang terdapat pada medium agar

Pikovskaya dan membebaskan ion H_2PO_4^- sehingga membentuk area yang berwarna lebih jernih. Unsur fosfat (P) yang dapat diserap tanaman adalah dalam bentuk ion (HPO_4^{2-} , H_2PO_4^-). Menurut Larasati *et al.* (2018), aktivitas produksi asam organik tersebut mengakibatkan terjadinya penurunan pH pada medium sehingga kekeruhan media di sekitar koloni menjadi bening.

Tabel 1. Kemampuan Isolat Bakteri dalam Pelarutan Fosfat dan Pertumbuhan pada Medium NfB

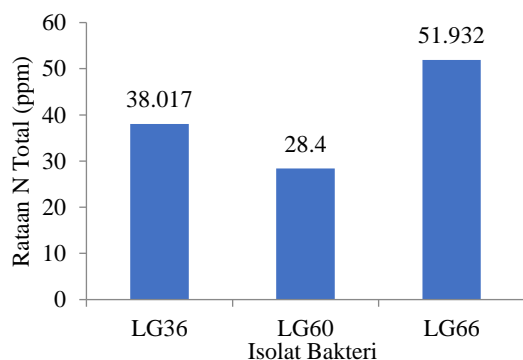
No.	Kode Isolat	Efisiensi Pelarutan Fosfat	Kemampuan tumbuh pada medium NfB
1	LG6	108,34	+
2	LG7	120,55	+
3	LG14	-	+
4	LG16	-	-
5	LG17	-	-
6	LG19	-	-
7	LG25	-	+
8	LG27	-	+
9	LG28	120,58	+
10	LG29	-	+
11	LG32	121,74	+
12	LG35	-	-
13	LG36	125	+
14	LG37	-	+
15	LG38	115,54	+
16	LG39	120	+
17	LG40	-	-
18	LG42	-	+
19	LG45	-	+
20	LG48	117,58	+
21	LG60	123,71	+
22	LG62	-	+
23	LG64	-	+
24	LG66	126,92	+
25	LG92	-	+
26	LG102	113,41	+
27	LG108	-	+
28	LG110	-	+

Hasil uji kualitatif penambatan nitrogen bebas pada medium NfB menunjukkan bahwa sebanyak 23 isolat mampu menambat nitrogen, yang ditandai dengan kemampuan tumbuh pada medium semi padat NfB (Tabel 1). Mikroba yang mempunyai karakteristik aerotaktik, yaitu berpindah dari suatu tempat di dalam medium untuk mencari keseimbangan difusi oksigen, akan membentuk pelikel pada sekitar 5 mm dari permukaan media (Pas *et al.*, 2015). Indikasi bakteri mikroaerofilik, selain terdapat pelikel juga dijumpai adanya perubahan warna pada medium NfB yang semula berwarna hijau kekuningan menjadi biru menandakan adanya aktivitas bakteri dalam menambat nitrogen bebas dari atmosfer. Kelompok bakteri ini akan mengikat nitrogen dan mengubahnya menjadi ammonium (NH_4^+) yang bersifat basa sehingga menyebabkan indikator *bromothymol blue* yang terdapat dalam media berubah menjadi biru (Ayundani, 2020).

Tabel 2. Hasil Karakterisasi Isolat Bakteri Halotoleran Terpilih

Karakter	Kode Isolat		
	LG36	LG60	LG66
Morfologi Sel			
Gram	Positif	Negatif	Positif
Bentuk sel	Basil	Basil	Basil
Motilitas	+	+	-
Morfologi Koloni			
Bentuk koloni	Sirkular	Sirkular	Irregular
Ukuran	Kecil	Sedang	Sedang
Optik koloni	Translucent	Translucent	Translucent
Tepi	Rata	Rata	Undulate
Warna	Putih kekuningan	Putih kekuningan	Putih kekuningan
Elevasi	Rata	Convex	Rata
Fisiologis			
Toleransi terhadap pH			
4	+	-	-
7	+	+	+
10	+	+	+
Toleransi terhadap Suhu (°C)			
50	-	+	-
37	+	+	+
Suhu ruang (28°C)	+	+	+
10	-	-	-
Kebutuhan Nutrisi			
Sukrosa	-	+	+
Fruktosa	+	+	+
Arabinosa	-	+	-
Glukosa	+	+	+
Laktosa	-	-	+
Biokimiawi			
Katalase	+	+	+
Oksidase	-	-	-
Amilolitik	-	-	-
Proteolitik	-	-	-
Oksidatif/Fermentatif	+/+	+/+	+/+
Nitrat reduktase	+	-	+

(Bakteri penambat nitrogen mikroaerofilik antara lain yaitu spesies anggota genus *Azospirillum*. Menurut Danapriatna (2016), pelikel yang terbentuk di sub permukaan (2 mm) medium NfB merupakan anggota genus *Azospirillum*, sedangkan pelikel yang terbentuk pada permukaan medium NfB merupakan anggota genera *Azotobacter*, *Rhizobium*, dan bakteri penambat nitrogen lainnya.



Gambar 1. Hasil pengukuran penambatan nitrogen bebas isolat terpilih menggunakan metode Kjeldahl

Bakteri penambat nitrogen dapat menambat nitrogen dari atmosfer karena memiliki kemampuan dalam memproduksi nitrogenase, yaitu enzim spesifik di dalam sel (intraseluler). Nitrogenase disusun oleh dua komponen yang saling menunjang yaitu protein Fe (komponen I) dan protein Mo-Fe (komponen II). Bakteri tersebut melepaskan nitrogen yang ditambat dari atmosfer ke lingkungan dalam bentuk amonium (Eris *et al.*, 2017).

Hasil pengukuran penambatan N₂ isolat bakteri halotoleran terpilih (LG36, LG60, LG66) secara kuantitatif menggunakan metode Kjeldahl menunjukkan bahwa ketiga isolat mampu menambat nitrogen antara 28,4 ppm hingga 51,9 ppm dan hasil tertinggi ditunjukkan oleh isolat LG66 (Gambar 1). Das *et al.* (2018) melaporkan bahwa kemampuan penambatan nitrogen bakteri asal pesisir Sagar Island, West Bengal bervariasi antara 20,4 hingga 81,8 ppm. Smita & Goyal (2017) mendapatkan hasil penambatan nitrogen *Pseudomonas* sp. dan *Paenibacillus* sp. yang diisolasi dari tanah alkalin di Thapar University campus, Patiala, Punjab, India masing-masing sebesar 14,44 ppm/mL and 18,73 ppm/mL. Santoso *et al.* (2019) berhasil mengisolasi 3

isolat bakteri penambat nitrogen dari tanah hutan mangrove Peniti, Kalimantan Barat, yang diidentifikasi sebagai *Azotobacter* sp. 1KSA, *Azospirillum* sp. 2KSA, dan *Pseudomonas* sp. 3KSA.

Pada Hasil pengujian tiga isolat (LG36, LG60, LG66) yang memiliki efisiensi pelarutan fosfat tinggi dan mampu tumbuh pada media NfB, Ashby, Caceres, atau YEMA menunjukkan bahwa ketiga isolat hanya mampu tumbuh pada medium YEMA. Medium tersebut merupakan medium semi selektif untuk isolasi bakteri anggota genus *Rhizobium*. Hasil karakterisasi morfologi sel dari isolat LG36, LG60, dan LG66 menunjukkan bahwa ketiga isolat memiliki bentuk sel basil dan koloni berwarna putih kekuningan (Tabel 2). Sifat Gram dari isolat LG36 dan LG66 adalah Gram-positif, sedangkan isolat LG60 bersifat Gram-negatif. Sifat halofilik ketiga isolat ditunjukkan dengan kemampuannya dalam mentoleransi NaCl sampai 7%. Berdasarkan hasil karakterisasi, isolat LG60 (Tabel 2) dan mengacu pada *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd Edition tahun 2009 mengindikasikan bahwa isolat LG60 merupakan spesies anggota genus *Rhizobium*. Sebaliknya, isolat LG36 dan LG66 belum dapat diidentifikasi dengan baik meskipun kedua isolat tersebut dapat tumbuh dan memiliki warna koloni putih kekuningan pada medium YEMA. Pemeriksaan lanjutan karakteristik isolat bakteri halotoleran LG36 dan LG66 masih sangat diperlukan, khususnya adalah karakter-karakter utama, seperti pembentukan spora, ukuran sel, kebutuhan oksigen, dan produksi asam dari karbohidrat.

Irfan (2014) menyatakan bahwa karakteristik morfologi koloni *Rhizobium* sp. pada medium NA umumnya memiliki bentuk tidak teratur, bulat datar (sirkular), kubah, dan bahkan kerucut, tepian halus, warna putih susu atau kekuningan. Fajrin *et al.* (2017) melaporkan bahwa isolat *Rhizobium* spp. yang diisolasi dari tanah pertanian kedele Edamang menggunakan medium YEMA memiliki karakteristik bentuk koloni bulat, tepian rata atau halus, elevasi cembung, dan warna koloni putih susu. Logan & De Vos (2009) menyatakan bahwa beberapa spesies anggota genus *Bacillus* seperti *B. azotoformans*, *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, dan *B. sphaericus* diketahui dapat menambat N₂ bebas.

SIMPULAN

Isolat bakteri halotoleran yang diteliti berpotensi untuk diaplikasikan sebagai agensia *biofertilizer* untuk meningkatkan produktifitas tanah salin, Sebanyak 11 isolat bakteri halotoleran (>5% NaCl) diketahui mampu melarutkan fosfat dan menambat nitrogen dengan tiga isolat terpilih (LG36, LG60, dan LG66) menunjukkan efisiensi pelarutan fosfat masing-masing 125, 123,72, dan 126,92; dan kemampuan penambatan nitrogennya berturut-turut 38,02 ppm; 28,4 ppm; dan 51,93 ppm. Identitas ketiga isolat terpilih menunjukkan bahwa isolat LG60

merupakan spesies anggota genus *Rhizobium*, sedangkan isolat LG36 dan LG66 belum dapat diidentifikasi pada level genus. Penelitian lanjutan terkait aplikasi isolat bakteri halotoleran pada tanaman disarankan untuk dilakukan, khususnya pada media tanam tanah salin. Demikian pula, karakterisasi isolat bakteri halotoleran terpilih baik secara fenetik maupun filogenetik.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat (LPPM) Universitas Jenderal Soedirman yang telah mendanai penelitian ini melalui skema Penelitian Riset Peningkatan Kompetensi.

DAFTAR REFERENSI

- Agu, K., Nmecha, C., Nwaiwu, M., Ikedinma, J. C., Awah, N. S., Eneite, H. C., Victor-Aduloju A. T., Umeoduagu N. & Onwuatuwegwu, J. T. C. 2017. Isolation and characterization of halotolerant bacteria from Ezzu River Amansea, Awka, Anambra State. *Bioengineering and Bioscience* 5(4), pp. 86-90.
- Astuti, Y. W., Widodo, L. U. & Budisantoso, I. 2013. Pengaruh bakteri pelarut fosfat dan bakteri penambat nitrogen terhadap pertumbuhan tanaman tomat pada tanah masam. *Biosfera: A Scientific Journal* 30(3), pp. 134-142.
- Ayundani, A. 2020. Resistensi bakteri penambat nitrogen nonsimbiotik terhadap logam Fe *Bachelor's thesis*. Universitas Riau, Riau.
- Berg G., Alavi, M., Schmidt, C. S., Zachow, C., Egamberdieva, D., Kamilova, F. & Lugtenberg, B. 2013. Biocontrol and osmoprotection for plants under salinated conditions. In FJ de Bruijn (Ed.). *Molecular Microbial Ecology of The Rhizosphere* (pp. 561-573). Wiley-Blackwell, Hoboken.
- Bibi, F., Ullah, I., Alvi, S. A., Bakhsh, S. A., Yasir, M., Al-Ghamdi, A. A. K. & Azhar, E. I. 2017. Isolation, diversity, and biotechnological potential of rhizo and endophytic bacteria associated with mangrove plants from Saudi Arabia. *Genetics and Molecular Research* 16(2), pp. 1-12.
- Danapriatna, N. 2016. Penjarangan *Azotobacter* sp. dan *Azospirillum* sp. dari ekosistem lahan sawah sebagai sumber isolat pupuk hayati penambat nitrogen. *Jurnal Agrotek Indonesia* 1(2), pp. 115-122.
- Das, A., Srivastava, R., Patil, V. & Tripathi, S. 2018. Studies on the non-symbiotic diazotrophic bacterial population and efficiency of nitrogen fixation in coastal saline soils from Sagar

- Island, West Bengal. In *Water Quality Management* (pp. 299-305). Springer, Singapore.
- Dodd I. C. & Perez-Alfocea, F. 2012. Microbial alleviation of crop salinity. *Journal of Experimental Botany* 6(3), pp. 3415-3428.
- Eris, D. D., Munif, A., Soekarno, B. P. & Purwantara, A. 2017. Penapisan dan potensi bakteri endofit asal tanaman Arecaceae sebagai agens pengendali hayati cendawan *Pestalotiopsis* sp. penyebab penyakit bercak daun pada kelapa kopyor (*Cocos nucifera*). *Menara Perkebunan* 85(1), pp. 19-27.
- Etesami, H. & Beattie, G. A. 2018. Mining halophytes for plant growth-promoting halotolerant bacteria to enhance the salinity tolerance of non-halophytic crops. *Frontiers in Microbiology* 9(148), pp. 1-20.
- Fajrin, V. N. A., Erdiansyah, I. & Damanhuri. 2017. Identification of N-fixing bacteria at the center Edamame cultivation (*Glicine max* (L.) Merr.) in Jember. *Agriprima, Journal of Applied Agricultural Sciences* 1(2), pp. 158-169.
- Fatimah., Annizah, I. N., Alawiyah, D. D., Susetyo, R. D., Surtiningsih, T. & Nurhariyati, T. 2021. Phosphate solubilizing bacteria isolated from Tuban mangrove soil, Indonesia. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 762(1), p. 012007. IOP Publishing.
- Fitriyanti, D., Mubarik, N. R. & Tjahjoleksono, A. 2017. Characterization and identification of phosphate solubilizing bacteria isolate GPC3.7 from limestone mining region. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 58 (1), p. 012016. IOP Publishing.
- Hayat, R., Ali, S., Amara, U., Khalid, R. & Ahmed, I. 2010. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: A review. *Annals of Microbiology* 60, pp. 579-598.
- Irfan, M. 2014. Isolasi dan enumerasi bakteri tanah gambut di perkebunan kelapa sawit PT. Tambang Hijau Kecamatan Tambang Kabupaten Kampar. *Jurnal Agroteknologi* 5(1), pp. 1-8.
- Jones D. L. 1998. Organic acids in the rhizosphere-a critical review. *Plant and Soil* 205(1), pp. 25-44.
- Jumadi, O. 2015. Produksi zat pengatur tumbuh IAA (Indole Acetic Acid) dan kemampuan pelarutan posfat pada isolat bakteri penambat nitrogen asal Kabupaten Takalar. *Jurnal Bionature* 16(1), pp. 43-48.
- Kannapiran, E. & Ramkumar, V. S. 2011. Isolation of phosphate solubilizing bacteria from the sediments of Thondi coast, Palk Strait, Southeast coast of India. *Annals of Biological Research* 2(5), pp. 157-163.
- Karolinoerita, V. dan Annisa, W. 2020. Salinisasi lahan dan permasalahannya di Indonesia. *Jurnal Sumberdaya Lahan* 14(2), pp. 91-99.
- Larasati, E. D., Rukmi, M. I., Kusdiyantini, E., & Ginting, R. C. B. 2018. Isolasi dan identifikasi bakteri pelarut fosfat dari tanah gambut. *Biotoma: Berkala Ilmiah Biologi* 20(1), pp. 1-8.
- Latupapua, H. J. D. & Suliasih, S. 2001. Daya pacu mikroba pelarut fosfat dan penambat nitrogen pada tanaman jagung. *Jurnal Biologi Indonesia* 3(2), pp. 99-107.
- Logan, N. A. & De Vos, P. 2009. Genus I. Bacillus Cohn 1872. In De Vos *et al.* (Eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Second Edition, Vol. 3, The Firmicutes* (pp. 21-127), Springer. New York.
- Lugtenberg B., Malfanova, N., Kamilova, F. & Berg, G. 2013. Plant growth promotion by microbes. In FJ de Bruijn (Ed.). *Molecular Microbial Ecology of The Rhizosphere* (pp. 561-573). Wiley-Blackwell. Hoboken.
- Mohanta, M. K., Nasrin, S., Haque, M. F., Hasi, A. S. & Saha, A. K. 2020. Isolation and characterization of halophilic bacteria from salinity soil of Shatkhira, Bangladesh. *Journal of Advances in Microbiology* 20(5), pp. 67-76.
- Naher, U. A., Othman, R. & Panhwar, Q. A. 2013. Culturable total and beneficial microbial occurrences in long-term nutrient deficit wetland rice soil. *Australian Journal of Crop Science* 7(12), pp. 1848-1853.
- Nisa, N. A. 2018. *Isolasi dan Identifikasi Bakteri Pelarut Fosfat dengan Sekuens 16S rRNA Asal Tanah Pertanian Organik Desa Sumberejo Batu* (Doctoral dissertation). Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim. Malang.
- Oedjijono, Soetarto, E. S., Moeljopawiro, S. & Djatmiko, H. A. 2014. Promising plant growth-promoting rhizobacteria of *Azospirillum* spp. isolated from iron sand soils, Purworejo coast, central Java, Indonesia. *Advances in Applied Science Research* 5(3), pp. 302-308.
- Palimirmo, F. S., Damar, A., & Effendi, H. 2016. Dinamika sebaran bakteri heterotrofik di Teluk Jakarta. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia* 21(1), pp. 26-34.
- Pas, A. A., Sopandie, D., Trikoesoemaningtyas, T. & Santosa, D. A. S. 2015. Aplikasi konsorsium mikrob filosfer dan rizosfer untuk

- meningkatkan pertumbuhan dan hasil tanaman padi application of phyllosphere and rhizosphere microbial consortium to improve rice growth and production. *Jurnal Pangan* 24(1), pp. 15-24.
- Pliego, C., Kamilova, F. & Lugtenberg, B. 2011. Plant growth promoting bacteria: Fundamentals and Exploitation. In Maheshwari D.K. (Ed.). *Bacteria In Agrobiolgy: Crop Ecosystems* (pp. 295-343). Springer, Germany.
- Pramono, H., Mariana, A., Ryandini, D. & Sudiana, E. 2021. Diversity of cellulolytic bacteria isolated from coastal mangrove sediment in Logending Beach, Kebumen, Indonesia. *Biodiversitas* 22(4), pp. 1869-1878.
- Ramadoss, D., Lakkineni, V. K., Bose, P., Ali, S., & Annapurna, K. 2013. Mitigation of salt stress in wheat seedlings by halotolerant bacteria isolated from saline habitats. SpringerPlus, 2 (1), 6.
- Santoso, K., Rahmawati & Rafdinal. 2019. Eksplorasi bakteri penambat nitrogen dari tanah hutan mangrove Sungai Peniti, Kabupaten Mempawah. *Protobiont* 8(1), pp. 52-58
- Smita, M. & Goyal, D. 2017. Isolation and characterization of free-living nitrogen fixing bacteria from alkaline soils. *International Journal of Scientific World* 5(1), pp. 18-22.
- Soni, A., Rokad, R. & Sharma, P. 2013. Screening of efficient halotolerant phosphate solubilizing bacteria and their effect on seed germination under saline conditions. *Journal of Scientific and Innovative Research* 2(5), pp. 932-937.
- Syed-Ab-Rahman, S. F., Carvalhais, L. C., Chua, E., Xiao, Y., Wass, T. J. & Schenk, P. M. 2018. Identification of soil bacterial isolates suppressing different *Phytophthora* spp. and promoting plant growth. *Frontiers in Plant Science* 9, pp. 1502.
- Thohiron, M. & Prasetyo, H. 2017. Pengelolaan lahan dan budidaya tanaman lahan terdampak lumpur marine Sidoarjo. *Indonesian Journal of Environment and Sustainable Development*, 3(1), pp. 19-27.
- Tufail, M. A., Bejarano, A., Shakoor, A., Naeem, A., Arif, M. S., Dar, A. A., Hassan, T. F., Pertot, I. & Puopolo, G. 2021. Can bacterial endophytes be used as a promising bio-inoculant for the mitigation of salinity stress in crop plants? A global meta-analysis of the last decade (2011–2020). *Microorganisms* 9(9), pp. 1861.
- Widawati, S. & Suliasih. 2016. Isolasi, karakterisasi, analisa kimia dan deteksi BAPPT bakteri tanah perakaran padi dari Rambut Siwi, Bali. *Prosiding Seminar Nasional Biologi* ISBN: 978-602-0951-11-9.
- Wijebandara, D. M., Iranie, D., Dasog, G. S., Patil, P. L. & Hebbar, M. 2009. Response of rice to nutrients and biofertilizers under conventional and system of rice intensification methods of cultivation in Tungabhadra command of Karnataka. *Journal Agrica Science* 22 (4), pp. 741-750.
- Zahir, Z. A., Nadeem, S. M., Khan, M. Y., Binyamin, R. & Waqas, M. R. 2019. Role of halotolerant rhizobacteria isolated from halophytes on the growth of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) under salt stress. *FEMS Microbiology Letters* 364(11), pp. 1-8.