

Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Penambat Nitrogen dari Rizosfer Tanaman Nanas di Lereng Gunung Kelud Kediri

Isolation and Characterization of Nitrogen-Fixing Bacteria from Pineapple Rhizosphere on the Slopes of Mount Kelud Kediri

Putri Rosfiana Dewi*, Guntur Trimulyono

Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Negeri Surabaya

*e-mail: putri.rosfiana@gmail.com

Abstrak. Bakteri penambat nitrogen nonsimbiotik dapat diisolasi dari rizosfer berbagai tanaman untuk mendapatkan berbagai jenis bakteri dengan kemampuan menambat nitrogen yang berbeda. Tujuan penelitian ini yaitu mengisolasi dan mengkarakterisasi isolat bakteri rizosfer tanaman nanas (*Ananas comosus*) dari Lereng Gunung Kelud Kediri serta mengetahui kemampuannya dalam menambat nitrogen. Karakterisasi berdasarkan karakteristik morfologi koloni, morfologi sel, sifat Gram, motilitas, dan katalase. Uji kualitatif kemampuan penambatan nitrogen dilakukan menggunakan media *Nitrogen Free Bromothymol Blue* dan uji kuantitatif menggunakan metode *Nessler* dan spektrofotometri. Hasil penelitian memperoleh 4 isolat bakteri penambat nitrogen (isolat P33, B21, B22, dan B23) dari 19 isolat yang diisolasi. Karakteristik morfologi koloni yang ditemukan beragam; karakteristik morfologi sel berbentuk *coccus* dan *bacil* dengan susunan sel *mono* dan *strepto*. Tiga isolat merupakan bakteri Gram positif dan satu isolat lainnya bakteri Gram negatif. Semua isolat bersifat motil dan mampu menghasilkan enzim katalase. Isolat bakteri penambat nitrogen mempunyai kemampuan menghasilkan amonium dengan rata-rata konsentrasi 0,586 ppm (isolat P33); 0,917 ppm (isolat B21); 0,682 ppm (isolat B22); dan 0,577 ppm (isolat B23). Isolat bakteri unggul penambat nitrogen yang berhasil diisolasi diharapkan bisa diteliti lebih lanjut agar dapat diaplikasikan sebagai inokulum pupuk hayati untuk mewujudkan pertanian berkelanjutan.

Kata kunci: *Ananas comosus*; bakteri penambat nitrogen; pertanian berkelanjutan; rizosfer

Abstract. Non-symbiotic nitrogen-fixing bacteria can be isolated from the rhizosphere of various plants to obtain various types of bacteria with different nitrogen-fixing abilities. The purpose of this study was to isolate and characterize the rhizosphere bacterial isolates of pineapple (*Ananas comosus*) from the slopes of Mount Kelud, Kediri, and to determine their ability to fix nitrogen. Characterization based on the characteristics of colony morphology, cell morphology, Gram properties, motility, and catalase. A qualitative test of nitrogen-fixing ability was carried out using *Nitrogen Free Bromothymol Blue* medium and a quantitative test using the *Nessler* method and spectrophotometry. The results of the study obtained 4 isolates of nitrogen-fixing bacteria (P33, B21, B22, and B23 isolates) from 19 isolated isolates. The morphological characteristics of the colonies found varied; morphological characteristics of *coccus* and *bacilli*-shaped cells with *mono* and *strepto* cell arrangements. Three isolates were Gram-positive bacteria and one was Gram-negative bacteria. All isolates were motile and capable of producing the catalase enzyme. Nitrogen-fixing bacteria isolates can produce ammonium with an average concentration of 0.586 ppm (isolate P33); 0.917 ppm (isolate B21); 0.682 ppm (isolate B22); and 0.577 ppm (isolate B23). It is hoped that the superior nitrogen-fixing bacteria isolates can be further studied so that they can be applied as bio-fertilizer inoculums to realize sustainable agriculture.

Keywords: *Ananas comosus*; nitrogen-fixing bacteria; sustainable agriculture; rhizosphere

PENDAHULUAN

Nanas (*Ananas comosus*) merupakan buah dari tanaman hortikultura tropis yang memiliki kandungan gizi seperti vitamin, kalsium, potassium, bromealin, dan serat (Ramli *et al.*, 2018). Banyaknya manfaat nanas bagi tubuh menyebabkan minat nanas menjadi tinggi sehingga diperlukan pengembangan budidaya skala perkebunan (Utami *et al.*, 2020). Indonesia menjadi salah satu negara pengeksport nanas terbesar mencapai US\$ 336,93 juta pada tahun 2021 (Badan Pusat Statistik, 2021). Jawa Timur merupakan salah satu sentra pemasok nanas nasional yang produksinya cenderung meningkat dari tahun ke tahun (Kementan, 2016). Produsen nanas terbesar di Jawa Timur merupakan Kabupaten Kediri, tepatnya di lereng Gunung Kelud (Shabrina *et al.*, 2021). Produksi nanas di lereng

Gunung Kelud Kediri berperan penting dalam menyumbang kebutuhan nanas Jawa Timur yaitu sebesar 72% pada tahun 2020 (Badan Pusat Statistik Kabupaten Kediri, 2021). Peningkatan produktivitas tanaman nanas perlu dilakukan dalam upaya memenuhi kebutuhan nanas (Purnomo dan Purnomo, 2021).

Produktivitas tanaman nanas dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu kualitas tanah pada lahan perkebunan berupa keadaan kimia dan biologi tanah serta serangan patogen (Utami *et al.*, 2020). Pemenuhan kebutuhan unsur hara nitrogen sangat penting untuk mempertahankan tingkat pertumbuhan nanas yang tinggi (Darnaudery *et al.*, 2018). Pemenuhan unsur hara nitrogen pada tanaman berfungsi dalam meningkatkan kualitas dan produksi tanaman untuk pertumbuhan vegetatif tunas, batang, dan daun (Bangun dan Suryanto, 2020). Nitrogen berperan pada tanaman yang memasuki fase vegetatif seperti membantu dalam pembentukan jaringan tanaman, protein, dan asam amino (Margaretha, 2015).

Nitrogen yang ditemukan di udara mencapai 80% dari total nitrogen di bumi, namun karena sifatnya yang stabil dan tidak reaktif mengakibatkan tanaman tidak mampu menggunakannya secara langsung (Hoek *et al.*, 2018). Ketersediaan nitrogen di tanah terbatas disebabkan karena senyawa nitrogen yang mempunyai sifat mudah hilang (*leaching*) sehingga pemanfaatan nitrogen bebas melalui proses penambatan penting dalam menyediakan kebutuhan nitrogen bagi tanaman (Sari dan Prayudyaningsih, 2015). Penambatan nitrogen merupakan proses biokimiawi berupa pengubahan nitrogen bebas menjadi nitrogen tertambat dengan dibantu oleh mikroba tertentu yang terjadi di dalam tanah (Sari dan Prayudyaningsih, 2015).

Ketidakmampuan tanaman untuk menambat nitrogen secara langsung membuat petani harus menambahkan pupuk seperti pupuk urea, ZA (Ammonium sulfate), dan NPK (Nitrogen, Fosfor, Kalium) sebagai sumber nitrogen ke dalam tanah untuk memenuhi kebutuhan nutrisi tanaman (Ristiati, 2015). Petani biasanya memakai pupuk urea anorganik pada lahan pertaniannya untuk memenuhi kebutuhan sumber nitrogen (Asrul dan Aryantha, 2021). Pupuk hayati diketahui dapat mengurangi pemakaian pupuk nitrogen anorganik dengan cara penambatan nitrogen dari udara (Setiawati *et al.*, 2020). Penggunaan bakteri penambat nitrogen nonsimbiotik sebagai pupuk hayati sudah luas (Setiawati *et al.*, 2020). Pemakaian pupuk hayati yang digunakan pada tanaman kina terbukti mampu meningkatkan pertumbuhan tanaman dengan memperbaiki sifat fisik, kimia, dan biologi tanaman (Antralina *et al.*, 2015). Berdasarkan penelitian Manuhutu *et al.* (2014), penggunaan pupuk hayati *Bioboost* pada tanaman padi gogo berpengaruh nyata pada pertumbuhan tanaman seperti pada tinggi tanaman dan luas daun.

Banyak ditemukan spesies bakteri yang memiliki kemampuan dalam menambat nitrogen dari atmosfer, namun masih sedikit bakteri yang mampu mengeksresikan nitrogen dalam bentuk amonium ke lingkungan sehingga sedikit juga ketersediaan nitrogen bagi tanaman (Pratiwi *et al.*, 2022). Bakteri penambat nitrogen nonsimbiotik memiliki kemampuan menambat nitrogen dari udara dan mengubahnya menjadi amonium yang dieksresikan ke tanah sehingga dapat dimanfaatkan oleh tanaman (Hartono dan Jumadi, 2014). Bakteri penambat nitrogen mampu memfiksasi N bebas dibantu dengan enzim nitrogenase (Asrul dan Aryantha, 2021). Bakteri *Azotobacter* dan *Azospirillum* merupakan bakteri penambat nitrogen nonsimbiotik yang membantu memfiksasi nitrogen menjadi NH_3 untuk diserap tanaman (Ward dan Jensen, 2014).

Bakteri penambat nitrogen nonsimbiotik merupakan bakteri pemfiksasi nitrogen tanpa melakukan simbiosis dengan tanaman serta tidak bergantung pada kondisi tanaman (Israwan *et al.*, 2015). Penelitian Ristiati (2015), hasil isolasi dan identifikasi ditemukan bakteri penambat nitrogen nonsimbiotik dari jenis bakteri *Azotobacter* sp. yang dapat membantu meningkatkan kesuburan lahan pertanian. Penelitian Roni dan Lindawati (2018), diperoleh isolat bakteri penambat nitrogen nonsimbiotik dari genus *Azotobacter* yang didapat dari tanah lahan Sistem Tiga Strata (STS). Isolasi bakteri nonsimbiotik dari pertanaman jagung dan padi diperoleh 9 isolat yang memiliki kemampuan mengeksresikan amonium yang tinggi (Hartono dan Jumadi, 2014). Penelitian isolasi dan identifikasi bakteri penambat nitrogen yang didapat dari Cagar Biosfer GSK-BB diperoleh 14 isolat bakteri yang teridentifikasi dari genus *Azospirillum*, *Azotobacter*, dan *Clostridium pasteurianum* (Kaburuan *et al.*, 2014). Penelitian sejenis juga dilakukan oleh Asrul dan Aryantha (2021), diperoleh 13 bakteri nonsimbiotik mampu menambat nitrogen yang diisolasi dari perkebunan kelapa sawit. Penelitian Utami *et al.* (2020), terkait dengan keanekaragaman dan kelimpahan mikroba rizosfer tanaman nanas sudah pernah dilakukan namun belum sampai pengujian bakteri penambat nitrogen.

Berbagai penelitian terkait dengan isolasi dan karakterisasi bakteri penambat nitrogen telah banyak dilakukan pada beberapa area pertanaman dari suatu tanaman, namun penelitian pada area

tanaman nanas belum dilakukan. Isolasi dan karakterisasi bakteri penambat nitrogen dari rizosfer tanaman nanas penting dilakukan untuk memperoleh bakteri yang unggul dalam menambat nitrogen dan lebih lanjut dapat diteliti terkait potensinya sebagai inokulum pupuk hayati atau *biofertilizer* yang kedepannya diharapkan dapat mewujudkan pertanian yang berkelanjutan. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mendapatkan isolat bakteri penambat nitrogen nonsimbiotik yang diisolasi dari rizosfer tanaman nanas dan mengetahui karakteristik serta kemampuannya dalam menambatkan nitrogen.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan pada bulan Januari sampai Maret 2023. Sampel diambil pada dua lahan tanaman nanas di lereng Gunung Kelud, Kecamatan Ngancar, Kabupaten Kediri tepatnya di Desa Pandantoyo dan Babadan. Isolasi dan karakterisasi bakteri penambat nitrogen dari rizosfer tanaman nanas dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Universitas Negeri Surabaya sedangkan uji kemampuan penambatan nitrogen dilakukan di Laboratorium Genetika dan Biologi Molekular, Universitas Negeri Surabaya.

Alat yang digunakan untuk pengujian kemampuan penambatan nitrogen dengan indikator hasil rata-rata konsentration amonium yang dihasilkan oleh isolat menggunakan spektrofotometer UV-Vis 1900. Bahan yang digunakan berupa sampel tanah rizosfer tanaman nanas; larutan NaCl 0,9% untuk pengenceran; media *Nutrient Agar* (NA) untuk isolasi bakteri, karakterisasi morfologi koloni, dan uji motilitas; media *Nutrient Broth* (NB) dan *Nitrogen Free Bromothymol blue* (NFB) untuk uji kualitatif isolat bakteri yang mempunyai kemampuan dalam menambat nitrogen; serta uji kuantitatif menggunakan media *Pepton Broth*, reagen *nessler*, dan garam *siegnette* untuk mengetahui rata-rata konsentration amonium yang dihasilkan oleh isolat. Bahan lain seperti reagen pewarnaan Gram (kristal violet, lugol, alkohol 96%, dan safranin) untuk karakterisasi morfologi sel dan sifat Gram; hidrogen peroksida 3% untuk uji katalase.

Penelitian diawali dengan pengambilan sampel yang dilakukan pada rizosfer tanaman nanas (*Ananas comosus*) varietas *Queen* fase vegetatif (umur 2 dan 4 bulan) yang diambil pada lahan yang telah ditentukan serta dipilih secara random. Secara geografis sampel yang diambil dari lahan nanas di Desa Pandantoyo terletak pada koordinat $-7^{\circ}56'32,20339''S$ $112^{\circ}11'8,43794''E$ dengan ketinggian 411 mdpl sedangkan di Desa Babadan pada koordinat $-7^{\circ}54'52,19609''S$ $112^{\circ}12'28,8675''E$ dengan ketinggian 469 mdpl. Pengambilan sampel didapatkan dengan metode diagonal sampling. Setiap lahan memiliki rata-rata luas ± 1 ha dan terdapat 5 titik untuk pengambilan sampel. Lokasi titik pengambilan sampel dibersihkan dari serasah tanaman dan digali hingga kedalaman 20 cm. Masing-masing titik diambil 100 gram tanah, lalu tanah dari kelima titik tersebut dikompositkan dan disimpan pada *cool box*.

Bakteri diisolasi berasal dari satu gram tanah rizosfer yang diencerkan dengan sistem pengenceran bertingkat sampai tingkat 10^{-5} menggunakan larutan NaCl fisiologis 9 ml. Masing-masing pengenceran diambil 1 ml dan ditambahkan media NA menggunakan metode *pour plate* kemudian diinkubasi pada suhu $30^{\circ}C$ selama 24 jam (Asrul dan Aryantha, 2021). Bakteri yang telah tumbuh selanjutnya dimurnikan menggunakan teknik *streak plate* (Utami *et al.*, 2020). Isolat bakteri dikarakterisasi awal dengan melihat karakteristik morfologi koloninya (karakteristik optik, karakteristik permukaan, warna, ukuran, bentuk, elevasi, dan bentuk tepian) (Kaburuan *et al.*, 2014). Selanjutnya dikarakterisasi lanjut berdasarkan karakteristik morfologi sel (bentuk dan susunan) dan sifat Gram dengan teknik pewarnaan Gram (Kaburuan *et al.*, 2014); uji motilitas dengan teknik menusukkan jarum ose pada media NA semi solid 0,7% (Apriliya *et al.*, 2020); serta uji katalase menggunakan reagen hidrogen peroksida (H_2O_2) 3% (Lubis *et al.*, 2020).

Uji kemampuan penambatan nitrogen secara kualitatif dilakukan dengan menumbuhkan isolat pada media NB selama 24 jam untuk memperbanyak bakteri. Selanjutnya, 1 ml isolat bakteri dari media NB diinokulasikan pada 9 ml media NFB semi solid untuk uji penambat nitrogen. Isolat diinkubasi selama 10 hari pada suhu ruang ($30^{\circ}C$) (Fatimah *et al.*, 2022). Isolat bakteri yang mampu menambat nitrogen diketahui apabila terjadi perubahan warna dari hijau menjadi biru pada media NFB semi solid (Baldani *et al.*, 2014).

Kurva standar NH_4Cl digunakan dalam perhitungan pada uji kuantitatif. Kurva standar dibuat dari beberapa konsentration (0,125 ppm; 0,25 ppm; 0,5 ppm; dan 0,75 ppm). Setiap larutan NH_4Cl bervolume 50 ml ditambahkan dengan 1 ml reagen *nessler*. Nilai absorbansi yang diperoleh digunakan untuk menentukan persamaan linier kurva standar NH_4Cl dengan bentuk sebagai berikut (Gordon dan Weber, 1951).

$$y = mx + n$$

(1)

Keterangan

y = absorbansi

m = koefisien regresi

x = amonium (ppm)

n = interstep

Pengukuran kemampuan penambatan nitrogen secara kuantitatif dilakukan dengan mengukur konsentrasi amonium yang dihasilkan isolat. Bakteri ditumbuhkan pada media *pepton broth* 10 ml dan diinkubasi selama tiga hari. Bakteri kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 4.000 rpm selama 10 menit, diambil supernatannya, diberikan 1-2 tetes garam *siegnette* dan 0,5 ml *nessler*. Selanjutnya, diuji menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 420 nm. Nilai hasil absorbansi spektrofotometer di konversi menjadi ppm dengan menggunakan persamaan kurva standar (Asrul dan Aryantha, 2021).

Data karakteristik isolat dianalisis secara deskriptif sedangkan data nilai penambatan nitrogen dianalisis menggunakan deskriptif kuantitatif. Data karakteristik bakteri penambat nitrogen digunakan untuk mengetahui hubungan antara karakteristik bakteri dengan kemampuan dalam menambat nitrogen yang dimilikinya. Untuk data nilai penambatan nitrogen dideskripsikan dan dibandingkan untuk mengetahui isolat yang paling tinggi dalam menambat nitrogen sehingga isolat tersebut dapat dikatakan berpotensi dalam menambat nitrogen.

HASIL

Hasil isolasi bakteri rizosfer tanaman nanas diperoleh sebanyak 19 isolat bakteri dengan karakteristik morfologi koloni yang beragam (Tabel 1) yang ditandai dengan kode isolat P21, P22, P23, P24, P31, P32, P33, P34, P41, P42, P43, P51, P52, B21, B22, B23, B31, B32, dan B51. Kode isolat P merupakan isolat yang berasal dari Desa Pandatoyo sedangkan kode isolat B diperoleh dari Desa Babadan.

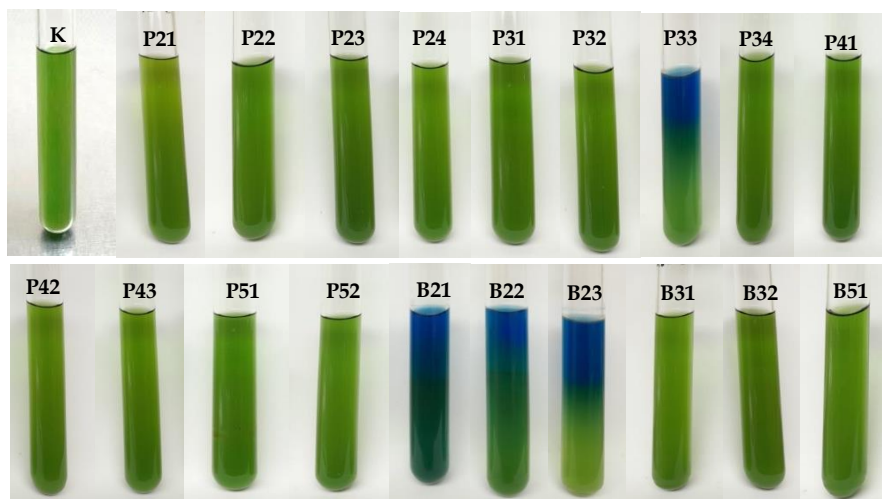
Tabel 1. Karakteristik morfologi koloni 19 isolat bakteri rizosfer tanaman nanas

Kode Isolat*	Optik	Permukaan	Warna	Ukuran (cm)	Bentuk	Elevasi	Bentuk Tepi
P21	<i>Opaque</i>	Kasar	Putih	0,5	<i>Filamentous</i>	<i>Raised</i>	<i>Filamentous</i>
P22	<i>Opaque</i>	Halus	Putih	0,6	<i>Irregular</i>	<i>Flat</i>	<i>Undulate</i>
P23	<i>Translucent</i>	Kasar	Putih	1,75	<i>Irregular</i>	<i>Flat</i>	<i>Erose</i>
P24	<i>Opaque</i>	Kasar	Putih	0,3	<i>Circular</i>	<i>Raised</i>	<i>Entire</i>
P31	<i>Opaque</i>	Halus mengkilap	Putih	0,1	<i>Circular</i>	<i>Convex</i>	<i>Entire</i>
P32	<i>Opaque</i>	Halus	Putih	6	<i>Irregular</i>	<i>Flat</i>	<i>Irregular</i>
P33	<i>Opaque</i>	Kasar	Putih	0,3	<i>Irregular</i>	<i>Flat</i>	<i>Irregular</i>
P34	<i>Opaque</i>	Halus	Putih	0,3	<i>Circular</i>	<i>Convex</i>	<i>Entire</i>
P41	<i>Opaque</i>	Halus mengkilap	Putih	0,2	<i>Circular</i>	<i>Raised</i>	<i>Erose</i>
P42	<i>Opaque</i>	Berkerut	Putih	6,5	<i>Irregular</i>	<i>Flat</i>	<i>Undulate</i>
P43	<i>Opaque</i>	Halus	Putih	1	<i>Irregular</i>	<i>Flat</i>	<i>Undulate</i>
P51	<i>Opaque</i>	Halus mengkilap	Putih	0,5	<i>Circular</i>	<i>Raised</i>	<i>Entire</i>
P52	<i>Opaque</i>	Halus mengkilap	Putih	0,6	<i>Circular</i>	<i>Convex</i>	<i>Entire</i>
B21	<i>Opaque</i>	Berkerut	Putih	1,5	<i>Irregular</i>	<i>Flat</i>	<i>Irregular</i>
B22	<i>Opaque</i>	Kasar	Putih	0,6	<i>Irregular</i>	<i>Raised</i>	<i>Undulate</i>
B23	<i>Opaque</i>	Halus	Putih	1,25	<i>Irregular</i>	<i>Raised</i>	<i>Undulate</i>
B31	<i>Opaque</i>	Berkerut	Putih	2	<i>Irregular</i>	<i>Raised</i>	<i>Irregular</i>
B32	<i>Opaque</i>	Kasar	Putih	0,3	<i>Circular</i>	<i>Raised</i>	<i>Erose</i>
B51	<i>Opaque</i>	Halus mengkilap	Putih	0,3	<i>Circular</i>	<i>Flat</i>	<i>Entire</i>

Keterangan: *)P = sampel dari Desa Pandatoyo, B = sampel dari Desa Babadan

Kesembilan belas isolat bakteri rizosfer tanaman nanas diuji secara kualitatif kemampuan penambatan nitrogennya. Empat dari sembilan belas isolat positif mempunyai kemampuan dalam menambat nitrogen yaitu kode isolat P33, B21, B22, dan B23 (Gambar 1). Perubahan warna pada media *Nitrogen Free Bromothymol Blue* (NFB) yang mulanya hijau menjadi biru menandakan isolat dapat menambat nitrogen, hal tersebut didasarkan pada sifat indikator *bromothymol blue* yang akan merubah warna menjadi biru jika terdapat aktivitas penambatan nitrogen oleh enzim nitrogenase (Baldani *et al.*, 2014). Terdapat perubahan warna media NFB pada isolat yang memiliki kemampuan

menambat nitrogen. Kode K merupakan kontrol pada pengujian ini yang berisi media NFB tanpa isolat bakteri (Gambar 1).



Gambar 1. Uji kualitatif kemampuan isolat bakteri dalam menambat nitrogen (K; P21; P22; P23; P24; P31; P32; P33; P34; P41; P42; P43; P51; P52; B21; B22; B23; B31; B32; dan B51 = kode isolat).

Perubahan warna media dari hijau menjadi biru diketahui dari sifat indikator *bromothymol blue* yang terkandung dalam media NFB. Sifat indikator *bromothymol blue* mengubah warna media pada pH yang lebih tinggi akibat adanya aktifitas enzim nitrogenase pada bakteri yang sedang menambat nitrogen (Baldani *et al.*, 2014). Peningkatan pH juga terjadi pada isolat bakteri yang mempunyai kemampuan menambat nitrogen, hal ini sejalan dengan hasil uji kualitatif yang telah dilakukan (Gambar 1). Peningkatan pH terjadi karena bakteri menghasilkan amonium yang mana senyawa tersebut dapat mempengaruhi pH lingkungan menjadi lebih basa. Data peningkatan pH pada media dapat dilihat pada Tabel 2.

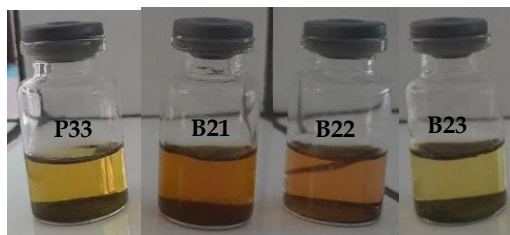
Tabel 2. Perubahan pH media NFB

Kode Isolat	pH Awal	pH Inkubasi 10 hari
P21	6,6	6,6
P22	6,6	6,6
P23	6,6	6,6
P24	6,6	6,6
P31	6,6	6,6
P32	6,6	6,6
P33	6,6	8
P34	6,6	6,6
P41	6,6	6,6
P42	6,6	6,6
P43	6,6	6,6
P51	6,6	6,6
P52	6,6	6,6
B21	6,6	8
B22	6,6	8
B23	6,6	8
B31	6,6	6,6
B32	6,6	6,6
B51	6,6	6,6

Keterangan: *)Isolat yang dicetak tebal merupakan isolat yang mengalami peningkatan pH

Empat isolat bakteri yang mampu menambat nitrogen (isolat P33, isolat B21, isolat B22, dan isolat B23) dilakukan uji penambatan nitrogen secara kuantitatif untuk mengetahui kemampuan penambatan nitrogennya berdasarkan hasil konsentrasi amonium yang dihasilkan oleh isolat tersebut. Pengujian kuantitatif penambatan nitrogen diawali dengan pembuatan kurva standar NH_4Cl yang diperoleh persamaan: $y = 4,0852x + 0,2529$. Nilai x pada persamaan merupakan konsentrasi amonium yang sejajar dengan nilai y yaitu nilai absorbansinya. Isolat bakteri direaksikan dengan reagen *nessler* yang mengakibatkan perubahan warna yang berbeda dari kuning sampai kecoklatan yang

menunjukkan bahwa terdapat amonium yang terlarut pada supernatan isolat ditunjukkan pada Gambar 2.



Gambar 2. Isolat bakteri setelah diberikan reagen *nessler* (P33; B21; B22; dan B23 = kode isolat).

Sampel yang telah dilakukan pembacaan absorbansi menggunakan spektrofotometer akan didapatkan nilai konsentrasi amoniumnya. Nilai absorbansi yang diperoleh pada masing-masing sampel isolat bakteri, digunakan untuk mengetahui konsentrasi amoniumnya. Berdasarkan Tabel 3, diketahui bahwa isolat bakteri penambat nitrogen dari rizosfer tanaman nanas mempunyai kemampuan dalam menambatkan nitrogen yang berbeda-beda. Isolat B21 memiliki kemampuan tertinggi dalam menambat nitrogen yang dibuktikan dengan nilai rata-rata konsentrasi amonium yang tinggi sebesar 0,917 ppm. Adapun isolat bakteri yang lain mempunyai kemampuan yang hampir sama antara satu dengan yang lain. Secara berurutan rata-rata konsentrasi amonium dari yang tertinggi ke terendah sebesar 0,917 ppm (isolat B21); 0,682 ppm (isolat B22); 0,586 ppm (isolat P33); dan 0,577 ppm (isolat B23) (Tabel 3). Konsentrasi amonium tersebut sejalan dengan intensitas warna yang dihasilkan pada saat dilakukan reaksi, semakin tinggi intensitas warna maka semakin tinggi pula konsentrasi amoniumnya.

Tabel 3. Kemampuan isolat bakteri penambat nitrogen nonsimbiotik dalam menambat nitrogen secara kuantitatif

Kode Isolat	Rata-Rata Konsentrasi Amonium Terlarut (ppm)
P33	0,586
B21	0,917
B22	0,682
B23	0,577

Empat isolat terpilih bakteri penambat nitrogen dikarakterisasi melalui uji pewarnaan Gram dan diketahui morfologi sel yang ditemukan memiliki dua bentuk, yaitu *coccus* dan *bacil*. Bentuk sel *coccus* memiliki susunan *mono*, sedangkan bentuk sel *bacil* memiliki susunan *mono* dan *strepto*. Uji motilitas dan uji katalase menghasilkan hasil yang sama untuk semua isolat, yaitu bakteri seluruhnya motil dan menghasilkan enzim katalase (Tabel 4).

Tabel 4. Karakteristik isolat bakteri penambat nitrogen nonsimbiotik pada rizosfer tanaman nanas

Pengamatan	Karakteristik	Kode Isolat*			
		P33	B21	B22	B23
Mikroskopis	Bentuk Sel	<i>Coccus</i>	<i>Bacil</i>	<i>Bacil</i>	<i>Bacil</i>
	Susunan Sel	<i>Mono</i>	<i>Mono</i>	<i>Strepto</i>	<i>Strepto</i>
	Sifat Gram	-	+	+	+
Fisiologi	Motilitas	+	+	+	+
Biokimia	Katalase	+	+	+	+

Keterangan: *) P = sampel dari Desa Pandantoyo, B = sampel dari Desa Babadan, + = bakteri positif/bakteri motil/mampu membentuk, - = bakteri negatif/bakteri tidak motil/tidak membentuk.

PEMBAHASAN

Bakteri rizosfer merupakan bakteri tanah yang hidup di sekitar perakaran serta berperan dalam menyediakan nutrisi bagi tanaman (Singh, 2013). Menurut Susilowati *et al.* (2016), bakteri rizosfer juga dapat berperan sebagai bakteri pemfiksasi nitrogen yang berguna selama proses pertumbuhan tanaman. Bakteri penambat nitrogen nonsimbiotik mampu mengubah nitrogen bebas menjadi amonium tanpa bergantung pada organisme lain (Danapriatna, 2010). Pada penelitian ini dilakukan isolasi bakteri rizosfer tanaman nanas yang diperoleh dari lereng Gunung Kelud Kediri. Teknik isolasi dipakai untuk mendapatkan isolat murni dari suatu sampel sehingga diketahui potensinya (Lestari dan Hartati, 2017).

Isolasi bakteri diawali proses pengenceran sampel tanah secara bertingkat sampai dengan pengenceran 10^{-5} menggunakan NaCl 0,9% lalu ditanam pada media NA dan diinkubasi selama 24 jam. Pengenceran bertujuan untuk memperoleh isolat bakteri yang tidak terlalu banyak dan dapat mewakili seluruh jenis bakteri pada sampel sehingga memudahkan dalam pengamatan (Marzuki *et al.*, 2014). Sampel bakteri yang diencerkan menggunakan NaCl 0,9% akan terjaga keseimbangan ion dan tekanan osmotik bakterinya serta dapat menghambat pertumbuhan bakteri yang sangat cepat (Tivani, 2018). Media NA merupakan media yang sangat umum digunakan untuk mengisolasi bakteri (Dewi *et al.*, 2017).

Sembilan belas isolat bakteri berhasil diisolasi dari rizosfer tanaman nanas di lereng Gunung Kelud Kediri. Kesembilan belas isolat yang diperoleh dibedakan berdasarkan karakteristik morfologi koloni seperti, karakteristik optik, karakteristik permukaan, warna, bentuk, ukuran, elevasi, dan bentuk tepian koloni, yang diberi kode isolat sebagai berikut: P21, P22, P23, P24, P31, P32, P33, P34, P41, P42, P43, P51, P52, B21, B22, B23, B31, B32, dan B51 (Tabel 1). Karakterisasi morfologi koloni secara umum digunakan untuk identifikasi bakteri awal dengan mengkarakterisasi morfologi koloni meliputi bentuk, warna, ukuran, dan bentuk tepi (Dewi *et al.*, 2017). Karakteristik bakteri rizosfer tanaman nanas yang didapat cukup beragam. Untuk karakteristik optik didominasi dengan ciri *opaque* dengan karakteristik permukaan yang terbagi menjadi tiga macam (kasar, halus, dan berkerut) serta seluruh isolat berwarna putih. Bentuk koloni dari 19 isolat yang ditemukan berbentuk *circular* dan *irregular* dengan ukuran, elevasi, dan bentuk tepi yang beragam (Tabel 1). Sejalan dengan penelitian Islam *et al.* (2019), 18 isolat bakteri yang telah diisolasi dari tanah kebun kelapa sawit memiliki karakteristik morfologi koloni yang beragam yang diuji kemampuan penambatan nitrogennya.

Hasil uji bakteri penambat nitrogen secara kualitatif didapatkan bahwa empat isolat dengan kode isolat P33, B21, B22, dan B23 positif mampu menambat nitrogen yang ditandai dengan adanya perubahan warna media NFB semi padat yang mulanya hijau menjadi biru (Gambar 1) serta terjadi perubahan pH (Tabel 2). Bakteri penambat nitrogen mengubah nitrogen bebas menjadi bentuk ammonia (NH_3) dan amonium (NH_4^+) sehingga dapat diserap oleh tanaman (Santoso *et al.*, 2019). Uji dilakukan dengan menumbuhkan isolat pada media NFB (*Nitrogen Free Bromothymol blue*) semi padat dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 10 hari (Fatimah *et al.*, 2022). Fatimah *et al.* (2022), juga menjelaskan bahwa hasil positif diindikasikan oleh perubahan warna pada media NFB yang mulanya hijau menjadi biru. Media NFB merupakan media selektif dengan komposisi bahan yang tidak mengandung unsur nitrogen sehingga isolat bakteri tumbuh dengan menambat nitrogen bebas (Pratiwi *et al.*, 2020). Komposisi di dalam media NFB semi padat mampu menyediakan kebutuhan nutrisi bakteri penambat nitrogen nonsimbiotik (Nurosid *et al.*, (2008). Hal tersebut didukung oleh Huslina dan Harahap (2019), kandungan asam malat pada media NFB sebagai sumber energi alternatif, sodium molibdat (NaMoO_4) berguna meningkatkan aktivitas penambatan nitrogen, juga terdapat sodium klorida (NaCl) sebagai penyeimbang tekanan osmotik media.

Perubahan warna biru pada media NFB semi padat terjadi karena adanya aktivitas nitrogenase yang menyebabkan pH lebih tinggi atau basa (Fatimah *et al.*, 2022). Hal tersebut didukung oleh penelitian Nurosid (2008), perubahan warna biru media NFB semi padat terjadi karena adanya aktivitas nitrogenase yang dilakukan oleh bakteri penambat nitrogen nonsimbiotik. Sifat indikator *bromothymol blue* yang ditambahkan pada media NFB akan berubah menjadi biru pada pH basa (Fatimah *et al.*, 2022). pH awal media NFB semi padat sebelum diinokulasikan bakteri sebesar 6,6 dan naik menjadi 8 setelah diinokulasikan isolat dan diinkubasi selama 10 hari (Tabel 2). Penambatan nitrogen bebas oleh bakteri yang terjadi pada media NFB semi padat menyebabkan kenaikan pH media lebih dari 1,0 unit setelah beberapa hari inkubasi disebabkan bakteri menghasilkan senyawa nitrogen (NH_4^+) yang mempengaruhi pH lingkungan (Saraswati *et al.*, 2007). Indikator warna *bromothymol blue* pada lingkungan pH netral memiliki warna hijau dan berwarna biru pada pH basa atau alkalin (Sukweenadhi *et al.*, 2019). Berdasarkan reaksi kimia senyawa amonia (NH_3) hasil metabolisme bakteri dilepaskan ke lingkungan dan bereaksi dengan air (H_2O) membentuk amonium (NH_4^+) dan ion hidroksida (OH^-), ion hidroksida (OH^-) ini dapat menyebabkan pH lingkungan menjadi basa (Haruta *et al.*, 2004).

Pada penelitian ini diperoleh 4 isolat bakteri penambat nitrogen nonsimbiotik dari rizosfer tanaman nanas. Hartono dan Jumadi (2014), melakukan seleksi dan karakterisasi bakteri penambat nitrogen nonsimbiotik menggunakan media NFB semi padat pada pertanaman jagung dan mendapatkan 20 isolat bakteri penambat nitrogen. Penelitian lain oleh Islam *et al.* (2019), diperoleh 9 isolat penambat bakteri nonsimbiotik dari tanah kebun kelapa sawit yang berhasil diuji menggunakan

media NFB semi padat. Sukweenadhi *et al.* (2019), juga memperoleh 10 isolat bakteri penambat nitrogen dari tanah padi berdasarkan uji dengan media NFB semi padat.

Empat isolat bakteri penambat nitrogen nonsimbiotik kemudian dilakukan uji penambatan nitrogen secara kuantitatif. Hasil uji kuantitatif menggunakan metode *nessler* dan spektrofotometri. Uji kuantitatif penambatan nitrogen diawali dengan menumbuhkan empat isolat (isolat P33, B21, B22, dan B23) pada media *peptone broth*. Media *pepton broth* mengandung sumber karbon berupa dekstrosa (l-glukosa) yang cocok sebagai sumber karbon dalam mengoptimasi aktivitas maksimum enzim nitrogenase (Asrul dan Aryantha, 2021). Bakteri penambat nitrogen mampu menambat nitrogen karena adanya aktivitas enzim nitrogenase yang bekerja (Ludden, 2001). Enzim nitrogenase merupakan enzim yang mereduksi nitrogen bebas menjadi amonia (Iwata *et al.*, 2012). Pengujian dilakukan dengan mereaksikan supernatan isolat dengan reagen *nessler* dan garam *siegnette*. Senyawa hasil penambatan nitrogen berupa amonia yang dilepaskan oleh bakteri penambat nitrogen terkandung dalam supernatan. Supernatan mengandung senyawa-senyawa dan metabolit sekunder dari bakteri (Kaewhomphunuch, 2022).

Metode *nessler* digunakan untuk menentukan kandungan amonia pada suatu sampel dengan menghasilkan perubahan warna sampel menjadi kuning kecoklatan serta konsentrasinya diukur menggunakan spektrofotometer yang diukur pada panjang gelombang 400-500 nm (Rahman, 2019). Isolat bakteri penambat nitrogen nonsimbiotik dari rizosfer tanaman nanas mengalami perubahan warna yang berbeda dari kuning sampai dengan kecoklatan setelah direaksikan dengan reagen *nessler* (Gambar 2). Reaksi larutan basa (amonium) dengan reagen *nessler* (K_2HgI_4) membentuk NH_2HgI_3 yang menyebabkan perubahan warna kuning sampai coklat (Rahman, 2019). Pada penelitian ini, konsentrasi amonium diukur dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 420 nm sesuai dengan penelitian Asrul dan Aryantha (2021).

Bakteri penambat nitrogen mampu menambat nitrogen bebas dan mengubahnya menjadi ammonia (NH_3) dengan melibatkan enzim nitrogenase (Zulfarina *et al.*, 2017). Selanjutnya hasil fiksasi amonia sangat mudah terkomposisi menjadi ion amonium (NH_4^+) jika berada dalam air (Riwayati dan Ratnawati, 2010). Didukung oleh Hartono dan Jumadi (2014), bakteri penambat nitrogen mampu menambat N_2 dan mengubahnya menjadi amonium akan terakumulasi dalam sel yang kemudian dieksresikan ke luar untuk dimanfaatkan tanaman. Amonium yang terbentuk dieksresikan ke luar sel melalui mekanisme difusi sederhana. Eksresi amonium terjadi akibat terjadinya penghambatan sintesis dan aktivitas enzim yang terlibat pada asimilasi amonia sehingga tidak terasimilasikan lebih lanjut dan terakumulasi dalam sel. Hal tersebut menyebabkan amonia terakumulasi di dalam sel dan tidak menginaktivasi enzim nitrogenase serta akan mengganggu metabolisme sel. Oleh karena asimilasi amonia yang tidak digunakan dalam sel menjadi konsentrasinya tinggi dibandingkan di luar sel menyebabkan amonia berdifusi secara pasif keluar melalui membran sel (Hartono, 2014).

Rata-rata konsentrasi amonium pada 4 isolat menunjukkan hasil berbeda-beda (Tabel 3), secara berurutan dari yang tertinggi ke terendah yaitu, isolat B21 sebesar 0,917 ppm; isolat B22 sebesar 0,682 ppm; isolat P33 sebesar 0,586 ppm; dan isolat B23 sebesar 0,577 ppm. Perolehan konsentrasi amonium dari bakteri penambat nitrogen yang diperoleh jauh lebih tinggi dibandingkan dengan hasil penelitian Asrul dan Aryantha (2021), yang mengisolasi bakteri penambat nitrogen dari perkebunan kelapa sawit yaitu berkisar antara 0,12-0,27 ppm. Berbeda dengan penelitian Ummah *et al.* (2019), isolat bakteri penambat nitrogen yang diperolehnya mampu menghasilkan amonium sebesar 1,842 ppm sampai 2,242 ppm. Kepekatan atau insensitas warna hasil reaksi dengan reagen *nessler* berbanding lurus dengan konsentrasi amonium. Semakin tinggi insensitas warna (dari kuning ke coklat) maka semakin tinggi pula konsentrasi amoniumnya (Rahman, 2019). Bakteri penambat nitrogen nonsimbiotik menambat nitrogen bebas dan mengubahnya menjadi amonium untuk kebutuhan selnya, namun bakteri juga mengeluarkan sebagian amonium yang dihasilkan untuk menjaga keseimbangan pH dan osmosis dalam sel bakteri serta menjaga konsentrasi amonium dalam sel tidak terlalu tinggi yang mana dapat menyebabkan kerusakan pada sel (Khammas *et al.*, 2019).

Konsentrasi amonium yang diperoleh dari empat isolat berbeda-beda, hal ini diduga dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti, aktivitas enzim nitrogenase dan kebutuhan energi. Menurut Setiawati (2008), aktivitas enzim nitrogenase yang tinggi pada bakteri penambat nitrogen akan meningkatkan penambatan nitrogen bebas yang kemudian akan direduksi menjadi amonia. Unsur amonia kemudian direduksi menjadi amonium yang berguna untuk membentuk protein bagi tanaman dan biomassa bakteri (Setiawati, 2008). Konsentrasi oksigen merupakan salah satu yang mempengaruhi kerja enzim nitrogenase dimana penambatan nitrogen akan turun jika konsentrasi oksigen tinggi dan sebaliknya (Ohyama *et al.*, 2014). Danapriatna (2010), juga menyatakan bahwa

enzim nitrogenase menjadi tidak aktif pada tekanan oksigen tinggi, sehingga pada beberapa bakteri penambat nitrogen nonsimbiotik melakukan proteksi enzim nitrogenase terhadap oksigen. Pada bakteri nonsimbiotik anaerob, oksigen tidak menjadi masalah memang bakteri tersebut tidak membutuhkan oksigen serta pada lingkungannya konsentrasi oksigen cenderung rendah (Danapriatna, 2010). Berbeda dengan bakteri nonsimbiotik aerob, kebutuhan oksigen banyak dan hal ini dapat menghambat bahkan menghentikan kerja enzim nitrogenase.

Pada bakteri *Azotobacter*, konsumsi oksigen dalam jumlah banyak digunakan untuk respirasi namun disisi lain bakteri juga melakukan perlindungan enzim nitrogenase terhadap oksigen dengan adanya kapsul lendir yang tebal agar oksigen masuk dan merusak kompleks enzim nitrogenase (Danapriatna, 2010). Pernyataan tersebut didukung oleh Sabra *et al.* (2000), terdapat kapsul alginate pada permukaan *Azotobacter* yang berguna untuk melindungi nitrogenase dari oksigen. Mekanisme penambatan nitrogen *Azotobacter* juga dilakukan secara khusus dengan cara mempertahankan konsentrasi oksigen yang rendah dalam sel (Castillo *et al.*, 2020). Berbeda dengan *Cynobacteria*, proteksi dilakukan dengan pemisahan oksigen dari enzim nitrogenase. Sebagian *Cynobacteria* melakukan pemisahan oksigen melalui heterokis, yaitu sel yang memiliki dinding tebal untuk melindungi kompleks enzim nitrogenase. *Cynobacteria* yang tidak mempunyai heterokis melakukan pemisahan oksigen secara temporal antara proses fiksasi N₂ dan produksi O₂ yaitu proses fiksasi yang dilakukan dalam kondisi gelap karena tidak adanya produksi O₂ (Sapalina *et al.*, 2022).

Faktor lain yang mempengaruhi perbedaan konsentrasi amonium pada setiap isolat yaitu sumber energi yang didapatkan oleh bakteri. Bakteri nonsimbiotik melakukan aktivitas hidupnya dengan memperoleh sumber energi serta karbon dari lingkungan yang bervariasi dan kompleks (Sapalina *et al.*, 2022). Penggunaan glukosa sebagai sumber karbon dapat berpengaruh pada hasil akumulasi amonium yang tinggi dibandingkan dengan sumber karbon lain (Iwata *et al.*, 2012). Setiap organisme mempunyai kemampuan dalam menghasilkan ATP yang berbeda-beda sehingga jumlah hasil tambatan nitrogen dari udara pun juga berbeda (Danapriatna, 2010).

Empat isolat bakteri penambat nitrogen nonsimbiotik dikarakterisasi lanjut, yaitu bentuk sel, susunan sel, sifat Gram, motilitas, dan katalase (Tabel 4). Karakteristik morfologi sel dan sifat Gram diketahui dengan uji pewarnaan Gram pada bakteri. Bakteri Gram positif akan berwarna ungu pada saat pengamatan setelah dilakukan pengecatan. Hal tersebut diakibatkan karena dinding sel bakteri Gram positif memiliki dinding peptidoglikan yang lebih tebal daripada bakteri Gram negatif, yang menyebabkan kristal violet tertahan pada dinding meskipun sudah dilakukan dekolonisasi menggunakan alkohol (Hamidah *et al.*, 2019). Menurut Nuryady *et al.* (2013), warna ungu dari kristal violet tertahan pada dinding sel karena terbentuknya protein ribonukleat kompleks sehingga dapat mempertahankan warna dasar walaupun telah dilakukan proses penghilangan kepekatan warna.

Kelompok bakteri Gram negatif mempunyai ciri sel yang berwarna merah akibat zat warna safranin. Lapisan peptidoglikan yang relatif tipis pada bakteri Gram negatif menyebabkan rusaknya membran luar bakteri Gram negatif akibat pencucian alkohol dan melarutkan zat warna kristal violet (Nester *et al.*, 2007). Karakteristik morfologi sel pada 3 isolat yaitu *bacil* dengan sifat Gram positif dan 1 isolat lainnya berbentuk *coccus* negatif. Hal ini sesuai dengan penelitian Islam *et al.* (2019), bahwa morfologi bakteri penambat nitrogen yang diperolehnya mempunyai bentuk batang dan bulat dengan sifat Gram positif dan Gram negatif. Penelitian Fatimah *et al.* (2022), delapan dari sepuluh isolat bakteri penambat nitrogen yang diperoleh memiliki morfologi sel berbentuk batang dan bersifat Gram positif. Penelitian Tarigan *et al.* (2013), semua isolat bakteri penambat nitrogen yang diperoleh merupakan bakteri Gram negatif dengan bentuk sel bulat dan batang.

Hasil uji motilitas menunjukkan bahwa semua isolat bakteri merupakan bakteri motil (Tabel 4). Hasil positif dari uji motilitas jika bakteri yang tumbuh pada media menyebar di sekitar tusukan isolat dan sebaliknya jika tidak ada penyebaran pertumbuhan bakteri pada tusukan isolat maka bakteri bersifat non motil (Buak *et al.*, 2022). Seluruh isolat bakteri terpilih merupakan bakteri yang motil. Hal tersebut sesuai dengan penelitian Santoso *et al.* (2019), ketiga isolat bakteri penambat nitrogen yang didapat mempunyai ciri sebagai bakteri motil. Penelitian Buak *et al.* (2022), juga diperoleh bahwa semua isolat bakteri yang dapat menambat nitrogen bersifat motil karena pertumbuhan bakteri menyebar di sekitar tusukan isolat.

Hasil uji katalase diperoleh bahwa semua isolat bakteri dapat menghasilkan enzim katalase yang ditandai dengan munculnya gelembung (Tabel 4). Beberapa bakteri memproduksi senyawa hidrogen peroksida (H₂O₂) pada saat proses respirasi atau kondisi tertentu, senyawa tersebut beracun dan merusak metabolisme bakteri sehingga diperlukan enzim katalase. Hidrogen peroksida diubah menjadi air dan oksigen oleh enzim katalase agar tidak beracun bagi bakteri. Oksigen tersebut yang

terlihat dalam bentuk gelembung pada uji katalase (Cappucino dan Sherman, 2001). Bakteri yang dapat menghasilkan enzim katalase dapat terhindar dari bahaya kumpulan peroksida yang dapat menyebabkan mutasi sel (Pulungan dan Tumangger, 2018). Semua isolat bakteri penambat nitrogen terpilih dapat menghasilkan enzim katalase, hal tersebut dikarenakan bakteri memproduksi hidrogen peroksida yang diurai dengan enzim katalase. Hasil ini sesuai dengan penelitian Buak *et al.* (2022), bahwa semua bakteri penambat nitrogen yang diperoleh positif menghasilkan enzim katalase yang ditandai dengan terbentuknya gelembung.

Berdasarkan hasil karakterisasi bakteri penambat nitrogen nonsimbiotik dari rizosfer tanaman nanas (Tabel 1) diketahui bahwa karakteristik isolat P33 mempunyai bentuk koloni *irregular*, bentuk sel *coccus*, Gram negatif, motil, dan bersifat katalase positif. Hal tersebut sejalan dengan penelitian Tarigan *et al.* (2013), bahwa isolat bakteri penambat nitrogen dengan kode N₇ mempunyai bentuk koloni *irregular*, bentuk sel *coccus*, bakteri Gram negatif, motil, dan dapat menghasilkan katalase. Penelitian Islam *et al.* (2019), karakteristik bakteri penambat nitrogen dengan kode isolat NFBLC32 mempunyai bentuk koloni *irregular* dengan bentuk sel *coccus* dan merupakan bakteri Gram negatif. Isolat B21, B22, dan B23 mempunyai karakteristik bentuk koloni *irregular*, warna putih, optik *opaque* dengan karakteristik permukaan, ukuran elevasi, dan tepi yang beragam serta bentuk sel *bacil*, bakteri Gram positif, motil, dan katalase positif. Hal tersebut sejalan dengan penelitian Fatimah *et al.* (2022), sebagian besar isolat bakteri penambat nitrogen yang diperoleh mempunyai karakteristik bentuk sel *bacil* dan Gram positif. Isolat bakteri penambat nitrogen dengan kode NFBC32 mempunyai karakteristik bentuk koloni *irregular*, berwarna putih keruh, dan merupakan bakteri Gram positif dengan bentuk sel *bacil* (Islam *et al.*, 2019). Penelitian Kaburuan *et al.* (2014), menunjukkan isolat bakteri penambat nitrogen nonsimbiotik dari tanah gambut dengan kode isolat HTA2 10-4 NS-4, HTA2 10-5 NS-2, HTA2 10-5 NS-4, HTA4 10-5 NS-3, dan HTA5 10-6 NS-4 mempunyai karakteristik bentuk koloni *irregular*, warna putih, bentuk sel *bacil*, Gram positif, dan motil.

SIMPULAN

Terdapat 19 isolat bakteri hasil isolasi dari rizosfer tanaman nanas (*Ananas comosus*) di Lereng Gunung Kelud Kediri dengan 4 isolat diantaranya merupakan isolat bakteri penambat nitrogen nonsimbiotik. Empat isolat bakteri penambat nitrogen diperoleh dari hasil pengujian kemampuan penambatan nitrogen secara kualitatif dan kuantitatif, yang diberikan kode isolat P33, B21, B22, dan B23. Karakteristik isolat bakteri penambat nitrogen nonsimbiotik cukup beragam. Karakteristik morfologi koloni yang ditemukan berupa karakteristik optik *opaque*; warna putih; bentuk *irregular* dimiliki oleh semua isolat; karakteristik permukaan halus (isolat B23), kasar (isolat P33 dan B22), dan berkerut (isolat B21); elevasi *flat* (isolat P33 dan B21) dan *raised* (isolat B22 dan B23); bentuk tepian *irregular* (isolat P33 dan B21) dan *undulate* (isolat B22 dan B23); serta ukuran koloni bervariasi antara 0,3–1,5 cm. Karakteristik morfologi sel yang diperoleh yaitu bentuk sel *coccus* (isolat P33) dan *bacil* (isolat B21, B22, dan B23); susunan sel *mono* (isolat P33 dan B21) dan *strepto* (isolat B22 dan B23); dan sifat Gram negatif (isolat P33) dan positif (isolat B21, B22, dan B23). Semua isolat bakteri merupakan bakteri motil dan mampu menghasilkan enzim katalase. Isolat bakteri penambat nitrogen mempunyai kemampuan menghasilkan amonium dengan rata-rata konsentrasi yang berbeda tiap isolatnya, yaitu: isolat P33 sebesar 0,586 ppm; isolat B21 sebesar 0,917 ppm; isolat B22 sebesar 0,682 ppm; dan isolat B23 sebesar 0,577 ppm.

DAFTAR PUSTAKA

- Alyani DF dan Ambarwati R, 2018. Variasi Morfologi dan Kemelimpahan *Donax faba* (Bivalvia: Donacidae) di Pantai Tengket Bangkalan Madura. *Biotropic*; 2(2): 73-84.
- Dharma B, 2005. *Recent and Fossil Indonesian Shells*. Hackenheim: Conchbooks.
- Ginting EDD, Susetya IE, Patana P, dan Desrita, 2017. Identifikasi jenis-jenis bivalvia di Perairan Tanjungbalai, Provinsi Sumatera Utara. *Acta Aquatica*; 4(1): 13-20.
- Tyas AW dan Kuntjoro S, 2018. Keanekaragaman Bivalvia dan Peranannya Sebagai Bioindikator Logam Berat Timbal (Pb) di Pantai Kenjeran Surabaya. *LenteraBio*; 7(3): 248-252.
- Antralina M, Knia D, dan Santoso J, 2015. Pengaruh Pupuk Hayati terhadap Kelimpahan Bakteri Penambat Nitrogen dan Pertumbuhan Tanaman Kina (*Chincona ledgeriana* Moens.) Klon Cib.5. *Jurnal Penelitian Teh dan Kina*; 18(2): 177-185.
- Apriliya I, Prasetyo D, dan Selvany R, 2020. Isolasi Bakteri Rhizosfer Resistensi Pestisida dan Herbisida pada Berbagai Jenis Tutupan Lahan. *Jurnal Agroteknologi dan Ilmu Pertanian*; 5(1): 64-71.
- Asrul dan Aryantha INP, 2021. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Penambat Nitrogen untuk Pembuatan Biofertilizer. *VIABEL: Jurnal Ilmiah Ilmu-Ilmu Pertanian*; 15(1): 16-23.

- Badan Pusat Statistik, 2021. *Produksi Tanaman Buah-Buahan* 2021. (Online), (<https://www.bps.go.id/indicator/55/62/1/produksi-tanaman-buah-buahan.html>), diakses tanggal 20 Agustus 2022).
- Badan Pusat Statistik Kabupaten Kediri, 2021. *Statistik Daerah Kabupaten Kediri* 2021. (Online), (<https://kedarikab.bps.go.id>), diakses tanggal 20 Agustus 2022).
- Baldani JL, Reise VM, Videira SS, Boddey LH, dan Baldani VLD, 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: 413-431.
- Bangun KO dan Suryanto A, 2020. Kombinasi Pemberian Pupuk Urea dan Pupuk SP-36 terhadap Pertumbuhan Vegetatif Tanaman Nanas (*Ananas comosus* L.) cv. *Queen*. *Jurnal Produksi Tanaman*; 8(11): 1059-1067.
- Buak A, Fallo G, dan Pardosi L, 2022. Seleksi dan Identifikasi Bakteri Penambat Nitrogen pada Perakaran Tanaman Kacang Hijau (*Vigna radiata* L.) dan Tomat (*Solanum lycopersicum* L.) di Kabupaten Belu. *Jurnal Biologi dan Pembelajarannya*; 9(2): 34-41.
- Cappuccino JG dan Sherman N, 2001. *Microbiology : A Laboratory Manual Edisi Kedua*. New York: Benjamin Cummings Publishing Company.
- Castillo T, Garcia A, Padilla-Cordova C, DiazBarrera A, dan Pena C, 2020. Respiration in *Azotobacter vinelandii* and Its Relationship with The Synthesis of Biopolymers. *Electronic Journal of Biotechnology*; 48(2020): 36-45.
- Danapriatna N, 2010. Biokimia Penambatan Nitrogen oleh Bakteri Nonsimbiotik. *Jurnal Agribisnis dan Pengembangan Wilayah*; 1(2).
- Darnaudery M, Fournier P, dan Lechaudel M, 2018. Low-Input Pineapple Crops With High Quality Fruit: Promising Impacts of Locally Integrated and Organic Fertilisation Compared to Chemical Fertilisers. *Experimental Agriculture*; 54(2): 286-302.
- Dewi AK, Meylina L, dan Rusil R, 2017. Isolasi Bakteri dari Tanah Mangrove *Rhizopora* sp. di Kota Bontang. *Proceeding of the 5th Mulawarman Phamaceuticals Conferences*, Fakultas Farmasi, Universitas Mulawarman, Samarinda, 23-24 April 2017.
- Fatimah, Millah AI, Fadilah RLA, Salsabila S, Ramly ZA, Sugiarti T, Nurhariyati T, Ni'matuzahroh, dan Affandi M, 2022. Isolation and Potency Test of Endophytic Bacteria as Nitrogen Fixer from Mangrove Plant in Lamongan. *Jurnal Riset dan Aplikasinya*; 4(1): 26-33.
- Gordon SA dan Weber RP, 1951. Colorimetric Estimation of Indoleacetic Acid. *Journal of Plant Physiol*; 26(1): 192-195.
- Hamidah MK, Rianingsih L, dan Romadhon, 2019. Aktivitas Antibakteri Isolat Bakteri Asam Laktat dari Peda dengan Jenis Ikan Berbeda terhadap *E. coli* dan *S. aureus*. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Perikanan*; 1(2): 11-21.
- Hartono, 2014. Eksresi Amonium pada Bakteri Penambat Nitrogen dan Pengaruhnya terhadap Pertumbuhan Tanaman. *Jurnal Bionature*; 15(1): 35-40.
- Hartono dan Jumadi O, 2014. Seleksi dan Karakterisasi Bakteri Penambat Nitrogen Nonsimbiotik Pengekskresi Amonium pada Tanah Pertanaman Jagung (*Zea mays* L.) dan Padi (*Oryza sativa* L.) Asal Kabupaten Barru, Sulawesi Selatan, Indonesia. *Jurnal Sainsmat*; 3(2): 143-153.
- Haruta S, Kato S, Nakamura K, dan Nishizawa T, 2004. Effect of Ammonium Ion on the pH Dependence of Hydrogen Oxidation Activity and The Structure of The Microbial Community in A Microbial Fuel Cell. *Journal of Bioscience and Bioengineering*; 98(1): 22-27.
- Hoek JPV, Duijff R, dan Reinstra O, 2018. Nitrogen Recovery from Wastewater: Possibilities, Competition with Other Resources, and Adaptation Pathways. *Sustainability*; 10(4602): 3-18.
- Huslina F dan Harahap D, 2019. Isolasi Bakteri Pengikat Nitrogen dengan Menggunakan Media Jensen. *Jurnal Agrotek*; 6(2): 91-93.
- Islam H, Nelvia N, dan Zul D, 2019. Isolasi dan Uji Potensi Bakteri Diazotrof Nonsimbiotik Asal Tanah Kebun Kelapa Sawit dengan Aplikasi Tandan Kosong dan Limbah Cair Pabrik Kelapa Sawit. *Jurnal Agroteknologi*; 9(2): 35-40.
- Israwan RF, Ardyati T, dan Suharjono, 2015. Eksplorasi Bakteri Pemfiksasi Nitrogen Nonsimbiotik Penghasil IAA dan Pelarut Fosfat Asal Rhizosfer Tanaman Apel Kota Batu, Jawa Timur. *Jurnal Biotropika*; 3(2): 55-59.
- Iwata K, Yu SS, Azlin NN, dan Omari T, 2012. Ammonia Accumulation of Novel Nitrogen Fixing Bacteria. *Biotechnology-Molecular Studies and Novel Applications for Improved Quality of Human Life, Prof Reda Sammour (Ed.)*.
- Kaburuan R, Hapsoh, dan Gusmawartati, 2014. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Penambat Nitrogen Nonsimbiotik Tanah Gambut Cagar Biosfer Giam Siak Kecil Bukit Batu. *Jurnal Agroteknologi*; 5(1): 35-39.
- Kaewchomphunuch T, Charoenpichitnunt T, Thongbaiyai V, Ngamwongsatit N, dan Kaeket K, 2022. Cell-free Culture Supernatants of *Lactobacillus* spp. and *Pediococcus* spp. Inhibit Growth of Pathogenic *Escherichia coli* Isolated from Pigs in Thailand. *BMC Veterinary Research*; 18(60): 1-13.
- Kementan, 2016. *Outlook Nenas*. Pusat Data dan Sistem Informasi Pertanian Sekretariat Jenderal Kementerian Pertanian 2016.
- Khammas KM, Kamil FA, dan Hasan MA, 2019. Nitrogen Fixation and Ammonium Excretion by Free-Living Heterotrophic Bacteria Isolated from Iraqi Soils. *International Journal of Biosciences*; 14(2): 366-375.

- Lestari PB dan Hartati TW, 2017. *Mikrobiologi Berbasis Inkuiry*. Yogyakarta: Penerbit Gunung Samudera Group (Penerbit PT Book Mart Indonesia).
- Lubis SS, Sardi A, Huslina F, dan Lisa M, 2020. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Pengikat Nitrogen Tanah Gambut Hutan dari Kecamatan Trumon Aceh Selatan. *Quagga: Jurnal Pendidikan dan Biologi*; 12(2): 117-129.
- Ludden PW, 2001. *Nitrogenase Complex*. USA: Encyclopedia of Life Sciences.
- Manuhuttu AP, Rehatta H, dan Kailola JJG, 2014. Pengaruh Konsentrasi Pupuk Hayati Bioboost terhadap Peningkatan Produksi Tanaman Selada (*Lactuca sativa* L.). *Agrologia*; 3(1): 18-27.
- Margaretha SL, 2015. Dampak Inovasi Teknologi Pemupukan Nitrogen pada Tanaman Jagung terhadap Ketersediaan Pakan ditingkat Petani. *Prosiding Seminar Nasional Serelia*, 728-735.
- Marzuki I, Noor A, Nafie NL, dan Djide MN, 2014. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Shimbion Spons Penghasil Enzim Amilase Asal Pantai Melawah Balikpapan. *Jurnal Ilmiah "dr. Aloei Saboe"*; 1(2): 11-18.
- Nester EW, Anderson DG, Roberts JrCE, dan Nester MT, 2007. *Microbiology a Human Perspective 5th Edition*. New York: McGraw-Hill.
- Nurosid O, Lestari, dan Puji, 2008. Kemampuan *Azospirillum* sp. JG3 dalam Menghasilkan Lipase pada Medium Campuran Dedak dan Onggok dengan Waktu Inkubasi berbeda. Purwokerto: Universitas Soedirman.
- Nuryady MM, Istiqomah T, Faizah R, Ubaidillah S, Mahmudi Z, dan Sutoyo, 2013. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat Asal Youghurt. *UNEJ JURNAL*; 1(5): 1-11.
- Ohyama T, Momose A, Ohtake N, Sueyoshi K, Sato T, Nakanishi Y, A. Asis JrC, Ruamsungri S, dan Ando S, 2014. *Nitrogen Fixation in Sugarcane*. Agriculture and Biological Science.
- Pratiwi E, Satwika TD, Akhdiya A, dan Agus F, 2020. Karakterisasi Bakteri Asal Lahan Gambut Jambi dan Potensinya sebagai Pupuk Hayati. *Jurnal Tanah dan Iklim*; 44(1): 1-10.
- Pratiwi T, Rois, dan Toana MRC, 2022. Identifikasi Bakteri *Azotobacter* sp. Asal Rizosfer Tanaman Padi pada Lahan Sawah Intensif di Kabupaten Sigi. *J. Agrotekbis*; 10(4): 452-463.
- Pulungan AS dan Tumangger E, 2018. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Endofit Penghasil Enzim Katalase dari Daun BuasBuas (*Premna pubescens* Blume). *BioLink*; 5(1): 72-80.
- Purnomo BH dan Purnomo NH, 2021. Analisis Kesesuaian Lahan Nanas Kelud di Kecamatan Ngancar Kabupaten Kediri. *Jurnal Suara Bhumi*; 2(2).
- Rahman E, 2019. Analisis Kadar Amonia dan pH pada Limbah Cair Kanal 32 (K-32) PT Pusri Palembang. *Alkimia: Jurnal Ilmu Kimia dan Terapan*; 3(1): 10-15.
- Ramli ANM, Manas NHA, Hamid AAA, dan Illias RM, 2018. Comparative Structural Analysis of Fruit and Stem Bromelain from *Ananas comosus*. *Food Chemistry*; 266: 183-191.
- Ristiati NP, 2015. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Penambat Nitrogen Nonsimbiosis dari dalam Tanah. *Proceedings Seminar Nasional FMIPA UNDIKSHA V*, 5, 230-235.
- Riwayati I dan Ratnawati, 2010. Penurunan Kandungan Ammonia dalam Air dengan Teknik Elektrolisis. *Seminar Rekayasa Kimia dan Proses*, ISSN: 1411-4216, 1-7.
- Roni NGK dan Lindawati SA, 2014. Kajian Partial Bakteri Penambat Nitrogen Nonsimbiotik Asal Rhizosfer Tanaman Gamal sebagai *Plant Growth Promoting* pada Lahan Sistem Tiga Strata Pecatu. *Pastura*; 7(2): 78-82.
- Sabra W, Zeng AP, Lunsdorf H, dan Deckwer WD, 2000. Effect of Oxygen on Formation and Structure of *Azotobacter vinelandii* Alginate and Its Role in Protecting Nitrogenase. *Applied and Environmental Microbiology*; 66(9): 4037-4044.
- Sapalina F, Ginting EN, dan Hidayat F, 2022. Bakteri Penambat Nitrogen sebagai Agen Biofertilizer. *Warta PPKS*; 27(1): 41-50.
- Saraswati R, Husen E, dan Simanungkalit RDM, 2007. *Metode Analisis Biologi Tanah*. Jakarta: Balai Besar Litbang Sumberdaya Pertanian. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. Departemen Pertanian.
- Sari R dan Prayudyaningsih R, 2015. Rhizobium: Pemanfaatannya sebagai Bakteri Penambat Nitrogen. *Info Teknis Eboni*; 12(1): 51-64.
- Santoso K, Rahmawati, dan Rafdinal, 2019. Eksplorasi Bakteri Penambat Nitrogen dari Tanah Hutan Mangrove Sungai Peniti, Kabupaten Mempawah. *Jurnal Protobiont*; 8(1): 52-58.
- Setiawati MR, Arief DH, Suryatma P, dan Hudaya R, 2008. *Formulasi Pupuk Hayati Bakteri Endofitik Penambat N₂ dan Aplikasinya untuk Meningkatkan Hasil Tanaman Padi*. Bandung: Universitas Padjadjaran.
- Setiawati MR, Silifani Y, Kamaluddin NN, dan Simarmata T, 2020. Aplikasi Pupuk Urea, Pupuk Hayati Penambat Nitrogen, dan Amelioran untuk Meningkatkan pH, C-Organik, Populasi Bakteri Penambat Nitrogen, dan Hasil Jagung pada Inceptisol. *Soilrens*; 18(2): 1-10.
- Shabrina SN, Rayes ML, dan Agustina C, 2021. Evaluasi Kesesuaian Lahan untuk Tanaman Nanas di DAS Mikro Supituring Kecamatan Plosoklaten Kabupaten Kediri Jawa Timur. *Jurnal Tanah dan Sumberdaya Lahan*; 8(2): 515-525.
- Singh JS, 2013. Potential Microbes for Sustainable Agriculture. *Resonance*; 275-276.
- Sukweenadhi J, Purwanto MGM, Hardjoe PH, Kurniawan G, dan Artadana IMB, 2019. Isolation and In Vitro Screening of Plant Growth Promoting Rhizobacteria from Barak Cenana Red Rice. *Proceedings of the 2nd International Conference on Biosciences and Medical Engineering*.
- Susilowati DN, Fauziah F, Setiawati, MR, Pranoto E, Hidayati E, Setyowati M, dan Rachmiati Y, 2016. Analisis

- Komunitas Rhizosfer Tanaman Teh pada Pembenuhan menggunakan Teknik *Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism* (TRFLP). *Jurnal Penelitian Teh dan Kina*; 19(2): 147-156.
- Tarigan RS, Jamilah I, dan Elimasni, 2013. Seleksi Bakteri Penambat Nitrogen dan Penghasil Hormon IAA (*Indole Acetic Acid*) dari Rizosfer Tanah Perkebunan Kedelai (*Glycine max* L.). *Saintia Biologi*; 1(2): 42-48.
- Tivani I, 2018. Uji Angka Lempeng Total (ALT) pada Jamu Gendong Temu Ireng di Desa Tanjung Kabupaten Brebes. *Jurnal Para Pemikir*; 7(1): 215-218.
- Ummah R, Asri MH, dan Yakub P, 2019. Potensi Isolat Bakteri Endofit Akar Tanaman Bawang Merah (*Allium ascalonicum*) sebagai Penambat Nitrogen. *LenteraBio*; 8(2): 143-149.
- Utami AD, Wiyono S, Widyastuti R, dan Cahyono P, 2020. Keanekaragaman Mikrob Fungsional Rizosfer Nanas dengan Berbagai Tingkat Produktivitas. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*; 25(4): 584-591.
- Ward BB dan Jensen MM, 2014. The Microbial Nitrogen Cycle. *Frontiers in Microbiology*; 5: 1-2.
- Zulfarina Z, Rusmana I, Mubarik NR, dan Santosa DA, 2017. The Abundance of Nitrogen Fixing, Nitrifying, Denitrifying and Ammonifying Bacteria in the Soil of Tropical Rainforests and Oil Palm Plantations in Jambi. *Journal Makara of Science*; 21(4): 187-194.

Article History:

Received: 23 Mei 2023

Revised: 21 Oktober 2023

Available online: 25 Oktober 2023

Published: 31 Januari 2024

Authors:

Putri Rosfiana Dewi, Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Surabaya, Jalan Ketintang Gedung C3 Lt.2 Surabaya 60231, Indonesia, e-mail: putri.rosfiana@gmail.com
 Guntur Trimulyono, Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Surabaya, Jalan Ketintang Gedung C3 Lt.2 Surabaya 60231, Indonesia, e-mail: gunturtrimulyono@unesa.ac.id

How to cite this article:

Dewi PR, Trimulyono G, 2024. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Penambat Nitrogen dari Rizosfer Tanaman Nanas di Lereng Gunung Kelud Kediri. *LenteraBio*; 13(1): 73-85.